Hidrazino-derivat glutaminske kiseline za derivatizaciju karbonilnih spojeva

Brkljačić, Lidija

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:659583

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lidija Brkljačić

GLUTAMIC ACID-DERIVED HYDRAZINE REAGENT FOR DERIVATIZATION OF CARBONYL COMPOUNDS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lidija Brkljačić

HIDRAZINO-DERIVAT GLUTAMINSKE KISELINE ZA DERIVATIZACIJU KARBONILNIH SPOJEVA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Ivanka Jerić

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lidija Brkljačić

GLUTAMIC ACID-DERIVED HYDRAZINE REAGENT FOR DERIVATIZATION OF CARBONYL COMPOUNDS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Ivanka Jerić, PhD

Zagreb, 2018.

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ivanki Jerić, znan. savj. na vodstvu, strpljivosti, mnogobrojnim korisnim savjetima te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Želim se zahvaliti bivšoj kolegici dr. sc. Ini Nemet na prenesenom znanju i mnoštvu savjeta koje sam dobila iz područje kvantifikacije spektrometrijom masa.

Hvala NMR-ovcima na snimanju NMR spektara, pogotovo Sunčici na prijateljstvu svih ovih godina na Ruđeru.

Hvala i svim suradnicima na Institutu na čijim sam projektima stjecala iskustvo iz spektrometrije masa.

Zahvaljujem se članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu disertacije na konstruktivnim primjedbama i savjetima.

Zahvaljujem mojim dragim kolegama Ines, Ivanu, Ivi, Ivoni i Nikolini na kritičkim diskusijama i savjetima vezanima uz kromatografiju i spektrometriju masa kojima se svi više-manje bavimo.

Hvala mojim dragim LBK-ovcima Josipi, Kiki, Danijelu, Mladeni, Katarini i Ivani na svim diskusijama, velikoj pomoći u izradi sintetskog dijela ovog rada i što su uvijek pomogli kada je trebalo. Posebno hvala Matiji koji je s interesom pratio pojedine etape ovog rada, uvijek rado raspravljao o problemima te dao mnoštvo konstruktivnih primjedbi i savjeta.
Uz druženje s vama u labosu sve je bilo lakše odraditi!

Zbog mojih djevojčica Eme i Nine izrada ove disertacije razvukla se u skoro deset godina, no ni u jednom trenutku nije mi bilo žao. Hvala Anti na razumijevanju i svim prijateljima što su bili uz mene i vjerovali u moj uspjeh!

Lidija

Sadržaj

SAŽETAK ..... **VIII**
ABSTRACT ..... **IX**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **5**
2.1. Karbonilni spojevi **7**
2.2. Metode tekućinske kromatografije za određivanje karbonilnih spojeva **8**
2.3. Derivatizacija karbonilnih spojeva **9**
2.3.1. 2,4-dinitrofenilhidrazin kao derivatizacijski reagens za određivanje karbonilnih spojava *9*
2.3.2. DNPH u tekućinskoj kromatografiji uz UV detekciju *10*
2.3.3. DNPH u metodama spektrometrije masa *11*
2.3.4. Derivatizacijske metode karbonilnih spojeva za tandemnu spektrometriju masa *12*
2.4. Reduktivna aminacija **18**
2.5. Sprega tekućinske kromatografije i spektrometrije masa **19**
2.6. Tekućinska kromatografija **19**
2.7. Spektrometrija masa **20**
2.7.1. Ionizacija elektroraspršenjem *20*
2.7.2. Analizatori *22*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **27**
3.1. Kemikalije i metode karakterizacije pripravljenih spojeva **29**
3.1.1. Kemikalije *29*
3.1.2. Spektrometrija masa, osnovni spektri *29*
3.1.3. NMR eksperimenti *29*
3.2. Priprava karbonil-2,4-DNP-hidrazona **30**
3.2.1. Opći sintetski protokol *30*
*3.2.2. Priprava benzaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6a**)* *30*
*3.2.3. Priprava propanal-2,4-DNP-hidrazona (**6b**)* *31*
*3.2.4. Priprava aceton-2,4-DNP-hidrazona (**6c**)* *31*
*3.2.5. Priprava cikloheksanon-2,4-DNP-hidrazona (**6d**)* *32*
*3.2.6. Priprava heksanal-2,4-DNP-hidrazona (**6e**)* *32*
*3.2.7. Priprava 3-oktanon-2,4-DNP-hidrazona (**6f**)* *33*
*3.2.8. Priprava formaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6g**)* *34*
*3.2.9. Priprava acetaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6h**)* *34*

*3.2.10. Priprava 3-OH-benzaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6i**)* *35*
*3.2.11. Priprava metilglioksal-2,4-DNP-hidrazona (**6j**)* *35*
3.3. Priprema hidrazino-derivata glutaminske kiseline kao derivatizacijskog reagensa 36
*3.3.1. Priprava Z-Glu(OtBu)-OEt (**2**)* *36*
*3.3.2. Priprava Z-Glu-OEt (**3**)* *37*
*3.3.3. Priprava Z-Glu(NHNHBoc)-OEt (**4**)* *37*
*3.3.4. Priprava Z-Glu($NHNH_2$)-OEt (**5**)* *38*
3.4. Priprema hidrazona glutaminske kiseline i odabranih karbonilnih spojeva 39
3.4.1. Opći sintetski protokol *39*
*3.4.2. Priprava benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**)* *40*
*3.4.3. Priprava aceton-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5b**)* *41*
*3.4.4. Priprava heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5c**)* *42*
*3.4.5. Priprava benzofenon- Z-Glu-OEt-hidrazona (**5d**)* *43*
*3.4.6. Priprava 4-OH-benzaldehid- Z-Glu-OEt-hidrazona (**5e**)* *44*
3.5. Razvoj protokola za derivatizaciju i LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona 45
3.5.1. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju *45*
3.5.2. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona *45*
3.5.3. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje ostalih karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona *46*
3.5.4. Priprava modelne otopine s benzaldehidom *46*
3.6. Redukcija hidrazona u hidrazide 47
*3.6.1. Priprava benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7a**)* *48*
*3.6.2. Priprava aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7b**)* *48*
*3.6.3. Priprava heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7c**)* *49*
*3.6.4. Priprava cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7d**)* *50*
3.7. Razvoj protokola za derivatizaciju i LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida 51
3.7.1. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida *51*
3.7.2. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju i priprava modelne otopine benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida *52*
3.7.3. Priprava modelne otopine aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida *53*
3.7.4. Priprava modelne otopine heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida *53*
3.7.5. Priprava modelne otopine cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida *54*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 55
4.1. Priprava derivatizacijskog reagensa 57
4.2. Priprava derivata hidrazona glutaminske kiseline i odabranih karbonilnih spojeva 59
4.2.1. Optimiranje reakcijskih uvjeta za dobivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona *59*

4.3. Priprava karbonil-2,4-dinitrofenilhidrazona 60
4.4. MS/MS analiza karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona i karbonil-2,4-dinitrofenilhidrazona 62
4.5. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona.....68
4.6. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju i priprava modelnih otopina karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona 68
4.7. Reduktivna aminacija karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona u karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazide.71
4.8. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida.....73
4.9. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju i priprava modelnih otopina karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida 75
*4.9.1. Modelne otopine benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7a**).....75*
*4.9.2. Modelne otopine aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7b**) 77*
*4.9.3. Modelne otopine heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7c**).....78*
*4.9.4. Modelne otopine cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7d**).....79*
§ 5. ZAKLJUČAK 81
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ..... 85
§ 7. LITERATURNI IZVORI..... 89
§ 8. ŽIVOTOPIS X

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

HIDRAZINO-DERIVAT GLUTAMINSKE KISELINE ZA DERIVATIZACIJU KARBONILNIH SPOJEVA

Lidija Brkljačić
Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za biomimetičku kemiju, Bijenička cesta 54, Zagreb

U okviru provedenih istraživanja osmišljen je i pripravljen novi reagens za derivatizaciju karbonilnih spojeva, hidrazino-derivat glutaminske kiseline, koji je upotrebljen za određivanje karbonilnih spojeva LC-MS/MS metodom. Istraživanje je obuhvatilo i njegovu karakterizaciju spektroskopskim i spektrometrijskim metodama. Reakcijom hidrazino-derivata glutaminske kiseline i odabranih karbonilnih spojeva dobiveni su Glu-hidrazoni, koji su prema potrebi reducirani u Glu-hidrazide. Nastali produkti su izolirani te okarakterizirani spektroskopskim i spektrometrijskim metodama.

U doktorskom radu istražene su fragmentacijske reakcije nastalih hidrazona i hidrazida u MS/MS eksperimentima kako bi se identificirali specifični ioni produkti koji su upotrijebljeni za razvoj LC-MS/MS metode. Istraženi su i optimirani reakcijski uvjeti koji su osigurali kvantitativnost derivatizacijske reakcije.

Za usporedbu, sintetizirani su i okarakterizirani produkti odabranih karbonilnih spojeva s najčešće korištenim reagensom za derivatizaciju karbonilnih spojeva, 2,4 dinitrofenilhidrazinom.

(94 + XIV stranica, 30 slika, 17 shema, 4 tablice, 71 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: derivatizacija karbonilnih spojeva/glutaminska kiselina/hidrazoni/hidrazidi /spektrometrija masa

Mentor: dr. sc. Ivanka Jerić, zn. savj.

Rad prihvaćen: 12.09.2018.

Ocjenitelji: 1. Dr. sc. Predrag Novak, red. prof.
2. Dr. sc. Nives Galić, red. prof.
3. Dr. sc. Ivanka Jerić, zn. savj.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

GLUTAMIC ACID-DERIVED HYDRAZINE REAGENT FOR DERIVATIZATION OF CARBONYL COMPOUNDS

Lidija Brkljačić
Ruđer Bošković Institute, Laboratory of biomimetic chemistry, Bijenička cesta 54, Zagreb

The scope of the study included the design and preparation of a glutamic acid-related hydrazine reagent as new reagent for the derivatization of carbonyl compounds for LC-MS/MS analysis and its characterization by spectroscopic and spectrometric methods. Reaction of the glutamic acid-related hydrazine reagent and the selected carbonyls resulted in the corresponding Glu-hydrazones which were optionally reduced to Glu-hydrazides. The formed products were isolated and characterized by spectroscopic and spectrometric methods.

Fragmentation patterns of prepared hydrazones and hydrazides in MS/MS experiments were also investigated for the identification of "marker ions", used for the development of LC-MS/MS method. The optimization of reaction conditions was performed to provide a quantitative derivatization.

For comparison purposes, products of selected carbonyls with the most exploited derivatization reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine, were also synthesized and characterized.

(94 + XIV pages, 30 figures, 17 shemes, 4 tables, 71 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: derivatization of carbonyl compounds/glutamic acid/hydrazones/hydrazides/mass spectrometry

Supervisor: dr. Ivanka Jerić, Senior Research Associate

Thesis accepted: 12.09.2018.

Reviewers: 1. Dr. Predrag Novak, Professor
2. Dr. Nives Galić, Professor
3. Dr. Ivanka Jerić, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

Karbonilni spojevi male molekulske mase prisutni u okolišu najčešće su produkti oksidacijskog raspada organskih molekula, dok su u biološkim uzorcima markeri oksidativnog stresa i metaboličkih bolesti. U tako složenim sustavima najčešće se identificiraju i kvantificiraju metodama koje koriste vezani sustav tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). Međutim, zbog male molekulske mase, polarnog karaktera i slabe ionizacije, nužna je njihova derivatizacija. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) je najčešće korišten reagens za derivatizaciju karbonilnih spojeva. DNPH se najčešće upotrebljava za analize koje koriste vezani sustav tekućinska kromatografija visoke razlučivosti-detekcija ultraljubičastim zračenjem (*high performance liquid chromatograpy-UV detection*, HPLC-UV), koje nisu dovoljno selektivne i osjetljive za analizu karbonilnih spojeva u uzorcima niskih koncentracija i u složenim matricama. DNPH se koristi i kao derivatizacijski reagens u LC-MS/MS metodama, no nastali produkti teže ioniziraju, a u MS/MS analizama daju nespecifične fragmente. Ti fragmenti uglavnom potječu od adukata dobivenih fragmentacijom reagensa i nisu prikladni za razvoj selektivne i osjetljive LC-MS/MS metode. Da bi određeni reagens bio prikladan za derivatizaciju karbonilnih spojeva i analizu LC-MS/MS metodom, mora zadovoljiti neke od osnovnih zahtjeva, poput nastajanja stabilnih derivata i kvantitativnost derivatizacijske reakcije. Trebaju biti zadovoljeni i zahtjevi specifični za MS analizu kao što je prisutstvo skupine s afinitetom prema protonima za pozitivnu ionizaciju (poput amino-skupina) ili trajno nabijene skupine, koje će lako fragmentirati u koliziji induciranoj disocijaciji (*collision-induced dissociation,* CID) i dati karakteristične i specifične ione produkte.

U literaturi je opisano nekoliko reagensa razvijenih za MS/MS metode, ali postoji potreba za razvojem novih specifičnih reagensa koji će omogućiti praćenje karbonilnih spojeva u nižim koncentracijama i u složenim matricama, poput otpadnih voda ili bioloških sustava. Dakle, razvoj novih derivatizacijskih reagensa je važan u kontroli zdravlja i praćenju stanja okoliša.

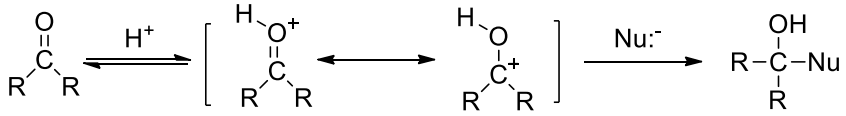
U literaturi je poznato da aminokiselinski ili peptidni derivati, kao bazični spojevi, dobro ioniziraju u MS eksperimentima s pozitivnom ionizacijom te daju bogate i specifične fragmentacijske spektre u MS/MS eksperimentima. Tako predstavljaju dobre kandidate za korištenje u derivatizacijskim reakcijama karbonilnih spojeva u MS/MS eksperimentima.

Cilj predloženih istraživanja je razvoj hidrazino-reagensa aminokiselinske strukture za derivatizaciju karbonilnih spojeva. Hipoteza istraživanja polazi od ideje da će u derivatizacijskoj reakciji hidrazino-reagensa aminokiselinske strukture i karbonilnih spojeva nastati produkti koji daju brojne i specifične ione produkte u MS/MS eksperimentim. Takvi ioni produkti bili bi pogodni za razvoj selektivne i osjetljive LC-MS/MS metode koja je metoda izbora za identifikaciju i kvantifikaciju karbonilnih spojeva u biološkim uzorcima, uzorcima okoliša i kontroli kvalitete.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Karbonilni spojevi

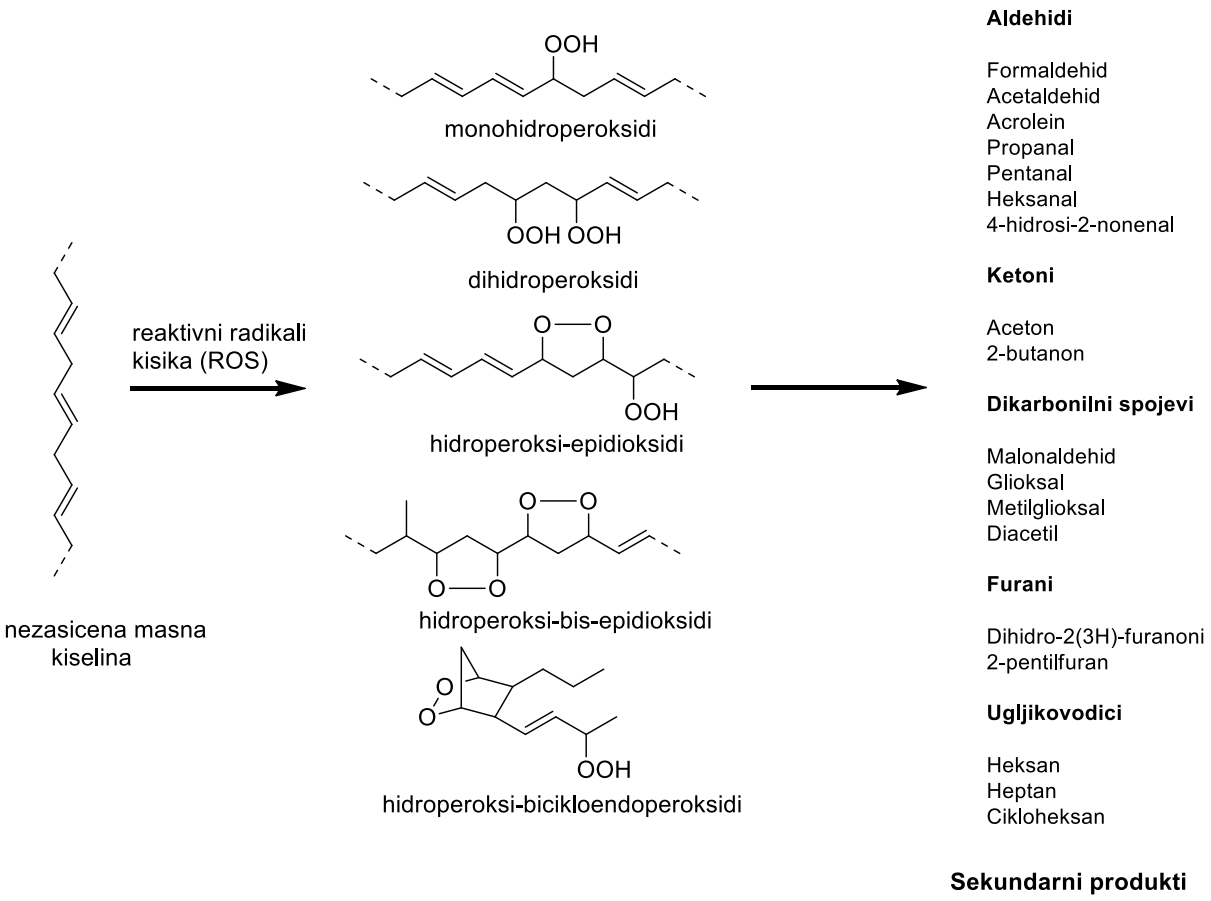
Aldehidi i ketoni reaktivni su i nestabilni spojevi. Karbonilna skupina zbog polarnosti dvostruke veze ima veliki dipolni moment, stoga su nukleofilne adicijske reakcije najčešće reakcije kojima karbonilni spojevi podliježu (Shema 1.). Karbonilna skupina je slaba baza i u kiseloj otopini se protonira. Ugljikov atom tako poprima elektrofilni karakter i reagira sa slabim nukleofilima.



Shema 1. Reakcije nukleofilne adicije

Aldehidi su reaktivniji od ketona, a razlozi tomu su elektronski i sterički. Ketoni imaju dva alkilna/arilna supstituenta, aldehidi samo jedan, a kako su alkilne/arilne skupine elektron-donirajuće, ketoni imaju manji parcijalni pozitivni naboj nego aldehidi. Što se steričkih razloga tiče, kod ketona je karbonilna skupina zaklonjena s dvije alkilne/arilne skupine što otežava nukleofilni napad u odnosu na aldehide kod kojih je karbonilna skupina zaklonjena samo s jednom alkilnom/arilnom skupinom.

Karbonilni spojevi su međuprodukti u procesu razgradnje, odnosno oksidacije mnogih organskih spojeva. Karbonilni spojevi male molekulske mase su hidrofilni, topljivi u vodi i stoga lako ulaze u okoliš putem zraka, vode ili tla. Najčešće u okoliš ulaze kao oksidacijski produkti u postupku tretiranja vode ozonom[1,2] ili pak tijekom emisije štetnih plinova.[3] Karbonilni spojevi mogu se naći u hrani, najčešće pićima ili prženoj hrani, gdje je njihovo nastajanje uzrokovano oksidacijom masnih kiselina (Slika 1.) ili viših alkohola, Steckerovom razgradnjom, aldolnom kondenzacijom ili Maillardovom reakcijom.[4] U biološkim sustavima toksični su i kancerogeni. Zbog elektrofilnog karaktera podložni su nukleofilnim napadima biomolekula, prije svega nukleinskih kiselina i proteina. Prisutstvo karbonilnih spojeva u biološkim sustavima koristi se i kao indikator oksidativnog stresa, poput malonaldehida, produkta lipidne peroksidacije,[5] a time i mnogih metaboličkih poremećaja.



Slika 1. Formiranje međuprodukata i sekundarnih produkata oksidacijom lipida

2.2. Metode tekućinske kromatografije za određivanje karbonilnih spojeva

Karbonilni spojevi najčešće se određuju metodama tekućinske kromatografije uz detekciju ultraljubičastim zračenjam ili spektrometrijom masa.[6,7] Kako su aldehidi i ketoni polarni spojevi, vrlo teško se zadržavaju na nepolarnim kolonama u obrnutofaznoj kromatografiji. S druge pak strane, karbonilni spojevi male molekulske mase, kao najzanimljiviji spojevi, nemaju odgovarajuće kromofore za UV detekciju, niti skupine koje dobro ioniziraju čime bi bili vidljivi spektrometrijom masa. Zato je prije ili tijekom ekstrakcije takvih spojeva nužna njihova kemijska derivatizacija. Pri odabiru odgovarajućeg reagensa za derivatizaciju, treba voditi računa o sljedećem:[8]

1. Reakcijom derivatizacijskog reagensa i ciljanog analita treba nastati stabilan produkt.

2. Reakcija dobivanja produkta između derivatizacijskog reagensa i ciljanog analita treba biti kvantitativna.
3. Postupak derivatizacije treba biti jednostavan i odvijati se u blagim reakcijskim uvjetima.
4. Kemijska svojstva produkta koji nastaje reakcijom derivatizacijskog reagensa i ciljanog analita moraju biti kompatibilna s odabranom separacijskom i detekcijskom tehnikom.

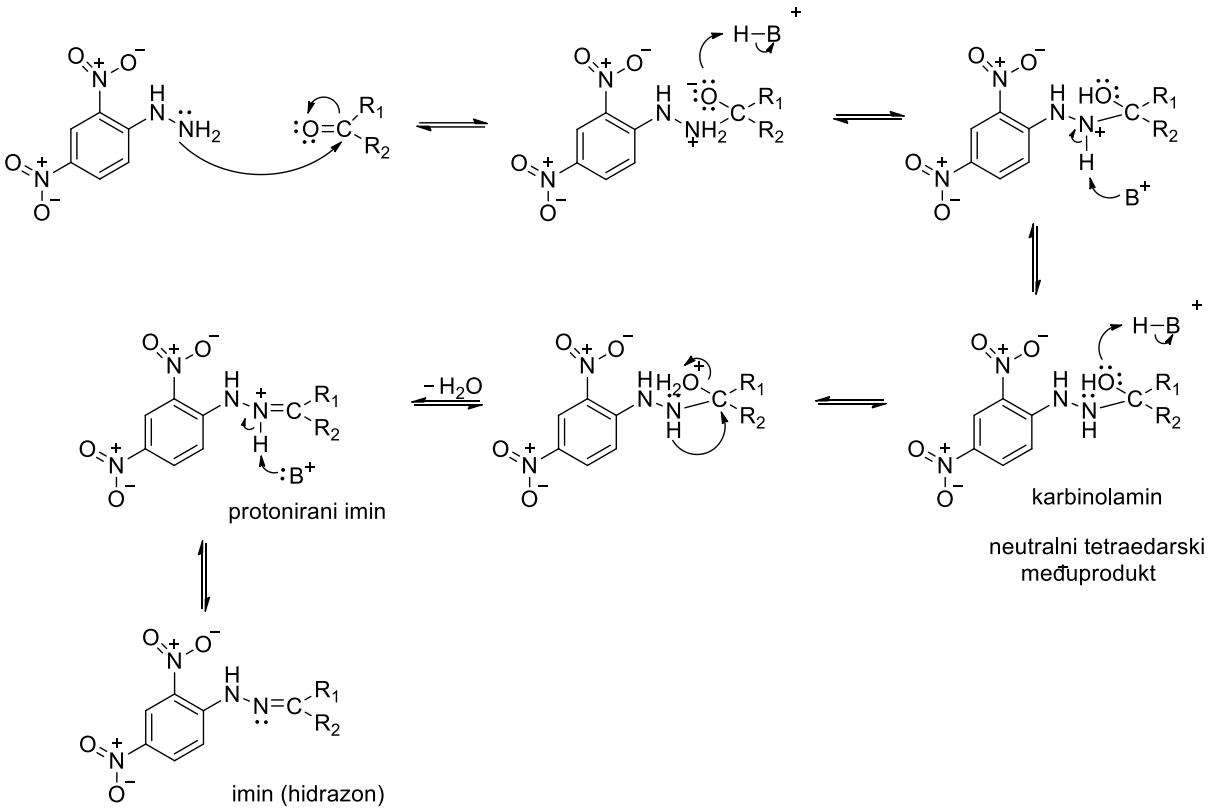
2.3. Derivatizacija karbonilnih spojeva

Kemijska derivatizacija je kemijska reakcija između analita i derivatizacijskog reagensa koja se najčešće provodi u postupku pripreme uzorka za kromatografsku analizu. Derivatizacijski reagens reagira s analitima tvoreći kovalentne ili nekovalentne produkte koji će biti osjetljiviji na odabranu detekcijsku tehniku (najčešće UV detekciju, elektrokemijsku detekciju, fluorescencijsku detekciju ili spektrometriju masa) u odnosu na analite koji nisu prošli postupak derivatizacije.[9]

2.3.1. 2,4-dinitrofenilhidrazin kao derivatizacijski reagens za određivanje karbonilnih spojava

Najčešće korišteni derivatizacijski reagensi za određivanje aldehida i ketona u tekućim i plinovitim uzorcima su hidrazinski reagensi, prije svih 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH).[8] Reakcijom DNPH i karbonilnih spojeva nastaju odgovarajući 2,4-dinitrofenilhidrazoni (karbonil-2,4-DNP-hidrazoni) i ta reakcija je jedna od najvažnijih kvalitativnih i kvantitativnih metoda u organskoj sintezi. Derivatizacijska reakcija je nukleofilna adicija amina u kiselim reakcijskim uvjetima (Shema 2.) pri čemu nastaje neutralni tetraedarski produkt karbinolamin.[6] U sljedećem koraku dolazi do protoniranja kisika i eliminacije vode čime nastaje hidrazon. Svakako treba spomenuti da je nastajanje hidrazona reverzibilna reakcija; u kiselim reakcijskim uvjetima se hidrazonski derivati hidroliziraju do karbonila i DNPH. Derivatizacija se provodi po postupku Allena i suradnika[10] te Bradya,[11] koji uključuje otapanje DNPH u smjesi dobivenoj miješanjem sumporne kiseline, vode i etanola. Smjesi se doda karbonilni spoj kao 10 % otopina u etanolu (50 % molarni suvišak). Produkt istaloži

odmah po dodatku karbonilnog spoja. Glavna prednost derivatizacije s DNPH je mogućnost istovremenog određivanja velikog broja spojeva.



Shema 2. Nastajanje karbonil-2,4-dinitrofenilhidrazona

Derivatizacija s DNPH se za tekuće uzorke provodi tijekom obrade uzorka i to u otopini ili na koloni; DNPH se nanosi na čvrsti sorbens kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi, a potom i ciljani analit te do derivatizacije dolazi na koloni.[8,12] Za određivanje karbonilnih spojeva u zraku koriste se različite modifikacije pasivnih uzorkivača, najčešće u obliku filtera impregniranih s DNPH.[13]

2.3.2. DNPH u tekućinskoj kromatografiji uz UV detekciju

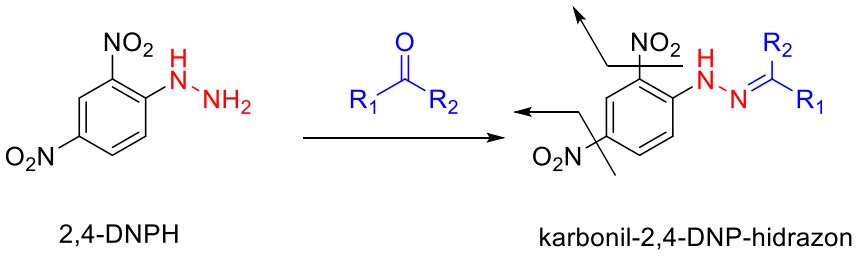
DNPH se najviše koristi kod tehnika tekućinske kromatografije uz detekciju ultraljubičastim zračenjem (HPLC-UV),[14,15] jer derivatizacijom karbonilni spojevi dobivaju karakterističnu UV kromoforu koja se detektira na valnoj duljini od 360 nm. Lin i sradnici razvili su jednostavnu HPLC-DNPH-UV metodu za određivanje linearnih C1–C9 alifatskih aldehida u

vodi koja sadrži ione teških metala.[14] Metoda uključuje derivatizaciju aldehida s DNPH u otopini pri pH 1,8 tijekom 30 min, a potom analizu na HPLC-UV. Ion bakra prisutan u vodenim uzorcima iz okoliša može oksidirati DNPH pa su autori upotrijebili EDTA koja s teškim metalima tvori komplekse i sprečava oksidaciju DNPH. Granice detekcije za direktno injektiranje bile su reda veličine nekoliko nM, a upotrebom adsorpcijskih kolona za ukoncentriravanje, granice detekcije mogu se i dodatno sniziti. de M. Ochs i suradnici osmislili su HPLC metodu za analizu 15 karbonil-2,4-DNP-hidrazona derivata koristeći kao pokretnu fazu smjesu izopropanola, metanola, tetrahidrtofurana i vode koja se pokazala najbolja za uspješno razdvajanje svih analita u relativno kratkom vremenu.[15] Osim otapala, istraživali su i seriju nepolarnih kolona za dobivanje najbolje rezolucije i separacije. Analitička metoda upotrijebljena je kasnije kako bi se odredili karbonilni spojevi u uzorcima zraka sakupljenim u Niterói, Brazil.

HPLC-UV analize nisu dovoljno selektivne i osjetljive za analizu karbonilnih spojeva u uzorcima niskih koncentracija i u složenim matricama. Svakako treba spomenuti i da derivatizacijom aldehida i ketona s DNPH, zbog prirode dvostruke C=N veze, nastaju *E*- i *Z*-stereoizomeri i njihov omjer ovisi prije svega o prirodi analita.[6] *E*- i *Z*-stereoizomeri mogu imati različite spektralne karakteristike te različite valne duljine maksimuma apsorbancije. U pravilu, *E*-stereoizomeri imaju veće valne duljine maksimuma apsorbancije od *Z*-stereoizomera i to može dovesti do problema prilikom kvantifikacije HPLC-UV metodom. Osim toga, u reakciji derivatizacije povlašteno je nastajanje *E*-stereoizomera, no uz prisutnosti kiseline ili UV zračenja dolazi do izomerizacije u *Z*-stereoizomere.

2.3.3. DNPH u metodama spektrometrije masa

Razlog što se DNPH manje koristi u metodama spektrometrije masa je loša ionizacija dobivenih hidrazona. Osim toga, fragmentacija molekulskih iona $[M+H]^+$ ili $[M-H]^-$ kolizijskom energijom u metodama spektrometrije masa nije dovoljno specifična da se osigura analiza aldehida i ketona u vrlo niskim koncentracijama i složenim matricama.[16] Fragmentacijom molekulskih iona nastaju nespecifični fragmenti koji potječu uglavnom od reagensa: gubitka nitro-skupina ili pak nastaju pregradnjom reagensa te takvi ioni produkti nisu prikladni za razvoj selektivne i osjetljive LC-MS/MS metode (Shema 3.).



Shema 3. Najčešće fragmentacije karbonil-2,4-DNP-hidrazona

No, unatoč izrazitim nedostatcima, metoda derivatizacije s DNPH uz detekciju spektrometrijom masa i dalje se koristi za određivanje karbonilnih spojeva u različitim matricama.[17-19] Zweiner i suradnici[17] određivali su seriju karbonilnih spojeva koji kao nusprodukti nastaju tijekom dezinfekcije bazenske vode klorom. Derivatizacija uzoraka u otopini provedena je odmah nakon uzorkovanja, a potom je slijedila ekstrakcija nastalih derivata na čvrstoj fazi (SPE, *solid phase extraction*) kojom su se uzorci i dodatno ukoncentrirali. Analiza nastalih hidrazona provedena je upotrebom vezanog sustava LC-MS/MS uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjam (ESI^-). Autori navode kako je praćenjem višestrukih reakcija (*multiple reaction monitoring*, MRM) na opisani način moguće postići granicu detekcije reda veličine μg L^{-1} bez ukoncentriravanja uzorka. Upotrebom ekstrakcije na čvrstoj fazi, autori su povećali osjetljivost 25 do 250 puta. U MS/MS spektrima dominiraju ioni produkti dobiveni fragmentacijom DNPH te takve ione koriste za razvoj MRM metode (*m/z* 163, *m/z* 152, *m/z* 122). S istim problemom susreli su se i Baños i suradnici[18] koji su razvili jednostavnu metodu za određivanje nekoliko aldehida male molekulske mase u urinu. U radu navode novi sustav za kontinuiranu SPE derivatizaciju/ukoncentriravanje. SPE ekstrakcija provedena je na kolonama koje su impregnirane s DNPH. Time su u istom koraku postigli čišćenje, derivatizaciju i ukoncentriravanje aldehida. Nakon eluacije hidrazona acetonitrilom, identifikaciju i kvantifikaciju aldehida proveli su LC-MS/MS tehnikom, također uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjam uz MRM. Kontinuiranom derivatizacijom/ekstrakcijom, detektirali su koncentracije nešto ispod reda veličina μg L^{-1}.

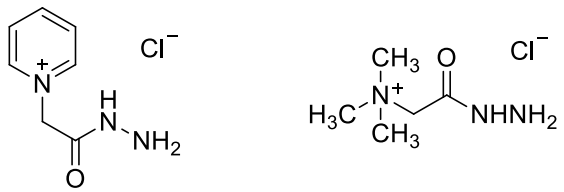
2.3.4. Derivatizacijske metode karbonilnih spojeva za tandemnu spektrometriju masa

Za određivanje aldehida i ketona u složenim matricama i niskim koncentracijama danas se optimalno koriste osjetljive tehnike poput vezanog sustava tekućinska kromatografija-

tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS). Da bi određeni reagens bio prikladan za derivatizaciju karbonilnih spojeva i analizu LC-MS/MS metodom, mora zadovoljiti osnovne zahtjeve, poput nastajanja stabilnih derivata i osiguranja kvantitativnosti derivatizacijske reakcije, ali i zahtjeve specifične za MS analizu. Zahtjevi derivatizacijskog reagensa za korištenje u ESI-MS/MS su sljedeći:[20]

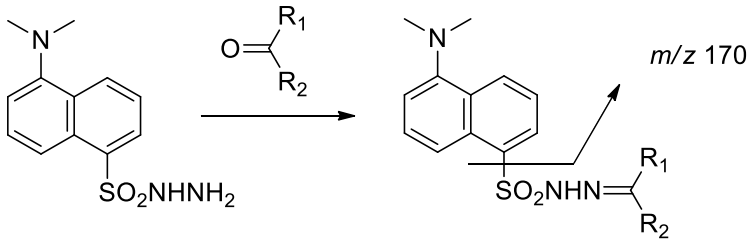
1. Derivatizacijski reagens mora u nastali derivat unijeti skupinu s protonskim afinitetom za pozitivnu ionizaciju (amino-skupine) ili pozitivno nabijenu skupinu. Iako se pozitivna ionizacija preferira, derivatizacijski reagens može u nastali derivat unijeti i skupinu koja se lako deprotonira i tako postaje prikladna za negativnu ionizaciju.
2. Prikladni su umjereno hidrofobni derivatizacijski reagensi, manjih molekulskih masa.
3. Derivatizacijski reagens mora biti takav da daje derivat koja lako fragmentira u koliziji induciranoj disocijaciji (CID) i daje karakteristične i specifične ione produkte.

U literaturi je opisan relativno mali broj derivatizacijskih reagensa koji se koriste za MS/MS tehnike.[16,21-35] Prvu skupinu reagensa čine tkz. konvencionalni reagensi koji unose u molekulu nabijene skupine poput DNPH, hidroksilamina, Girardovog reagensa P [1-(karboksimetil)piridij-hidrazid klorid] ili Girardovog reagensa T [(karboksimetil)trimetil-amonijhidrazid klorid]. Međutim, nastali derivati u CID-u teško fragmentiraju. Hidroksilamin reagira s ketonima i daje odgovarajuće oksime. Kao derivatizacijski reagens koristio se u analizi testosterona,[23] adorenalnih steroida[24] i sukcinilacetona.[25] Dobiveni derivati daju nekoliko iona produkta ovisno o strukturi analita. Giradovi reagensi P i T posjeduju trajni pozitivni naboj (Slika 2.). Girardov reagens P korišten je za derivatizaciju 17-hidroksiprogesterona, markera za kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju.[26] Girardov reagens T korišten je za analizu 5-formil-2'-deoksiuridina.[27] Nastali derivati daju fragment na *m/z* 195 koji nastaje gubitkom trimetilamino-skupine.



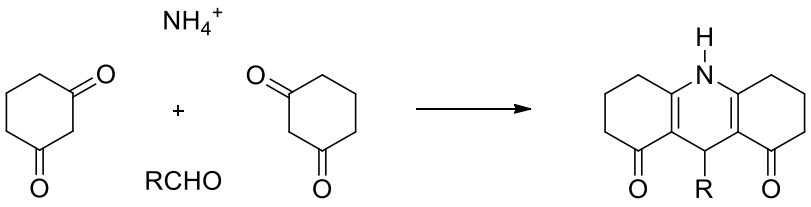
Slika 2. Girardov reagens P (lijevo) i Giradov reagens T (desno)

Drugu skupinu reagensa čine konvencionalni reagensi prikladnih struktura za MS/MS, poput danzil-hidrazina (5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil-hidrazin), 1,4-cikloheksadiona ili D-cisteina. Derivatizacijska reakcija s danzil-hidrazinom korištena je pri analizi malondialdehida[28] i sukcinilacetona.[29] Danzil-skupina prikladna je za MS/MS detekciju jer nastali hidrazoni fragmentiraju na ion produkt *m/z* 170 koji nastaje cijepanjem dimetilaminonaftil-skupine (Shema 4.).

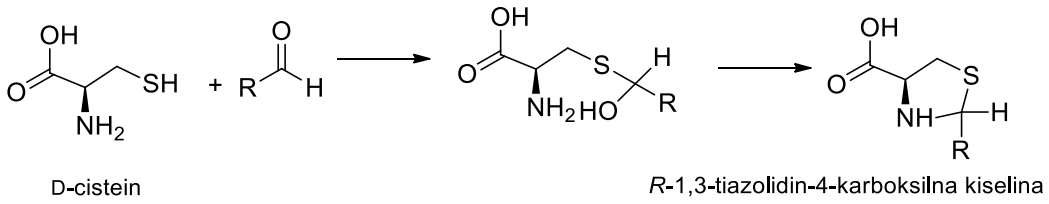


Shema 4. Derivatizacijska reakcija danzil-hidrazina s karbonilima

Cikloheksadion je upotrijebljen za analizu alifatskih aldehida (C3–C10), uključujući 4-hidroksinonenal i nonanal, koji su peroksidacijski produkti masnih kiselina. Aldehidi su derivatizirani s dvije molekule cikloheksandiona u prisutstvu amonijaka u tkz. Hantzschovoj reakciji pri čemu nastaje tricikličkи spoj. Nastali spojevi daju glavni ion produkt *m/z* 216 koji nastaje iz tricikličke strukture[30] (Shema 5.). U ovu skupinu derivatizacijskih reagensa može se uvrstiti i D-cistein koji su koristili Kim i suradnici[31] za derivatizaciju aldehida i njihovo određivanje u napitcima. U derivatizacijskoj reakciji karbonilna skupina aldehida reagira s tiolnom skupinom D-cisteina i tvori stabilan produkt *R*-1,3-tiazolidin-4-karboksilnu kiselinu koja nastaje zatvaranjem tiazolidinskog prstena iz međuprodukta (Shema 6.). Reakcijska reakcija je vrlo jednostavna i lako se provodi u vodi i u alkoholu.



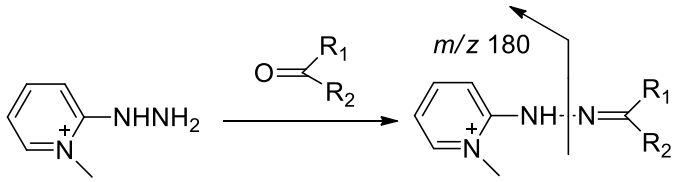
Shema 5. Derivatizacijska reakcija aldehida sa cikloheksandionom



Shema 6. Derivatizacijska reakcija D-cisteina i aldehida

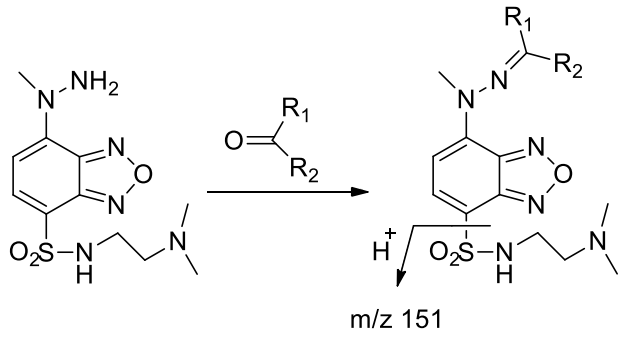
Derivatizacijska reakcija provodi se u uzorku 10 minuta na 50 ºC i pH 7 uz 10-struki suvišak cisteina u odnosu na aldehid. Uzorci su obrađeni bez ekstrakcije i ukoncentriravanja te nakon derivatizacije direktno analizirani na LC-MS/MS. U MRM-u su praćeni fragmentni ioni koji nastaju gubitkom nekoliko skupina molekulskog iona. Na taj način postignute su granice detekcije aldehida od 0,2 do 1,9 g L^{-1} i granice kvantifikacije od 0,7 do 6,0 g L^{-1}, a nađene koncentracije aldehida do 0,552 mg L^{-1}. Metodom nisu derivatizirani ketoni.

Treću skupinu derivatizacijskih reagensa čini mali broj spojeva razvijenih specifično za MS/MS eksperimene, poput 2-hidrazino-1-metilpiridina (HMP) ili {4-[2-(N,N-dimetilamino)etilaminosulfonil]-7-N-metilhidrazino-2,1,3-benzoksadiazola}(DAABD-MHz). HMP ima kvaternu amonijevu skupinu koja olakšava ionizaciju te hidrofobnu aromatsku strukturu. Reagens reagira s karbonilnim spojevima poput ketosteroida na 60 ºC u etanolu unutar 1 h uz 0,5 % trifluoroctenu kiselinu (TFA). Specifičan ion produkt je *m/z* 180 koji nastaje fragmentacijom 1-metilpiridinoamino-skupine (Shema 7.). Korišten je za analizu testosterona u prostatičkom tkivu.[32]



Shema 7. Derivatizacijska reakcija 2-hidrazino-1-metilpiridina

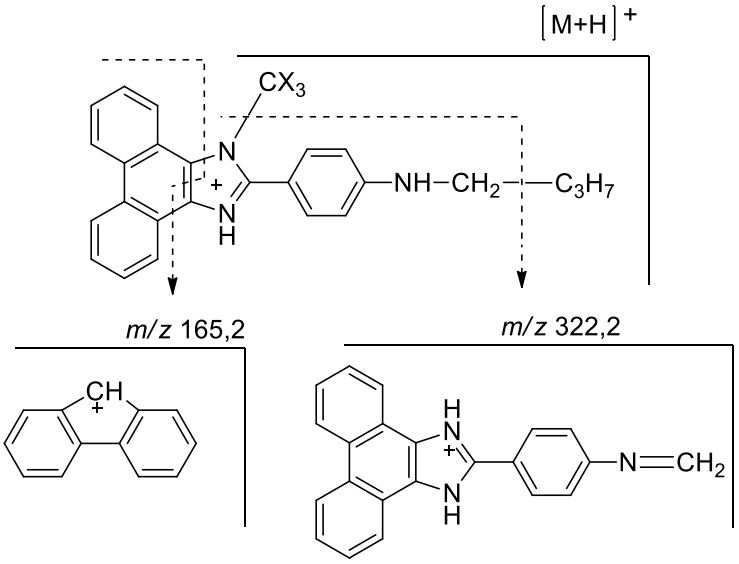
DAABD-MHz {4-[2-(N,N-dimetilamino)etilaminosulfonol]-7-N-metilhidrazino-2,1,3-benzoksadiazol} reagira s aldehidima unutar 10 minuta pri 50 ºC u acetonitrilu koji sadrži 0,5 % TFA. Dobiveni derivati fragmentiraju na dominantni ion produkt *m/z* 151 (Shema 8.) koji dolazi iz (N,N-dimetilamino)etilaminosulfonil-skupine reagensa.[33]



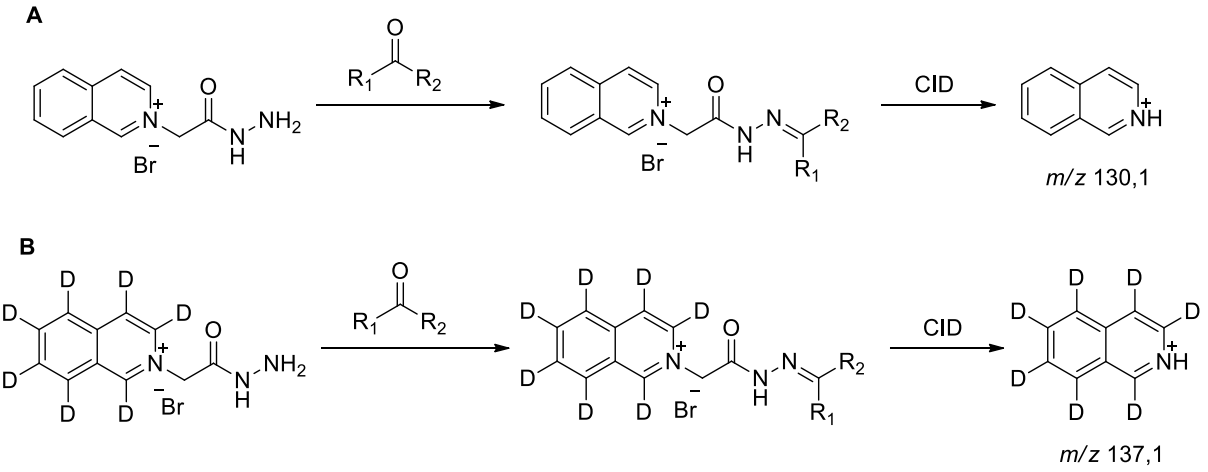
Shema 8. Derivatizacijska reakcija 4-[2-(N,N-dimetilamino)etilaminosulfonol]-7-N-metilhidrazino-2,1,3-benzoksadiazola

U ovoj skupini treba spomenuti i obilježene derivatizacijske reagense koji su se nedavno počeli koristiti kod derivatizacije karbonilnih spojeva. Radi se o spojevima koji se sintetiziraju kao neobilježeni, a zatim se sinteza provede na identičan način, no jedan ili više vodika zamijenjeni se deuterijem. U reakciji s karbonilnim spojem, nastali derivat postaje izotopno obilježen i na taj se način rješava problem nabavke izotopno obilježenih standarda koji su često neophodni za metode spektrometrije masa. Korištenje izotopno obilježenih reagensa u sintetskim reakcijama često je nedostupno zbog visoke cijene takvih reagensa i to je glavni nedostatak ovih metoda. Takav je d_0-4-(1-metil-1*H*-fenantro[9,10-d]imidazol-2-il)fenilamin (d_0-MPIA), odnosno njegov obilježeni analog d_3-4-(1-metil-1*H*-fenantro[9,10-d]imidazol-2-il)fenilamin (d_3-MPIA).[34] Na Shemi 9 naznačene su fragmentacije derivata butanal-MPIA dobivene u MS/MS spektru koje su upotrijebljene za razvoj MRM metode za određivanje aldehida u morskim plodovima. Granice detekcije bile su u rasponu od 0,18-15,9 pg mL^{-1} .

Još jedan primjer takvog reagensa je hidrazinski reagens (2-(2-hidrazinil-2-okooetil)izokvinolin-bromid (HIQB), odnosno njegov d_7-obilježeni analog (d_7-HIQB) (Shema 10.).[35] Kako autori navode, karakteristični ioni produkt *m/z* 130,7 i *m/z* 137,1 potječu od derivatizacijskog reagensa. Pomoću njih detektirali su 156 karbonilnih spojeva u ljudskom serumu.



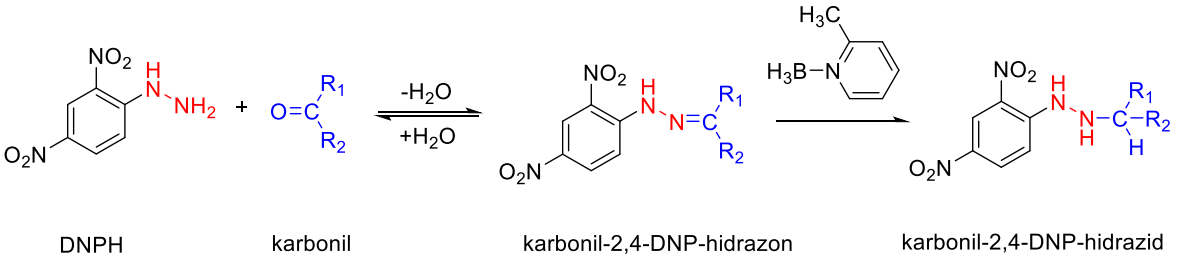
Shema 9. Fragmentacija derivata butanal-MPIA (X=H ili X=D).



Shema 10. Derivatizacijska reakcija karbonilnog spoja i HIQB (A) ili d_7-HIQB (B) te ioni produki nastalih derivata.

2.4. Reduktivna aminacija

Svakako treba spomenuti da ukoliko se kod određivanja karbonilnih spojeva kao derivatizacijski reagens koristi hidrazinski reagens, često se u takvoj derivatizacijskoj reakciji provodi reduktivna aminacija hidrazona u hidrazid. Nekoliko je razloga tome. Ako se kao odabrana metoda koristi HPLC-UV metoda, uz npr. DNPH (Shema 11.), redukcija se provodi zbog izomerizacije hidrazona.[6,36] Zbog prirode dvostruke veze u derivatizacijskoj reakciji nastaju *E*- i *Z*-stereoizomeri i njihov omjer prije svega ovisi o prirodi analita. *E*- i *Z*-stereoizomeri mogu imati različite spektralne karakteristike te različite valne duljine maksimuma apsorbancije. U pravilu, *E*-stereoizomeri imaju veće valne duljine maksimuma apsorbancije od *Z*-stereoizomera i to može dovesti do problema prilikom kvantifikacije.



Shema 11. Reduktivna aminacija karbonil-2,4-DNP-hidrazona uz 2-pikolin-boran

Drugi razlog korištenja reduktivne aminacije u derivatizacijskim reakcijama s hidrazinskim reagensima je taj da ako nastala C=N veza nije stabilizirana delokalizacijom elektrona nastaju hidrolitički nestabilni hidrazonski derivati koje je onda nemoguće određivati tekućinskom kromatografijom.[37] Najčešće korišteni reagensi za redukciju su 2-pikolin-boran,[55] natrij-borhidrid ($NaBH_4$),[56] natrij-cijanoborhidrid ($NaBH_3CN$),[40,41] natrij-triacetoborhidrid ($Na(OAc)_3BH$),[42,43] piridin-boran (pyr-BH_3),[44,45] zink-borhidrid/silikagel ($Zn(BH_4)_2/SiO_2$)[46] i zinkov prah.[47,48]

2.5. Sprega tekućinske kromatografije i spektrometrije masa

Sprega tekućinske kromatografije i spektrometrije masa predstavlja moćnu analitičku tehniku koja kombinira mogućnost separacije tekućinske kromatografije sa specifičnim načinom detekcije spektrometra masa. Tekućinska kromatografija razdvaja komponente uzorka i uvodi ih u spektrometar masa. Spektrometar masa stvara i detektira nabijene ione. Podaci dobiveni navedenom tehnikom mogu se upotrijebiti za dobivanje informacija o molekulskoj masi, strukturi, identifikaciji i kvantifikaciji specifičnih komponenata uzorka. U pregledu literature detaljnije ću opisati rad spektrometra masa koji predstavlja jedan od najboljih detektora za kvantifikaciju analita koji se u složenim uzorcima nalaze u niskim koncentracijama.

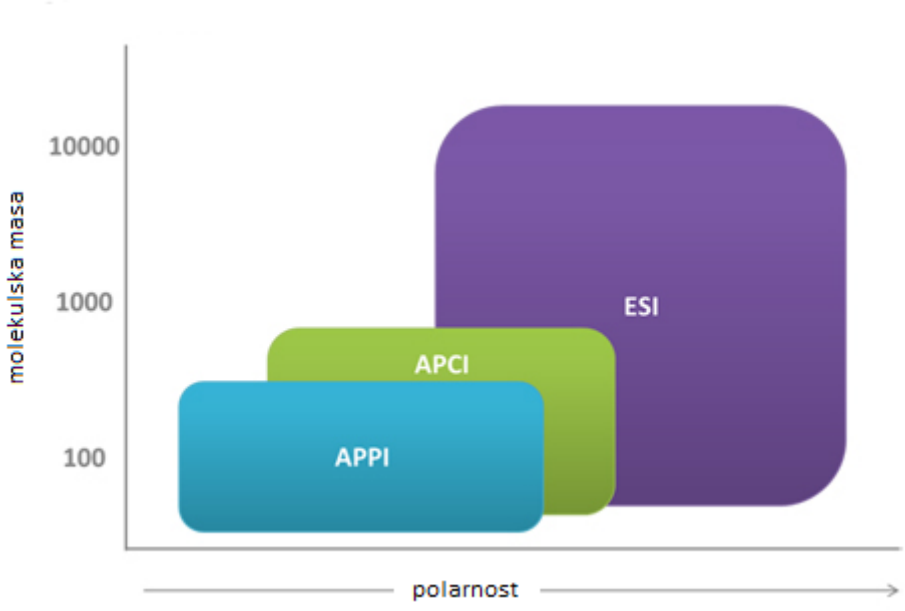
2.6. Tekućinska kromatografija

U matodama spektrometrije masa dominantna metoda je kromatografija obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza rijetko se upotrebljava zbog nekompatibilnosti eluensa s MS sustavom.[49] Kromatografijom obrnutih faza analiziraju se najčešće spojevi polarnijeg karaktera. Kao nepokretne faze koriste se nepolarne alkilne skupine vezane na površinu silikagela (C8- ili C18-kolone), ponekad preinačene s nekim polarnijim skupinama, poput cijano- ili fenilnih skupina. Eluiranje se provodi binarnim polarnim pokretnim fazama prikladnim za MS detektor: jedno otapalo je najčešće voda, a drugo metanol ili acetonitril. Eluiranje je izokratsko ili gradijentno uz što niže protoke čime se povećava osjetljivost analize.[50] Uz ove eluense koriste se i dodaci kao što su octena ili mravlja kiselina kako bi se kiseli spojevi preveli u nedisocirani oblik. Upotrebljava se i trifluoroctena kiselina iako je poznato da ona dovodi do značajne supresije ionizacije[51,52] (efekt površinske napetosti) jer prevodi ione analita u neutralne. Kao puferi mogu se koristiti samo hlapljivi puferi, poput amonijevog acetata i amonijevog formijata; korištenjem pufera nastaje ionski par koji lako disocira prilikom ionizacije.[53,54] Koncentracija pufera mora biti što niža, najbolje do 10 mM.

2.7. Spektrometrija masa

2.7.1. Ionizacija elektroraspršenjem

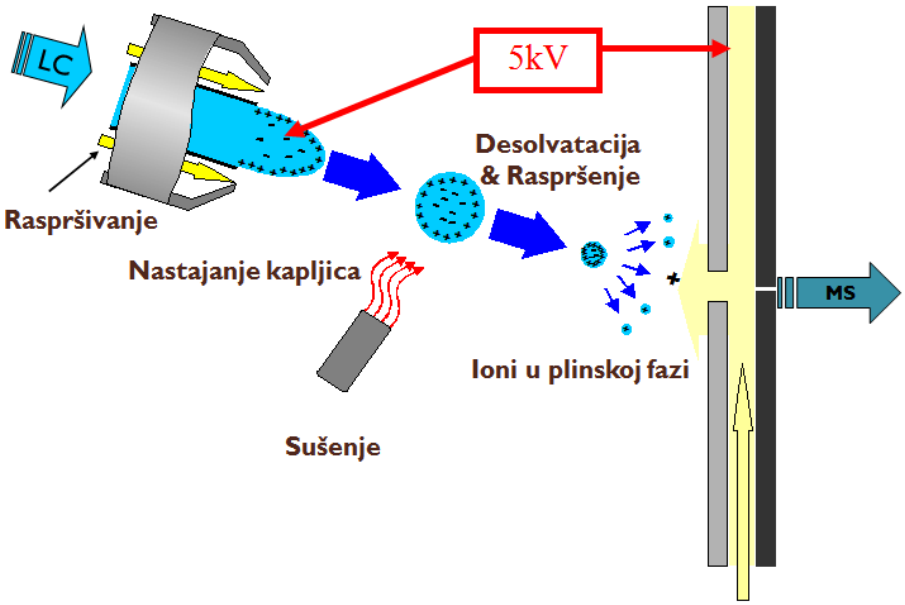
Spektrometrija masa temelji se na produkciji nabijenih iona. Nekoliko je ionizacijskih tehnika, no ionizacija elektroraspršenjem (ESI) najčešće se koristi.[55] Ionizacija elektoraspršenjem je nježna ionizacijska tehnika jer ne uzrokuje raspad nestabilnih analita. Pogodna je za široki raspon spojeva, no preferira se kod onih koji se mogu višestruko nabiti, poput proteina, peptida i oligonukleotida. Time se omogućava analitika spojeva velike molekulske mase koji se kao jednostruko nabijeni ioni ne bi mogli pratiti. Koristi se najčešće za spojeve polarnog karaktera (Slika 3.).[56] ESI je kompatibilna sa svim vrstama analizatora. Nedostaci tehnike vezani su uz pad osjetljivosti pri višim protocima i često visoka supresija ili pojačavanje signala ovisno o prisutstvu drugih komponenta u uzorku (utjecaj matrice) ili pak aditiva koji se koriste u pokretnoj fazi.



Slika 3. Primjena različitih ionizacijskih tehnika

ESI je način ionizacije analita gdje se ionizacija i nebulizacija događaju pri atmosferskom tlaku. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 ºC i događa se u struji dušika.[57] Proces se može podijeliti na nastajanje nabijenih kapljica, smanjenje veličine kapljica i raspršenje (desolvatacija) te nastajanje iona u plinskoj fazi (Slika 4.).[58] U fazi nastajanja nabijenih

kapljica pokretna faza koja nosi analit iz tekućinskog kromatografa prolazi iglom nebulizera koja je smještena u polucilindričnu elektrodu koja je pod visokim naponom. Razlika u potencijalu između igle i elektrode proizvodi jako električno polje koje nabija površinu tekuće faze i na vršku igle formira nabijene kapljice. Kapljice pokretne faze mogu biti nabijene pozitivno ili negativno. U fazi desolvatacije nabijene kapljice privlači kolektorska elektroda i daje im dodatno ubrzanje. Kako otapalo otparava pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala (ioni unutar otapala pokušavaju doći na površinu), tako se kapljice smanjuju. Kada se kapljice toliko smanje da su svi ioni smješteni na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sile napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice. Analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu Nakon otparavanja kapljica, ione u plinskoj fazi privlači visoki vakuum i analizator te ulaze u kapilaru.



Slika 4. Ionizacija elektroraspršenjem

Uz ionizaciju raspršenjem analite je moguće određivati u pozitivnom i negativnom načinu rada. Ako je analit bazičan, poput peptida, u reakciji prijenosa protona dolazi do primanja protona $M+H^+ \rightarrow [M+H]^+$ i analit postaje pozitivno nabijen, uz dobitak 1 Da na *m/z* vrijednosti. S druge strane, kiseli analiti otpuštaju proton reakcijom $MH \rightarrow M^- + H^+$ i postaju negativno nabijeni uz gubitak 1 Da. Kako je već rečeno, spojevi poput proteina mogu se

višestruko nabiti,[59] u pozitivnoj ionizaciji višestruko će se nabiti bazične skupine, u negativnoj kisele. Svaka od tih skupina privuče, odnosno otpusti jedan proton i nastaju ioni $[M+nH]^{n+}$,odnosno $[M-nH]^{n-}$. Neki analiti, poput spojeva bogatim karbonilnim skupinama, lakše vežu natrij ili kalij iz otopine[60,61] (porijeklom iz stakla, vode, reakcijske smjese) nego proton i na taj način nastaju molekulski ioni $[M+Na]^+$, odnosno $[M+K]^+$. Neki analiti su već u otopini nabijeni, npr. kvaterni amini R_4N^+ pa se analiziraju u pozitivnom načinu rada.

2.7.2. Analizatori

Analizator je dio spektrometra masa koji razdavaja ione prema različitom omjeru mase i naboja *(m/z).* U Tablici 1[57] dana je podjela analizatora masa prema vrstama, ionskom izvoru i načinu razdvajanja iona.

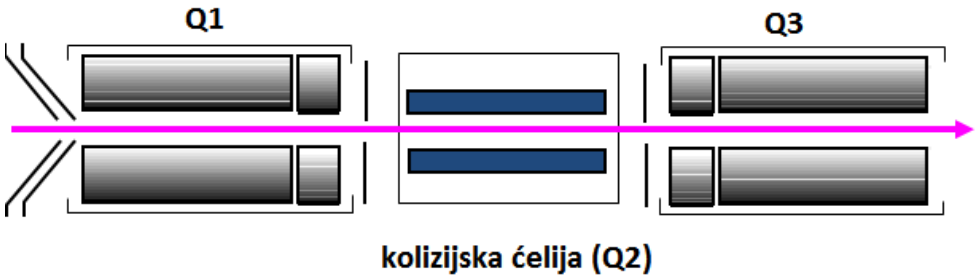
Tablica 1. Podjela analizatora prema vrstama, ionskom izvoru i načinu razdvajanja iona

Analizator masa	Ionski izvor	Način razdvajanja iona
Kvadrupol	Kontinuirani	Električno polje i propusni filtar
Ionska stupica	Pulsni	Napon i rf polje
Analizator koji mjeri vrijeme leta	Pulsni	Vrijeme leta
Sektor	Kontinuirani	Magnetsko polje
Fourierova transformacija	Pulsni	Frekvencija

Kvadrupol je najčešće korišteni analizator koji se sastoji od četri električki dijagonalno povezane elektrode. Jedan par elektroda ima pozitivan, drugi negativan polaritet. Parovi elektroda su spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti *m/z* i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju, mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule. Kvadrupolni analizator može maksimalno razdvojiti ione čija razlika u masi nije veća od 0,5 Da. Ako se kvadrupol koristi kao jedini analizator, gornja granica područja mjerenja masa je oko 4000 Da.[57]

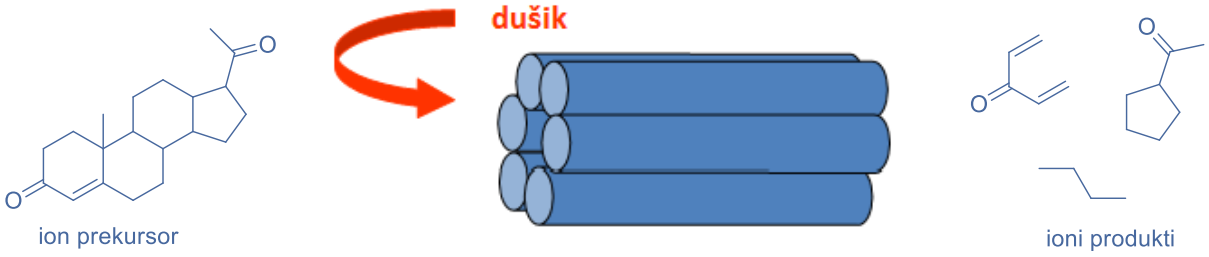
U kvantitativnoj analizi dominatni su spektrometri masa koji kao analizator imaju trostruki kvadrupol (QQQ). Takav analizator sastoji se od dva serijski spojena analizatora Q1

i Q3 (Slika 5.)[62] između kojih se nalazi kolizijska ćelija (Q2). Kolizijska ćelija zapravo predstavlja dodatni kvadrupol, točnije heksapol s tri para elektroda.



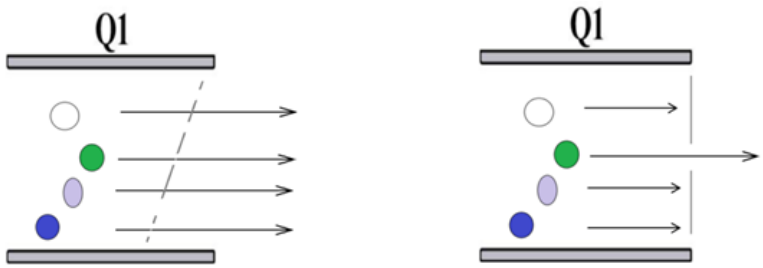
Slika 5. Dijelovi trostrukog kvadrupola

Svaki kvadrupol ima zasebnu funkciju. Q1 skenira zadano *m/z* područje i izdvaja odabrani ion (ion prekursor), Q2 uz odabranu kolizijsku energiju fragmentira odabrani ion u prisutnosti kolizijskog plina (N_2, Ar) u procesu koji se zove kolizijom inducirana disocijacija (CID) (Slika 6.).[63] Disocijacijom nastaju ioni produkti. Q3 kvadrupol prati fragmentne ione (ione produkte) nastale u kolizijskoj ćeliji.



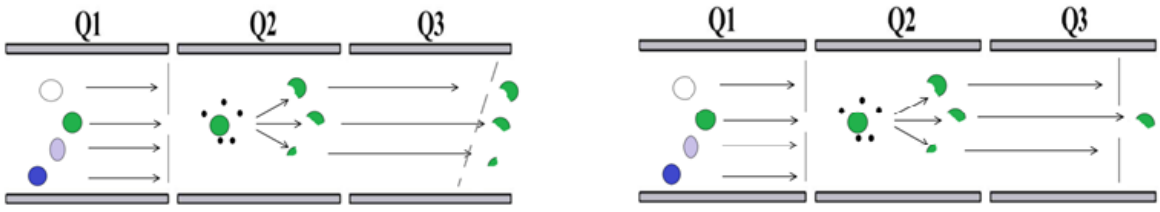
Slika 6. Način rada kolizijske ćelije (Q2)

Na trostrukom kvadrupolu mogu se provesti i MS eksperimenti koji koriste samo prvi kvadrupol, *full scan* i *selected ion monitoring* (SIM) (Slika 7.).[51] U *full scanu* instrument je podešen tako da prvi kvadrupol propušta sve ione u zadanom *m/z* području, dok u SIM-u prvi kvadrupol propušta samo unaprijed određeni ion ili ione.



Slika 7. *Full scan* (lijevo) i SIM način rada (desno)

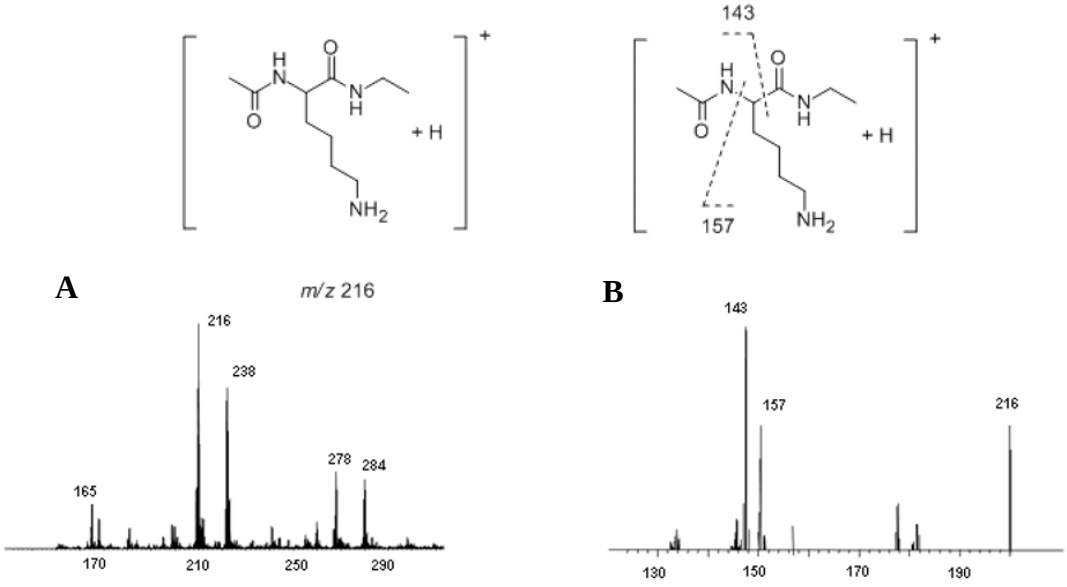
Ovaj način rada ne daje dovoljnu osjetljivost i selektivnost za određivanje traženih analita u niskim koncentracijama i složenim matricama, gdje se može očekivati veliki broj iona istog *m/z*, stoga je za analizu takvih uzoraka potreban način rada koji dovodi u vezu strukturu traženog analita s njegovom molekulskom masom. To se postiže MS/MS eksperimentima zbog kojih su spektrometri masa s trostrukim kvadrupolom kao analizatorom još uvijek među najpopularnijim instrumentima za određivanje analita u tragovima. Velika osjetljivost i selektivnost postiže se praćenjem jednostrukih ili višestrukih reakcija (*selected*/*multiple reaction monitoring* (SRM/MRM). U MS/MS eksperimente ulazi i *product ion scan* način rada (Slika 8.).[64]



Slika 8. *Product ion scan* (lijevo) i SRM način rada (desno)

U *product ion scanu* prvi kvadrupol podešen je tako da propušta samo odabrane *m/z* ione. U kolizijskoj ćeliji dolazi do fragmentacije odabranih iona i svi nastali fragmenti, odnosno ioni produkti prolaze kroz treći kvadrupol do detektora. SRM se razlikuje u tome što se kod fragmentacije odabranog iona u kolizijskoj ćeliji odabire jedan strukturalno specifičan ion produkt (ili više njih za slučaj MRM) te se samo oni propuštaju kroz treći kvadrupol do detektora.[65] Time raste osjetljivost i specifičnost odabrane metode. Potreba za korištenjem

specifičnih fragmenata može se dobro objasniti na primjeru iona *m/z* 216 u sljedećim spektrima (Slika 9.).



Slika 9. MS spektar (A) i MS/MS spektar (B) analita *m/z* 216

Na Slici 9, A prikazuje strukturnu formula analita *m/z* 216 i MS spektar ili ukupnu ionsku struju uzorka u kojoj se očekuje traženi analit. Odabrani ion *m/z* 216 u disocijaciji koja je inducirana optimalnom kolizijskom energijom fragmentira na nekoliko iona produkata i daje MS/MS spektar B. Svaki ion produkt nosi vrlo specifičnu strukturnu informaciju o pojedinom molekulskom ionu. Ioni produkti koji nastaju eliminacijom nespecifičnih skupina, poput vode, halogena ili ugljičnog dioksida, ne predstavljaju dovoljno specifične ione. Na MS/MS spektru na Slici B ističu se dva vrlo specifična iona produkta koji su ujedno i ioni najvećeg intenziteta *m/z* 143 i *m/z* 157 i ti će se ioni kao prijelazi s molekulskim ionom upotrijebiti za razvoj MRM metode i praćenje tog analita, jedan kao kvantifikacijski, a drugi kao potvrdni. Fragmentacijom drugih spojeva iste molekulske mase u složenim uzorcima neće nastati isti ioni produkti jer iako imaju isti *m/z* potječu od strukturno različite molekule.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i metode karakterizacije pripravljenih spojeva

3.1.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u sintezi nabavljene su od različitih proizvođača (Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Acros Organics, Kemika) sa čistoćom većom je od 98 %. Otapala koja su korištena u sintezi spojeva su *p.a.* (*pro analysi*) čistoće, a za pripravu modelnih otopina, kromatografiju i spektrometriju masa *HPLC grade* čistoće. U svim eksperimentima korištena je voda pročišćena MiliQ® sustavom do 18.2 MΩ cm^{-1} (Merck, Milipore).

3.1.2. Spektrometrija masa, osnovni spektri

Osnovni spektri masa i *product ion* spektri korišteni za identifikaciju pripravljenih spojeva snimljeni spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom Agilent 6420 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) uz pozitivnu i/ili negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Uzorci su otopljeni u metanolu, acetonitrilu ili pak smjesi vode i matanola/acetonitrila i injektirani direktno na MS detektor u 50 % MeOH, odnosno 50 % ACN uz 0,1 % FA, protok 0,2 mL min-1. Primijenjena energija ionizacije iznosila je 135,0 V, temperatura plina za sušenje (dušik) 300 ^{o}C, protok 8 L min^{-1}, tlak nebulizatora 30 psi, napon na kapilari 4,0 kV, a napon na detektoru (Delta EMV) 400 V. *Product ion* spektri dobiveni su fragmentacijom molekulskog iona $[M+H]^+$ i/ili $[M-H]^-$ uz korištenje optimalne kolizijske energije kako bi se dobio optimalni intenzitet molekulskog iona i iona produkata. Kao kolizijski plin korišten je dušik čistoće 99,999 %. Rezultati su prikazani kao ovisnost relativnog intenziteta izražena u postocima i omjera mase/naboja (*m/z*). Snimanja i obrada podataka provedeni su u Agilent MassHunter software.

HRMS analiza uzoraka je provedena na instrumentu MALDI TOF/TOF 4800 Plus analyzer.

3.1.3. NMR eksperimenti

NMR spektri snimljeni su na Bruker 600 spektrometru, pri frekvencijama 600,13 MHz (^{1}H) i 300,13 MHz (^{13}C) te na Bruker 300 spektrometru pri frekvencijama 150,92 (^{1}H) i 75,47 MHz (^{13}C). Spektri su snimljeni u CD_3CN, DMSO-d_6 ili $CDCl_3$ pri sobnoj temperaturi. Kemijski su

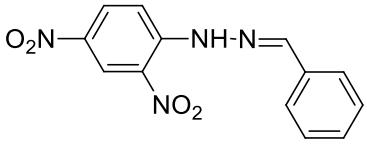
pomaci izraženi u ppm jedinicama u relativnom odnosu prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutarnjem standardu. Spektri su asignirani na temelju 1D (^{1}H i APT) eksperimenata.

3.2. Priprava karbonil-2,4-DNP-hidrazona

3.2.1. Opći sintetski protokol

DNPH (100 mg, 0,51 mmol) otopljen je u smjesi dobivenoj miješanjem 0,5 mL H_2SO4, 0,7 mL H_2O i 2,5 mL EtOH. Smjesi je dodan odabrani karbonilni spoj ($7{,}7 \cdot 10^{-4}$ mol) kao 10 % otopina u EtOH (50 % molarni suvišak). Produkt je istaložio odmah po dodatku karbonilnog spoja. Reakcijska smjesa ostavljena je na miješanju pola sata na sobnoj temperaturi. Talog je profiltriran, ispran s 5 % vodenom otopinom $NaHCO_3$ do prestanka razvijanja CO_2. Višak bikarbonata uklonjen je ispiranjem s destiliranom vodom.

*3.2.2. Priprava benzaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6a**)*



$M(C_{13}H_{10}N_4O_4)$ = 286,25 gmol^{-1}

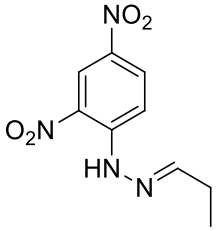
$[M+H]^+$ *m/z* 287,2; $[M+Na]^+$ *m/z* 309,2; $[M-H]^-$ *m/z* 284,9.

Prinos: 81,5 mg (η = 56 %) produkta u obliku narančastog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 7,49 (dd, 3H, $C_{3,4,5}H$ benzaldehid), 7,83 (dd, 2H, C_6H 2,4-DNPH i C_2H benzaldehid), 8,14 (d, 1H, CH benzaldehid), 8,36 (dd, 2H, C_5H 2,4-DNPH i C_6H benzaldehid), 8,99 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 11,23 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 116,6 (C_6H 2,4-DNPH), 117,3 (C_2H 2,4-DNPH), 123,1 (C_3H 2,4-DNPH), 127,4 ($C_{3,5}H$ benzaldehid), 129,0 ($C_{2,6}H$ benzaldehid), 129,9 (C_5H 2,4-DNPH), 130,7 (C_4H benzaldehid), 148,9 (CH benzaldehid).

*3.2.3. Priprava propanal-2,4-DNP-hidrazona (**6b**)*



$M(C_9H_{10}N_4O_4)$ = 238,20 g mol^{-1}

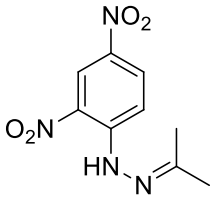
$[M+H]^+$ *m/z* 239,4; $[M+Na]^+$ *m/z* 261,4; $[M-H]^-$ *m/z* 238,2.

Prinos: 60 mg (η = 49 %) produkta u obliku tamno žutog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 1,16 (t, 3H, CH_3 propanal), 2,35-2,47 (m, 2H, CH_2 propanal), 7,73 (t, 1H, CH propanal), 7,89 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,27 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,94 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 10,85 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 9,6 (CH_3 propanal), 25,6 (CH_2 propanal), 116,1 (C_6H 2,4-DNPH), 117,4 (C_2H 2,4-DNPH), 123,2 (C_3H 2,4-DNPH), 129,8 (C_5H 2,4-DNPH), 145,6 (C_4H 2,4-DNPH), 153,4 (C_1H 2,4-DNPH), 155,2 (CH propanal).

*3.2.4. Priprava aceton-2,4-DNP-hidrazona (**6c**)*



$M(C_9H_{10}N_4O_4)$ = 238,20 g mol^{-1}

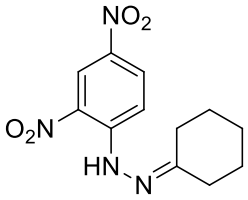
$[M+H]^+$ *m/z* 239,4; $[M+Na]^+$ *m/z* 261,4; $[M-H]^-$ *m/z* 236,9.

Prinos: 88 mg (η = 72 %) produkta u obliku tamno žutog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 2,06 (s, 3H, CH_3 aceton), 2,13 (s, 3H, CH_3 aceton), 7,88 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,28 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,95 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 10,86 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 16,2 (CH_3 aceton), 24,48 (CH_3 aceton), 115,9 (C_6H 2,4-DNPH), 117,4 (C_2H 2,4-DNPH), 123,2 (C_3H 2,4-DNPH), 130,0 (C_5H 2,4-DNPH), 145,1 (C_4H 2,4-DNPH), 156,6 (C aceton).

*3.2.5. Priprava cikloheksanon-2,4-DNP-hidrazona (**6d**)*



$M(C_{12}H_{14}N_4O_4)$ = 278,10 g mol^{-1}

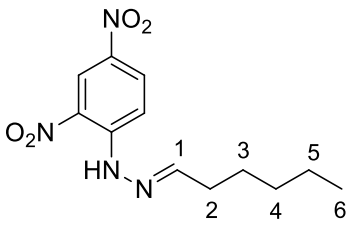
$[M+H]^+$ *m/z* 279,1; $[M+Na]^+$ *m/z* 301,1; $[M-H]^-$ *m/z* 277,0.

Prinos: 127,5 mg (η = 91 %) produkta u obliku žutog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 1,63-1,70 (m, 2H, C_4H_2 cikloheksanon), 1,70-1,77 (m, 2H, $C_{3,5}H_2$ cikloheksanon), 2,46 (dt, 2H, $C_{2,6}H_2$ cikloheksanon) 7,89 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,27 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,94 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 11,02 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 25,2 (C_4H_2 cikloheksanon), 25,7 (C_6H_2 cikloheksanon) 27,0 ($C_{3,5}H_2$ cikloheksanon), 35,2 (C_2H_2 cikloheksanon), 116,2 (C_6H 2,4-DNPH), 117,1 (C_2H 2,4-DNPH), 123,3 (C_3H 2,4-DNPH), 130,0 (C_5H 2,4-DNPH), 145,5 (C_4H 2,4-DNPH), 162,8 (C cikloheksanon).

*3.2.6. Priprava heksanal-2,4-DNP-hidrazona (**6e**)*



$M(C_{12}H_{16}N_4O_4)$ = 280,28 g mol^{-1}

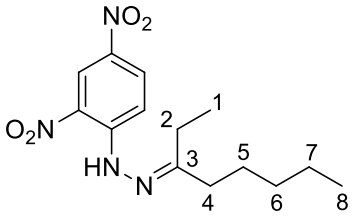
$[M+H]^+$ *m/z* 281,2; $[M+Na]^+$ *m/z* 303,2; $[M-H]^-$ *m/z* 278,9.

Prinos: 117 mg (η = 82 %) produkta u obliku žutog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 0,90-0,96 (m, 3H, CH_3 heksanal), 1,32-1,42 (m, 4H, C_2H_2 i C_3H_2 heksanal), 1,55-1,63 (m, 2H, C_4H_2 heksanal), 2,38 (dt, 2H, C_5H_2 heksanal), 7,68 (t, 1H, C_1H heksanal), 7, 86 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,27 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,93 (dd, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 10,89 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 13,3 (CH_3 heksanal), 22,0 i 22,1 (C_2H_2 heksanal), 25,1 i 25,2 (C_4H_2 heksanal), 31,0 i 31,19 (C_5H_2 heksanal), 32,1 (C_3H_2 heksanal), 116,0 (C_6H 2,4-DNPH), 117,4 (C_2H 2,4-DNPH), 123,0 (C_3H 2,4-DNPH), 129,0 (C_5H 2,4-DNPH), 145,2 (C_4H 2,4-DNPH), 152,3 (C_1H 2,4-DNPH), 154,3 (C_1H heksanal). Dvostruki signali upućuju na izomerizaciju.

*3.2.7. Priprava 3-oktanon-2,4-DNP-hidrazona (**6f**)*



$M(C_{14}H_{20}N_4O_4)$ = 308,33 g mol^{-1}

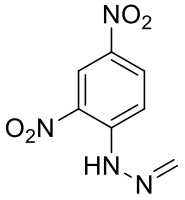
$[M+H]^+$ *m/z* 309,3; $[M+Na]^+$ *m/z* 331,3; $[M-H]^-$ *m/z* 307,3.

Prinos: 78 mg (η = 49 %) produkta u obliku narančastog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 0,93 (dt, 3H, C_1H_3 3-oktanon), 1,19 (dt, 3H, C_8H_3 3-oktanon), 1,33-1,47 (m, 4H, C_2H_2 i C_4H_2 3-oktanon), 1,58-1,72 (m, 2H, C_5H_2 3-oktanon), 2,38-2,49 (m, 4H, C_6H_2 i C_7H_2 3-oktanon), 7,93 (dd, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,28 (dt, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,98 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 11,07 (d 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 8,7 i 9,8 (C_1H_3 3-oktanon), 13,8 i 13,4 (C_8H_3 3-oktanon), 22,0 i 22,2 (C_2H_2 3-oktanon), 23,0 (C_7H_2 3-oktanon), 25,6 i 25,5 (C_5H_2 3-oktanon), 30,0 i 30,3 (C_4H_2 3-oktanon), 31,3 i 31,8 (C_3H_2 3-oktanon), 116,0 (C_6H 2,4-DNPH), 117,2 (C_2H 2,4-DNPH), 123,3 (C_3H 2,4-DNPH), 130,2 (C_5H 2,4-DNPH), 145,4 (C_4H 2,4-DNPH), 163,8 (C_3 3-oktanon). Dvostruki signali upućuju na izomerizaciju.

*3.2.8. Priprava formaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6g**)*



$M(C_7H_6N_4O_4)$ = 210,15 g mol^{-1}

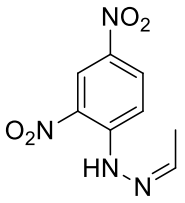
$[M+H]^+$ *m/z* 211,3; $[M+Na]^+$ *m/z* 233,3; $[M-H]^-$ *m/z* 209,1.

Prinos: 86 mg (η = 80 %) produkta u obliku žutog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 7,29 (dd, 2H, CH_2 formaldehida), 7,90 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,28 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,95 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 11,01 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 116,3 (C_6H 2,4-DNPH), 117,3 (C_2H 2,4-DNPH), 122,9 (C_3H 2,4-DNPH), 129,9 (C_5H 2,4-DNPH), 145,3 (C_4H 2,4-DNPH).

*3.2.9. Priprava acetaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6h**)*



$M(C_8H_8N_4O_4)$ = 224,17 g mol^{-1}

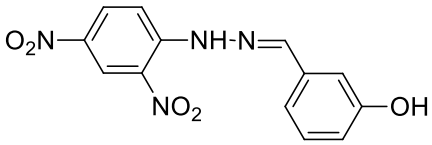
$[M+H]^+$ *m/z* 225,1; $[M+Na]^+$ *m/z* 247,1; $[M-H]^-$ *m/z* 224,1.

Prinos: 67 mg (η = 59 %) produkta u obliku žutog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 2,04 (dd, 3H, CH_3 acetaldehida), 7,70 (q, 3H, CH acetaldehida), 7,88 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,29 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,94 (dd, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 10,891 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 17,8 (CH_3 acetaldehid), 116,1 (C_6H 2,4-DNPH), 117,4 (C_2H 2,4-DNPH), 123,2 (C_3H 2,4-DNPH), 129,5 (C_5H 2,4-DNPH), 145,3 (C_4H 2,4-DNPH), 147,4 (C_1H 2,4-DNPH), 150,5 (CH acetaldehid).

*3.2.10. Priprava 3-OH-benzaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6i**)*



$M(C_{13}H_{10}N_4O_5)$ = 302,27 g mol^{-1}

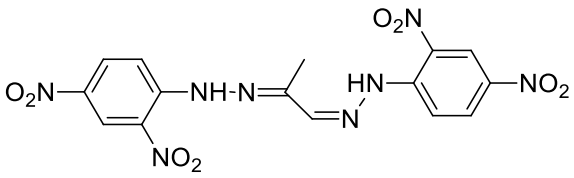
$[M+Na]^+$ *m/z* 325,1; $[M-H]^-$ *m/z* 300,9.

Prinos: 118 mg (η = 76 %) produkta u obliku narančastog praha.

^{1}H-NMR (CD_3CN): δ = 6,98 (d, 1H, OH benzaldehid), 7,27 (dd, 3H, $C_{4,5,6}$H 3-OH-benzaldehid), 7,32 (t, 1H, C_1H 3-OH-benzaldehid), 8,12 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH), 8,29 (s, 1H, CH 3-OH benzaldehid), 8,34 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH), 8,99 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH), 11,21 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH).

^{13}C-NMR (CD_3CN): δ = 113,3 (C_2H 3-OH-benzaldehid), 116,6 (C_6H 2,4-DNPH), 117,3 (C_2H 2,4-DNPH), 117,9 (C_4H 3-OH-benzaldehid), 119,7 (C_6H 3-OH-benzaldehid), 123,1 (C_3H 2,4-DNPH), 129,9 (C_5H 2,4-DNPH), 130,2 (C_5H 3-OH-benzaldehid), 135,3 (C_1H 3-OH-benzaldehid), 145,0 (C_4H 2,4-DNPH), 148,8 (CH 3-OH-benzaldehid), 157,3 (C_2H 3-OH-benzaldehid).

*3.2.11. Priprava metilglioksal-2,4-DNP-hidrazona (**6j**)*



$M(C_{15}H_{12}N_8O_8)$ = 432,30 g mol^{-1}

$[M-H]^+$ (jedna karbonilna skupina derivatizirana) *m/z* 251,1, $[M-H]^+$ (obje karbonilne skupine derivatizirane) *m/z* 431,1.

Prinos: 185 mg (η = 42 %) produkta u obliku narančastog praha.

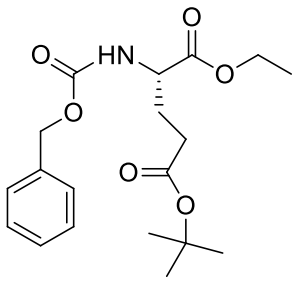
^{1}H-NMR (d_6-DMSO): δ = 2,31 (s, 3H, CH_3 metilglioksal) 7,98 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH 1), 8,02 (d, 1H, C_6H 2,4-DNPH 2), 8,38 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH 1), 8,41 (s, 1H, CH

metilglioksal), 8,38 (dd, 1H, C_5H 2,4-DNPH 2), 8,85 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH 1), 8,89 (d, 1H, C_3H 2,4-DNPH 2) 11,06 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH 1), 11,62 (br s, 1H, NH 2,4-DNPH 2).
^{13}C-NMR (d_6-DMSO): δ = 10,8 (CH_3 metilglioksal), 117,0 (C_6H 2,4-DNPH 1 i 2), 117,5 (C_2H 2,4-DNPH 1 i 2), 123,0 (C_3H 2,4-DNPH 1), 123,0 (C_3H 2,4-DNPH 2), 130,0 (C_5H 2,4-DNPH 1), 130,6 (C_5H 2,4-DNPH 2) 144,2 (C_4H 2,4-DNPH 1), 144,4 (C_4H 2,4-DNPH 1), 148,5 (C metilglioksal), 152,0 (C_1H 2,4-DNPH 1 i 2), 156,7 (C metilglioksal).

3.3. Priprema hidrazino-derivata glutaminske kiseline kao derivatizacijskog reagensa

*3.3.1. Priprava Z-Glu(OtBu)-OEt (**2**)*

Z-Glu(OtBu)-OH (**1**) (500 mg, 1,4 mmol), (benenzotriazol-1-il-oksi)tris(dimetilamino)fosfonij-heksafluorofosfat (BOP) (758 mg, 1,7 mmol) i hidroksibenzotriazol (HOBt) (193 mg, 1,7 mmol) otopljeni su u suhom dimetilformamidu (DMF) (2 mL) pri 0 °C. Zatim je dodan *N*-metilmorfolin (NMM) (166 μL, 1,54 mmol) i apsolutni EtOH (30 mL). Reakcijska smjesa je u suhoj atmosferi ostavljena na miješanju preko noći. Produkt **2** (Slika 10.) je očišćen kromatografijom na koloni silikagela u smjesi otapala petroleter-EtOAc-octena kiselina 5:5:0,5.



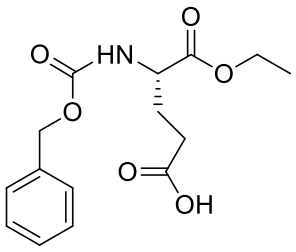
Slika 10. Strukturna formula Z-Glu(OtBu)-OEt (**2**)

M($C_{19}H_{27}NO_2$) = 365,42 g mol^{-1}
[M+Na]$^+$ *m/z* 366,1; [M+Na-tBu]$^+$ *m/z* 266,1.
Prinos: 249 mg (η = 49 %) produkta u obliku žutog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,17-1,30 (m, 3H, CH_3 ester), 1,43 (s, 9H, CH_3 Boc), 1,82 i 1,97 (dd, 2H, β-CH_2), 2,25-2,38 (m, 2H, γ-CH_2), 4,23 (dd, 2H CH_2 ester) 4,50 (dd, 1H, α-CH), 5,11 (s, 2H, CH_2 Z), 5,39 (d, 1H, NH), 7,28-7,40 (m, 5H, $CH_{1\text{-}5}$ Z).
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,3 (CH_3 ester), 27,9 (β-CH_2), 28,2 (CH_3 tBu), 31,6 (γ-CH_2), 53,7 (α-CH), 61,8 (CH_2 ester), 67,2 (CH_2 Z), 81,0 (C tBu), 128,2 ($C_{2,6}$H Z), 128,3 ($C_{3,5}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 136,4 (C Z), 156,0 (CO Z), 172,1 (CO bočni lanac Glu).

*3.3.2. Priprava Z-Glu-OEt (**3**)*

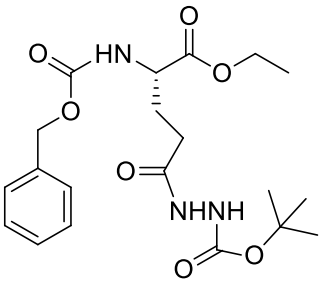
tBu-zaštitna skupina uklonjena je dodatkom 3 mL 90 % TFA. Reakcijska smjesa miješana je 1 h, a nastajanje produkta praćeno je tankoslojnom kromatografijom. Dobiveno je 225 mg produkta (**3**) (Slika 11.) u obliku žutog ulja koji je korišten u narednom sintetskom koraku bez daljnje obrade.



Slika 11. Strukturna formula Z-Glu-OEt (**3**)

*3.3.3. Priprava Z-Glu(NHNHBoc)-OEt (**4**)*

Z-Glu-OEt (**3)** (214 mg, 0,67 mmol) je otopljen u 5 mL apsolutnog DMF. Reakcijska smjesa je u suhoj atmosferi stavljena na miješanje pri 0° C. U smjesu je dodan *N*-metilmorfolin (NMM) (161 μL, 1,47 mmol), (benenzotriazol-1-il-oksi)tris(dimetilamino)fosfonij-heksafluorofosfat (BOP) (361 mg, 0,81 mmol) i hidroksibenzotriazol (HOBt) (91 mg, 0,81 mmol). Nakon kraćeg miješanja u smjesu je dodan i Boc-$NHNH_2$ (97 mg, 0,74 mmol). Reakcijska smjesa ostavljena je u suhoj atmosferi na miješanju preko noći. Produkt **4** (Slika 12.) je očišćen kromatografijom na koloni silikagela u smjesi otapala petroleter-EtOAc-octena kiselina 5:7:0,5.



Slika 12. Strukturna formula Z-Glu-(NHNHBoc)-OEt (**4**)

$M(C_{20}H_{29}N_3O_7)$ = 423,20 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 424,1; $[M+H\text{-Boc}]^+$ *m/z* 324,1.

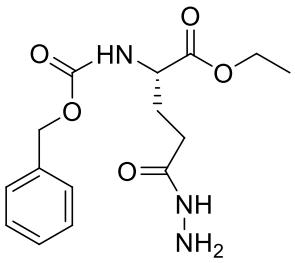
Prinos: 153 mg (η = 53 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ = 1,21-1,31 (m, 3H, CH_3 ester), 1,43 (s, 9H, CH_3 Boc), 1,81 i 1,98 (dd, 2H, β-CH_2), 2,18 (t, 2H, γ-CH_2), 4,0-4,15 (m, 3H, CH_2 ester i α-CH), 5,05 (d, 2H, CH_2 Z), 7,25-7,42 (m, 5H, $CH_{1\text{-}5}$ Z), 7,70 (d, 1H, NH), 8,66 (s, 1H, NH hidrazino), 9,50 (s, 1H, NH-Boc).

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): δ = 14,0 (CH_3 ester), 26,3 (β-CH_2), 28,0 (CH_3 Boc), 29,4 (γ-CH_2), 53,5 (α-CH), 60,5 (CH_2 ester), 65,4 (CH_2 Z), 79,0 (C Boc), 127,7 ($C_{2,6}$H Z), 127,8 ($C_{3,5}$H Z), 128,3 (C_4H Z), 136,9 (C Z), 155,2 (CO Z), 156,1 (CO Boc), 170,8 (CO glavi lanac Glu), 172,0 (CO bočni lanac Glu).

*3.3.4. Priprava Z-Glu(NHNH2)-OEt (**5**)*

Boc-zaštitna skupina uklonjena je dodatkom 3 mL 90 % TFA. Reakcijska smjesa miješana je 1h, a nastajanje produkta praćeno je tankoslojnom kromatografijom. Dobiveno je 170 mg produkta **5** (Slika 13.) u obliku žutog ulja.



Slika 13. Strukturna formula Z-Glu($NHNH_2$)-OEt (**5**)

$M(C_{20}H_{29}N_3O_7)$ = 323,15 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 324,1; $[M+Na]^+$ *m/z* 346,1.

HRMS: $[M+H]^+$ *m/z* 324.1557.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,16-1,27 (m, 3H, CH_3 ester), 2,01 i 2,23 (dd, 2H, β-CH_2), 2,33 (d, 2H, NH_2), 2,41 (t, 2H, γ-CH_2), 4,20 (s, 2H, CH_2 ester), 4,37 (d, 1H, α-CH), 5,10 (d, 2H, CH_2 Z), 5,39 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,10-7,28 (m, 5H, CH_{1-5} Z).

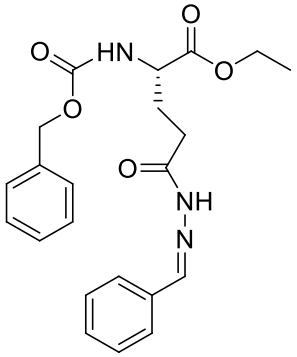
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,2 (CH_3 ester), 27,9 (β-CH_2), 29,7 (γ-CH_2), 53,3 (α-CH), 62,2 (CH_2 ester), 67,5 (CH_2 Z), 128,3 ($C_{2,6}$H Z), 128,5 ($C_{3,5}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 136,0 (C Z), 156,8 (CO Z), 171,8 (CO glavi lanac Glu), 175,2 (CO bočni lanac Glu).

3.4. Priprema hidrazona glutaminske kiseline i odabranih karbonilnih spojeva

3.4.1. Opći sintetski protokol

Spoj **5** otopljen je u smjesi dobivenoj miješanjem 2 mL octene kiseline i 2 mL MeOH. U reakcijsku smjesu dodan je karbonilni spoj (3 ekvivalenata manje) i reakcijska smjesa ostavljena je na miješanju preko noći. Produkti su otopljeni u CH_2Cl_2 ili EtOAc, a potom istaloženi hladnim heksanom u obliku bijelog praha. Derivati su okarakterizirani spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

*3.4.2. Priprava benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**)*



$M(C_{22}H_{25}N_3O_5)$ = 411,18 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 412,1; $[M+H\text{-}OCH_2CH_3]^+$ *m/z* 368,2; $[2M+H]^+$ *m/z* 823,3; $[2M+Na]^+$ *m/z* 845,3.

Očišćeno kromatografijom na kratkoj koloni silikagela u smjesi otapala CH_2Cl_2-MeOH 8:2 (R_f =0,8).

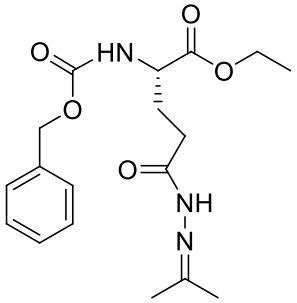
HRMS: $[M+H]^+$ *m/z* 412.1873.

Prinos: 55 mg (η = 50 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,18-1,32 (m, 3H, CH_3 ester), 2,14 i 2,31 (dd, 2H, β-CH_2), 2,76-2,98 (m, 2H, γ-CH_2), 4,21 (d, 2H, CH_2 ester), 4,34-4,51 (m, 1H, α-CH), 5,12 (d, 2H, CH_2 Z), 5,65 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,27-7,68 (10H, $CH_{1\text{-}5}$ Z i $CH_{1\text{-}5}$ benzaldehid), 7,70 (s, 1H, NH hidrazon) 9,20 (s, 1H, CH benzaldehid).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,3 (CH_3 ester), 27,2 (β-CH_2), 29,4 (γ-CH_2), 53,9 (α-CH), 61,7 (CH_2 ester), 67,1 (CH_2 Z), 127,3 ($C_{2,6}$H Z), 127,9 (C_4H Z), 128,2-128,9 ($C_{3,5}$H Z i $C_{2\text{-}6}$H benzaldehid), 130,2 (C_4H benzaldehid), 133,7 (C benzaldehid), 137,6 (C Z), 143,9 (CH benzaldehid), 156,1 (CO Z), 172,3 (CO glavi lanac Glu), 174,7 (CO bočni lanac Glu).

*3.4.3. Priprava aceton-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5b**)*



$M(C_{18}H_{25}N_3O_5)$ = 363,41 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 364,2; $[M+Na]^+$ *m/z* 386,2 $[M+H\text{-}OCH_2CH_3]^+$ *m/z* 320,2.

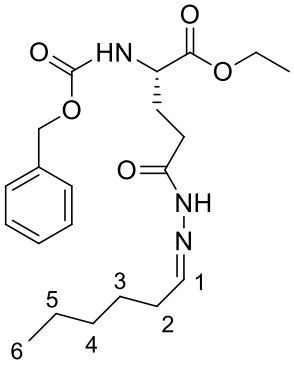
Očišćeno kromatografijom na kratkoj koloni silikagela u smjesi otapala CH_2Cl_2-MeOH 8:2 (Rf = 0,8).

Prinos: 30 mg (η = 33 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,20-1,37 (m, 9H, CH_3 ester, CH_3 aceton), 2,13 i 2,41 (dd, 2H, β-CH_2), 2,64-2,91 (m, 2H, γ-CH_2), 4,20 (d, 2H, CH_2 ester), 4,28-4,52 (m, 1H, α-CH), 5,08 (d, 2H, CH_2 Z), 5,65 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,28-7,40 (5H, $CH_{1\text{-}5}$ Z), 7,7 (s, 1H, NH hidrazon).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,3 (CH_3 ester), 16,1 (CH_3 aceton), 25,5 (CH_3 aceton), 28,9 (β-CH_2), 30,6 (γ-CH_2), 53,4 (α-CH), 62,0 (CH_2 ester), 67,7 (CH_2 Z), 128,3 ($C_{2,6}$H Z), 128,5 ($C_{3,5}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 136,3 (C Z), 153,6 (CO Z), 169,8 (CO glavi lanac Glu), 171,9 (CO bočni lanac Glu.

*3.4.4. Priprava heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5c**)*



$M(C_{21}H_{31}N_3O_5)$ = 405,23 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 406,3; $[M+Na]^+$ *m/z* 428,3 $[M+H-OCH_2CH_3]^+$ *m/z* 362,3.

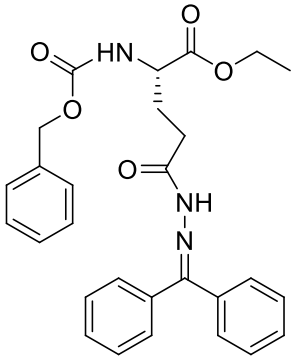
Očišćeno kromatografijom na kratkoj koloni silikagela u smjesi otapala CH_2Cl_2-EtOH 20:1 (R_f = 0,75).

Prinos: 49 mg (η = 48 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0,9 (t, 3H, C_6H_3 heksanal), 1,19-1,30 (m, 3H, CH_3 ester), 1-29-1,37 i 1,46-1,56 (m, $C_{2\text{-}5}H_2$ heksanal, 8H), 1,99 i 2,27 (dd, 2H, β-CH_2), 2,16-2,25 (m, 2H, γ-CH_2), 4,20 (d, 2H, CH_2 ester), 4,36 (dd, 1H, α-CH), 5,13 (d, 2H, CH_2 Z), 5,65 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,06 (t, 1H, C_1H heksanal), 7,28-7,42 (5H, $CH_{1\text{-}5}$ Z), 8,74 (s, 1H, NH hidrazon).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 13,4 i 13,6 (C_6H_3 heksanal i CH_3 ester), 21,9 (C_5H_2 heksanal), 22,6 (C_2H_2 heksanal), 26,3 (C_4H_2 heksanal), 28,2 (β-CH_2), 30,8 (C_3H_2 heksanal) 31,8 (γ-CH_2), 53,3 (α-CH), 61,0 (CH_2 ester), 66,4 (CH_2 Z), 127,5 ($C_{2,6}H$ Z), 127,6 ($C_{3,5}H$ Z), 128,0 (C_4H Z), 135,9 (C Z), 151,5 (C_1H heksanal), 155,5 (CO Z), 172,0 (CO glavi lanac Glu), 173,5 (CO bočni lanac Glu).

*3.4.5. Priprava benzofenon-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5d**)*



$M(C_{29}H_{29}N_3O_5)$ = 487,55 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 488,2; $[2M+H]^+$ *m/z* 975,3.

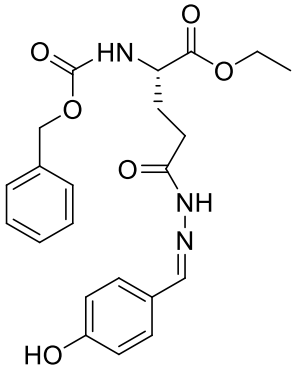
Očišćeno kromatografijom na kratkoj koloni silikagela u smjesi otapala CH_2Cl_2-MeOH 30:1 (R_f =0,6).

Prinos: 9 mg (η = 12 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,20-1,34 (m, 3H, CH_3 ester), 2,14 i 2,32 (dd, 2H, β-CH_2), 2,83-3,09 (m, 2H, γ-CH_2), 4,22 (dd, 2H, CH_2 ester), 4,46 (dd, 1H, α-CH), 5,07 (d, 2H, CH_2 Z), 5,63 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,15-7,72 (15H, $CH_{1\text{-}5}$ Z i benzofenon), 8,36 (s, 1H, NH hidrazon).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,3 (CH_3 ester), 27,2 (β-CH_2), 29,2 (γ-CH_2), 54,0 (α-CH), 61,7 (CH_2 ester), 67,1 (CH_2 Z), 127,5 ($C_{2,6}$H Z), 128,3 ($C_{3,5}$H Z), 128,2 (C_4H Z), 128,6 ($C_{2,6}$H benzofenon), 129,9 ($C_{3,5}$H benzofenon), 130,0 ($C_{2,6}$H benzofenon), 130,1 (C_4H benzofenona), 131,6 (C benzofenon), 137,0 (C Z), 150,9 (C benzofenon), 156,2 (CO Z), 172,2 (CO glavni lanac Glu), 174,2 (CO bočni lanac Glu).

*3.4.6. Priprava 4-OH-benzaldehid- Z-Glu-OEt-hidrazona (**5e**)*



$M(C_{22}H_{25}N_3O_6)$ = 427,45 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 428,2; $[2M+H]^+$ *m/z* 855,3.

Očišćeno kromatografijom na kratkoj koloni silikagela u smjesi otapala CH_2Cl_2-MeOH 15:2 (R_f =0,8).

Prinos: 21 mg (η = 32 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,18-1,31 (m, 3H, CH_3 ester), 2,08 i 2,34 (dd, 2H, β-CH_2), 2,69-3,01 (m, 2H, γ-CH_2), 4,19 (d, 2H, CH_2 ester), 4,30-4,50 (m, 1H, α-CH), 5,11 (d, 2H, CH_2 Z), 5,73 (d, 1H, NH glavni lanac), 6,85 (d, 1H, OH 4-OH benzaldehid), 7,22-7,52 (9H, $CH_{1\text{-}5}$ Z i $CH_{1\text{-}5}$ 4-OH-benzaldehid), 7,58 (s, 1H, NH hidrazon), 9,08 (s, 1H, CH 4-OH-benzaldehid).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,1 (CH_3 ester), 27,0 (β-CH_2), 28,8 (γ-CH_2), 53,8 (α-CH), 61,9 (CH_2 ester), 67,0 (CH_2 Z), 115,9 ($C_{3,5}$H 4-OH-benzaldehid), 126,0 (C 4-OH-benzaldehid), 128,0-129,0 ($C_{2\text{-}6}$H Z), 130,6 ($C_{2,6}$H 4-OH-benzaldehid), 133,7 (C 4-OH-benzaldehid), 136,0 (C Z), 143,9 (CH 4-OH-benzaldehid), 156,2 (CO Z), 158,1 (C_4H 4-OH-benzaldehid), 172,2 (CO glavi lanac Glu), 174,5 (CO bočni lanac Glu).

3.5. Razvoj protokola za derivatizaciju i LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona

3.5.1. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju

Kako bi se istražili optimalni uvjeti za derivatizaciju benzaldehida s Z-Glu($NHNH_2$)-OEt (**5**), pripremljena je serija modelnih otopina. LC-MS metodom istražena je stabilnost reagensa **5** i benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**) u smjesi vode, octene kiseline i metanola (25 % vode, 7,5 % octene kiseline, 67,5 % MeOH). Osim octene kiseline istražena je i mravlja kiselina. Također, istražen je pH pri kojem je prinos produkta najveći. pH je podešavan dodatkom octene kiseline u rasponu od 2 do 6. Istražen je i optimalni dodatak derivatizacijskog reagensa u odnosu na benzaldehid pri kojem nastaje naviše produkta i to od omjera 1:1 do 1:10 (Z-Glu-$NHNH_2$-OEt:benzaldehid). Derivatizacijske reakcije provedene su pri temperaturama od 25 ºC i 60 ºC tijekom 30, 60, 90 i 120 minuta.

Nakon dobivanja preliminarnih rezultata pod istim uvjetima provedeni su eksperimenti na modelnoj otopini kako bi se utvrdilo da li je derivatizacijska reakcija kvantitativna. U tu svrhu razvijena je LC-MS/MS metoda.

3.5.2. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona

LC-MS/MS analiza benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**) provedena je na Agilent Technologies 1200 series HPLC sustavu (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) koji je opremljen s binarnom pumpom, degaserom, automatiziranim injektorskim sustavom i spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom 6420 uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI).

Kromatografsko razdvajanje provedeno je na Kinetex C18 koloni (75 x 4,6 mm, 2,6 μm veličina čestica). Otapala za analizu 0,1 % mravlja kiselina (FA) u Mili Q vodi (otapalo A) i 0,1 % FA u metanolu (otapalo B). Gradijentno eluiranje s vremenskim točkama: 0 min 50 % A, 0-18 min 50 % A-0 % A, 18-22 min 0 % A, 22-22,1 min 0 % A-50 % A, 22,1-27 min 50 % A. Protok je podešen na 0,3 mL min^{-1}.

Parametri spektrometra masa postavljeni su kako slijedi: ionizacija elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada, praćenje višestrukih reakcija (MRM), dwell time 100 ms po MRM prijelazu. Temperatura plina za sušenje podešena je na 300 ^{0}C s brzinom protoka od 8,0 L min^{-1}, tlak nebulizatora 30 psi, a napon na kapilari na 4,0 kV. Kao kolizijski plin korišten je

dušik. Za razvoj MRM metode upotrebljena su dva specifična, ujedno i dva najintenzivnija fragmentna iona, *m/z* 211 (kvantifikacijski) i *m/z* 248 (potvrdni). Energija ionizacije podešena je na 70 V, a kolizijska energija na 10 eV (prijelaz *m/z* 412-211) i na 5 eV (prijalaz *m/z* 412-248).

Za sakupljanje i obradu podataka korišten je AgilentMassHunter software.

3.5.3. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje ostalih karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona

U istu kromatografsku metodu uvršteni su optimalni parametri spektrometra masa za dobivanje najvećeg odaziva ostalih dobivenih derivata, aceton-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5b**), heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5c**), benzofenon-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5d**) i 4-OH-benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5e**) (Tablica 2.).

Tablica 2. Ionizacijski i fragmantacijski parametri spektrometra masa za pripremljene karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazone

	Energija ionizacije/V	MRM prijelazi	Kolizijska energija/eV
5a	70	412-211	10
		412-248	5
5b	70	364-163	5
		364-248	5
5c	90	406-205	10
		406-248	5
5d	100	488-287	10
		488-248	5
5e	70	428-227	5
		428-248	10

3.5.4. Priprava modelne otopine s benzaldehidom

Derivatizacijski reagens dobiven je u obliku TFA soli, a korišteni omjer derivatizacijskog reagensa i benzaldehida bio je 7:1 (u eksperimentalne rezultate uračunata je i kontaminacija

toluena benzaldehidom koji se koristi kod uparavanja TFA tijekom priprave derivatizacijskog reagensa).

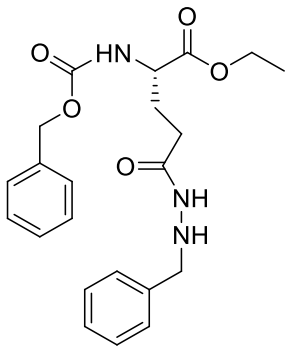
Pripravljena je osnovna otopina benzaldehida u MeOH masene koncentracije 0,424 μg mL^{-1}. Blank modelne sadrži 3,05 mg derivatizacijskog reagensa, 1,5 mL octene kiseline, 13,5 mL MeOH i 5 mL vode. Ukupni volumen modelne otopine je 20 mL. Modelna otopina sadrži 3,05 mg reagensa, 1,5 mL octene kiseline, 13,25 mL MeOH, 5 mL vode i 250 μL osnovne otopine benzaldehida. Obje su otopine ostavljene na miješanju 2 h. Nakon miješanja na LC-MS/MS injektirano je 10 μL blank, a zatim i modelne otopine.

Za izradu kalibracijskog pravca na LC-MS/MS injektirano je 10 μL standardnih otopina derivata **5a** u MeOH masenih koncentracija 10 μg mL^{-1}, 20 μg mL^{-1}, 25 μg mL^{-1}, 50 μg mL^{-1} i 100 μg mL^{-1}.

3.6. Redukcija hidrazona u hidrazide

Redukcija hidrazona u hidrazide provedena je *in situ*, prvu korak je opisana reakcija derivatizacijskog reagensa u obliku TFA soli s karbonilnim spojem i nastajanje odgovarajućih hidrazona, a potom je bez izolacije nastalog hidrazona, uz praćenje reakcije tankoslojnom kromatografijom provedena redukcija u hidrazid uz dodatak 10 ekvivalenata natrijevog cijanoborhidrida. Redukcija je provedena uz 10 h miješanja na sobnoj temperaturi. Reakcija je provedena u acetonitrilu. pH smjese prije dodatka natrijevog cijanoborhidrida podešen je po potrebi na 3 korištenjem limunske kiseline. Produkti su očišćeni i izolirani korištenjem tekućinske kromatografije obrnutih faza uz *homemade* semipreparativnu C18 kolonu (250 x 9,6 mm, veličina čestica 5 μm) i UV detekciju pri 254 nm, izokratno u sustavu 70 % H2O + 0,1 % AcOH, 30 % ACN, protok 1 mL min^{-1}. Derivati su okarakterizirani spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

*3.6.1. Priprava benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7a**)*



$M(C_{22}H_{27}N_3O_5)$ = 413,47 g mol^{-1}

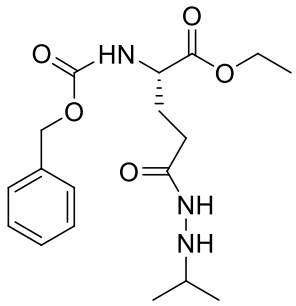
$[M+H]^+$ *m/z* 414,3; $[M+Na]^+$ *m/z* 436,3.

Prinos: 9 mg (η = 15 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,21-132 (m, 3H, CH_3 ester), 1,95 i 2,22 (dd, 3H, β-CH_2, NH hidrazid), 2,36 (d, 2H, γ-CH_2), 4,20 (d, 2H, CH_2 ester), 4,25-4,38 (m, 1H, α-CH, CH_2 benzaldehida), 5,10 (d, 2H, CH_2 Z), 5,66 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,18-7,59 (10H, $CH_{1\text{-}5}$ Z i $CH_{1\text{-}5}$ benzaldehid), 8,0 (s, 1H, NH hidrazid).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,2 (CH_3 ester), 27,8 (β-CH_2), 29,4 (γ-CH_2), 53,0 (α-CH), 56,2 (CH_2 benzaldehida), 62,3 (CH_2 ester), 67,7 (CH_2 Z), 128,3 ($C_{2,6}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 129,1- 130,4 ($C_{3,5}$H Z i $C_{2,3,5,6}$H benzaldehid), 130,5 (C_4H benzaldehid), 135,8 (C benzaldehid), 136,2 (C Z), 156,1 (CO Z), 171,7 (CO glavi lanac Glu), 172,0 (CO bočni lanac Glu).

*3.6.2. Priprava aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7b**)*



$M(C_{18}H_{27}N_3O_5)$ = 365,42 g mol^{-1}

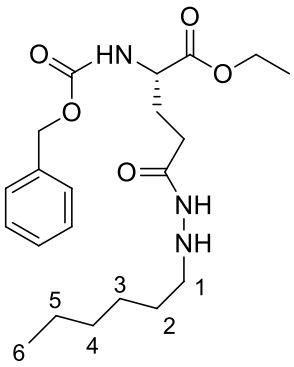
$[M+H]^+$ *m/z* 366,3; $[M+Na]^+$ *m/z* 388,3.

Prinos: 8 mg (η = 15 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,20-1,32 (m, 9H, CH_3 ester, CH_3 aceton), 2,0 (s, 1H, NH hidrazida), 2,27 i 2,36 (dd, 2H, β-CH_2), 2,42 (d, 2H, γ-CH_2), 3,38-3,48 (m, 1H, CH aceton), 4,20 (d, 2H, CH_2 ester), 4,33-4,48 (m, 1H, α-CH), 5,11 (dd, 2H, CH_2 Z), 5,50-5,70 (m, 1H, NH glavni lanac), 7,18-7,47 (5H, $CH_{1\text{-}5}$ Z).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,2 (CH_3 ester), 18,4 (CH_3 aceton) 20,8 (CH_3 aceton), 28,0 (β-CH_2), 29,8 (γ-CH_2), 52,5 (CH aceton), 53,5 (α-CH), 62,1 (CH_2 ester), 67,3 (CH_2 Z), 128,3 ($C_{2,6}$H Z), 128,4 ($C_{3,5}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 136,5 (C Z), 156,6 (CO Z), 171,8 (CO glavi lanac Glu), 172,6 (CO bočni lanac Glu).

*3.6.3. Priprava heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7c**)*



M($C_{21}H_{33}N_3O_5$) = 407,50 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 408,2; $[M+Na]^+$ *m/z* 430,2.

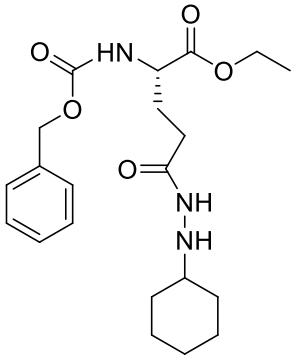
Prinos: 3 mg (η = 4 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0,9 (t, 3H, C_6H_3 heksanal), 1,15-1,38 (m, 9H, CH_3 ester, $C_{3\text{-}5}H_2$ heksanal), 1,56-1,67 (m, 2H, C_2H_2 heksanal), 1,97 (d, 1H, NH hidrazid), 2,14-2,44 (m, 4H, β-CH_2, γ-CH_2), 2,93-3,05 (m, 2H, C_1H_2 heksanal), 4,20 (d, 2H, CH_2 ester), 4,37 (d, 1H, α-CH), 5,10 (s, 2H, CH_2 Z), 5,58 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,28-7,45 (5H, $CH_{1\text{-}5}$ Z), 8,74 (s, 1H, NH hidrazon).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 13,0 i 13,2 (C_6H_3 heksanal i CH_3 ester), 22,5 (C_5H_2 heksanal), 25,6 (C_2H_2 heksanal), 26,3 (C_4H_2 heksanal), 28,1 (β-CH_2), 29,9 (C_3H_2 heksanal) 31,4 (γ-CH_2), 52,16 (C_1H_2 heksanal), 53,2 (α-CH), 62,1 (CH_2 ester), 67,4 (CH_2 Z), 128,3 ($C_{2,6}$H Z), 128,4

($C_{3,5}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 136,2 (C Z), 156,4 (CO Z), 171,8 (CO glavi lanac Glu), 171,9 (CO bočni lanac Glu).

*3.6.4. Priprava cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida **(7d)***



$M(C_{21}H_{31}N_3O_5)$ = 405,49 g mol^{-1}

$[M+H]^+$ *m/z* 406,3; $[2M+H]^+$ *m/z* 811,6.

Prinos: 16 mg (η = 26 %) produkta u obliku prozirnog ulja.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1,07-1,31 (m, 6H, CH_3 ester, CH_2 cikloheksanon), 1,32-1,48 (m, 2H, CH_2 cikloheksanon), 1,66 (d, 1H, NH hidrazid), 1,72-1,91 (m, 3H, CH_2 cikloheksanon), 1,94-2,15 (m, 3H, CH_2 cikloheksanon, β-CH_2), 2,18-2,36 (m, 1H, β-CH_2), 2,38-2,54 (m, 2H, γ-CH_2), 3,15-3,28 (m, 1H, CH cikloheksanona), 4,15 (dd, 2H, CH_2 ester), 4,38 (d, 1H, α-CH), 5,11 (dd, 2H, CH_2 Z), 5,63 (d, 1H, NH glavni lanac), 7,27-7,40 (5H, CH_{1-5} Z).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14,2 (CH_3 ester), 24,2 ($C_{3,5}H_2$ cikloheksanon), 24,9 (C_4H_2 cikloheksanon), 27,7 (β-CH_2), 28,0 ($C_{2,6}H_2$ cikloheksanon), 29,5 (γ-CH_2), 53,2 (α-CH), 59,0 (CH cikloheksanon), 62,1 (CH_2 ester), 67,3 (CH_2 Z), 128,2 ($C_{2,6}$H Z), 128,4 ($C_{3,5}$H Z), 128,7 (C_4H Z), 136,2 (C Z), 156,4 (CO Z), 171,9 (CO glavi lanac Glu), 172,5 (CO bočni lanac Glu).

3.7. Razvoj protokola za derivatizaciju i LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida

3.7.1. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida

Kako hidrazidni produkti pokazuju analognu fragmentaciju s hidrazonima uz 2 protona više, za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida je spektrometar masa podešen prema metodi za hidrazone u koju su uneseni prijelazi za hidrazide (Tablica 3.).

Tablica 3. Ionizacijski i fragmantacijski parametri spektrometra masa za pripremljene karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazide

	Energija ionizacije/V	MRM prijelazi	Kolizijska energija/eV
7a	100	414-213	10
		414-123	7
7b	100	366-165	10
		366-75	10
7c	90	408-207	10
		408-117	10
7d	100	406-205	15
		406-115	10

Kromatografsko razdvajanje provedeno je također na Kinetex C18 koloni (75 x 4,6 mm, 2,6 μm veličina čestica). Otapala za analizu bila su 0,1 % mravlja kiselina (FA) u Mili Q vodi (otapalo A) i 0,1 % FA u ACN (otapalo B). Gradijentno eluiranje s vremenskim točkama: 0 min 70 % A, 0-18 min 70 % A-0 % A, 18-22 min 0 % A, 22-22,1 min 0 % A-70 % A, 22,1-27 min 70 % A. Protok je podešen na 0,3 mL min^{-1}.

Parametri spektrometra masa postavljeni su kako slijedi: ionizacija elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada, praćenje višestrukih reakcija (MRM), dwell time 100 ms po MRM prijelazu. Temperatura plina podešena je na 300 ^{0}C s brzinom protoka od 8,0 L min^{-1}, tlak nebulizatora 30 psi, a napon na kapilari na 4,0 kV. Kao kolizijski plin korišten je dušik. Praćena su dva MRM prijelaza kao i kod metode za hidrazone, jedan kvantifikacijski i drugi

potvrdni. Energija ionizacije podešena je na za svaki pojedini hidrazid, kao i kolizijske energije za pojedine kvantifikacijske i potvrdne MRM prijelaze (Tablica 3.).

Za sakupljanje i obradu podataka korišten je AgilentMassHunter software.

3.7.2. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju i priprava modelne otopine benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida

Kvantitativnost derivatizacijske reakcije istražena je na modelnim otopinama *in situ*.

Na primjeru derivatizacije benzaldehida, istraženi su uvjeti reakcije redukcije, prije svega optimalni dodatak $NaBH_3CN$ (10 ekvivalenata, 50 ekvivalenata i 100 ekvivalenata) i vrijeme redukcije (1,5 h, 2 h i 3 h). Također je istražen optimalni pH za provođenje redukcijske reakcije i optimalni volumen octene kiseline u modelnim otopinama (dodatak 7,5 % i 15 % na ukupni volumen modelne otopine).

Ukupni volumen modelne otopine iznosio je 10 mL. Pripravljena je osnovna otopina derivatizacijskog reagensa u acetonitrilu masene koncentracije 3,05 mg mL^{-1} i osnovna otopina benzaldehida u acetonitrilu masene koncentracije 0,408 mg mL^{-1}. U svaku modelnu otopinu dodano je 500 µL osnovne otopine derivatizacijskog reagensa, 2,5 mL vode, 1,5 mL octene kiseline i 5,375 mL acetonitrila. Na taj volumen acetonitrila dodavana je i razlika, ovisno o volumenu dodanog benzaldehida. U blank otopini nema dodatka benzaldehida. Dodatak benzaldehida u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

Pojedina modelna otopina ostavljena je 2 h na miješanju nakon čega je u svaku dodano 100 ekvivalenata $NaBH_3CN$ (25 mg) i otopine su ostavljene na miješanju još 2 h. pH otopine iznosio je 3. Prije injektiranja otopine su razrijeđene 10x smjesom koja se sastoji od 67,5 % ACN, 7, 5% octene kiseline, 25 % vode i velikog suviška $NaBH_3CN$. Na LC-MS/MS injektirano je 10 µL razrijeđenih otopina.

Tablica 4: Masene koncentracije karbonilnih spojeva u modelnim otopinama

otopina	dodano osnovne otopine karbonilnog spoja/ µL	dodano ACN/ µL	γ (benzaldehida u otopini)/µg mL^{-1}	γ (acetona u otopini)/ µg mL^{-1}	γ (heksanala u otopini)/ µg mL^{-1}	γ (cikloheksanona u otopini)/ µg mL^{-1}
blank	0	125	-	-	-	-
1.	125	0	5,10	2,88	4,97	4,80
2.	100	25	4,08	2,31	3,97	3,92
3.	75	50	3,06	1,75	2,98	2,94
4.	50	75	2,04	1,15	1,98	1,96
5.	25	125	1,02	0,58	0,99	0,98
Razrijeđenje osnovne otopine 10x						
6.	125	0	0,51	0,29	0,50	0,48
7.	62,5	62,5	0,26	0,15	0,25	0,24
8.	31,25	93,75	0,13	0,07	-	0,12

3.7.3. Priprava modelne otopine aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida

Prema istom protokolu pripremljena je serija modelnih otopina uz dodatak acetona. Pripravljena je osnovna otopina derivatizacijskog reagensa u acetonitrilu masene koncentracije 3,05 mg mL^{-1}. Masena koncentracija osnovne otopine acetona pripremljene u acetonitrilu iznosila je 0,231 mg mL^{-1}. Dodatak acetona u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

3.7.4. Priprava modelne otopine heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida

Prema istom protokolu pripremljena je serija modelnih otopina uz dodatak heksanala. Pripravljena je osnovna otopina derivatizacijskog reagensa u acetonitrilu masene koncentracije 3,05 mg mL^{-1}. Masena koncentracija osnovne otopine heksanala pripremljene u acetonitrilu iznosila je 0,398 mg mL^{-1}. Dodatak heksanala u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

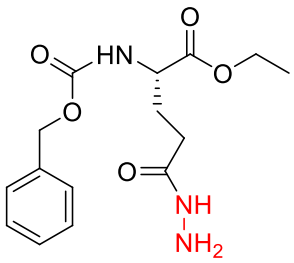
3.7.5. Priprava modelne otopine sa cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida

Prema istom protokolu pripremljena je serija modelnih otopina sa cikloheksanonom. Pripravljena je osnovna otopina derivatizacijskog reagensa u acetonitrilu masene koncentracije 3,05 mg mL^{-1}. Masena koncentracija osnovne otopine cikloheksanona pripremljene u acetonitrilu iznosila je 0,392 mg mL^{-1}. Dodatak cikloheksanona u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

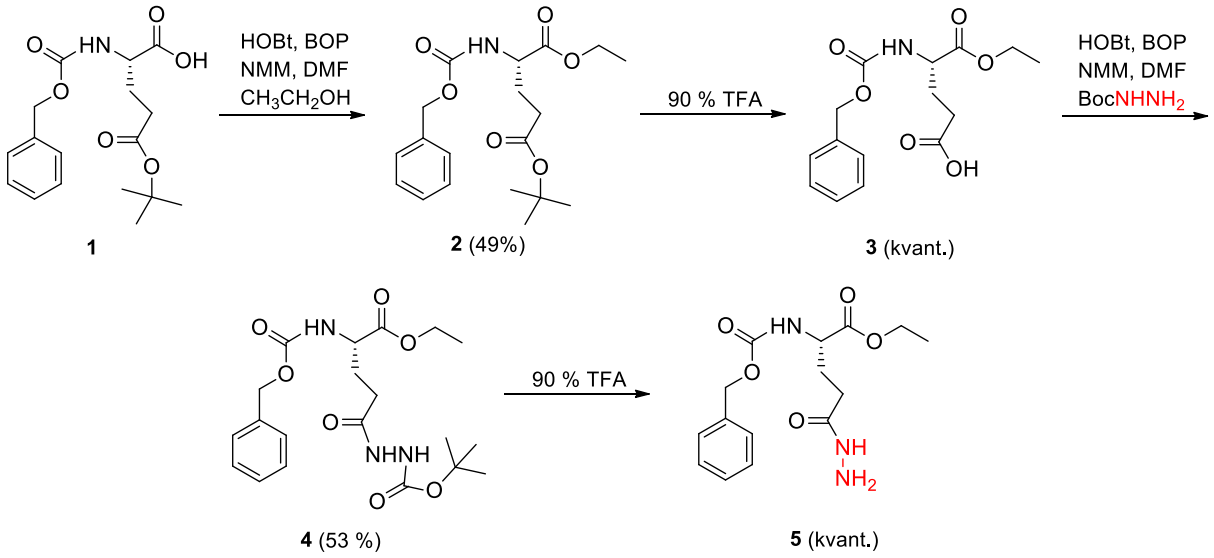
4.1. Priprava derivatizacijskog reagensa

Reagens za derivatizaciju aldehida i ketona dizajniran je na temelju činjenice da je reakcija hidrazina s karbonilnim spojevima brza i kvantitativna te da aminokiseline i peptidi lagano fragmentiraju dajući karakteristične ione.[66,67] Stoga je priređen N- i C-terminalno zaštićeni derivat kojem je karboksilna skupina na bočnom lancu preinačena u hidrazino-derivat (Slika 14.). Hipoteza istraživanja je da će u derivatizacijskoj reakciji hidrazino-reagensa aminokiselinske strukture i karbonilnih spojeva nastati produkti koji daju brojne i specifične ione produkte u MS/MS eksperimentima, pogodne za razvoj selektivne i osjetljive LC-MS/MS metode kao metode izbora za identifikaciju i kvantifikaciju karbonilnih spojeva u biološkim uzorcima, uzorcima okoliša i kontroli kvalitete.



Slika 14. Strukturna formula predloženog derivatizacijskog reagensa Z-Glu($NHNH_2$)-OEt, **5**

Priprava hidrazino-derivata aminokiselinske strukture provedena je korištenjem standardnih metoda peptidne sinteze[68] i prikazana je na Shemi 12. Terminalne skupine na derivatizacijskom reagensu su zaštićene kako bi se osiguralo optimalno zadržavanje analita na koloni u uvjetima obrnutofazne kromatografije.



Shema 12. Priprava derivatizacijskog reagensa **5**

U prvom koraku sinteze α-karboksilna skupina komercijalno dostupnog derivata glutaminske kiseline Z-Glu(OtBu)-OH (**1**) prevedena je u etilni ester (**2**) korištenjem kondenzacijskih reagensa (benenzotriazol-1-il-oksi)tris(dimetilamino)fosfonij-heksafluorofosfata (BOP) i hidroksibenzotriazola (HOBt) u dimetilformamidu uz dodatak baze, N-metilmorfolina. Nakon aktivacije smjesi je dodan suhi etanol. Esterski derivat **2** je izoliran u 49 % prinosu. Nakon uklanjanja zaštitne t-Bu-skupine s 90 % TFA, karboksilna skupina je prevedena u hidrazino-skupinu u reakciji s Boc-$NHNH_2$ uz aktivaciju s BOP/HOBt kondenzacijskim reagensima (**4**). Nakon uklanjanja Boc-zaštitne skupine s 90% TFA, produkt **5** je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela i izoliran u 53 % prinosu. Svi produkti su okarakterizirani spektroskopskim i spektrometrijskim metodama. Derivatizacijski reagens stabilan je na sobnoj temperaturi kroz više mjeseci.

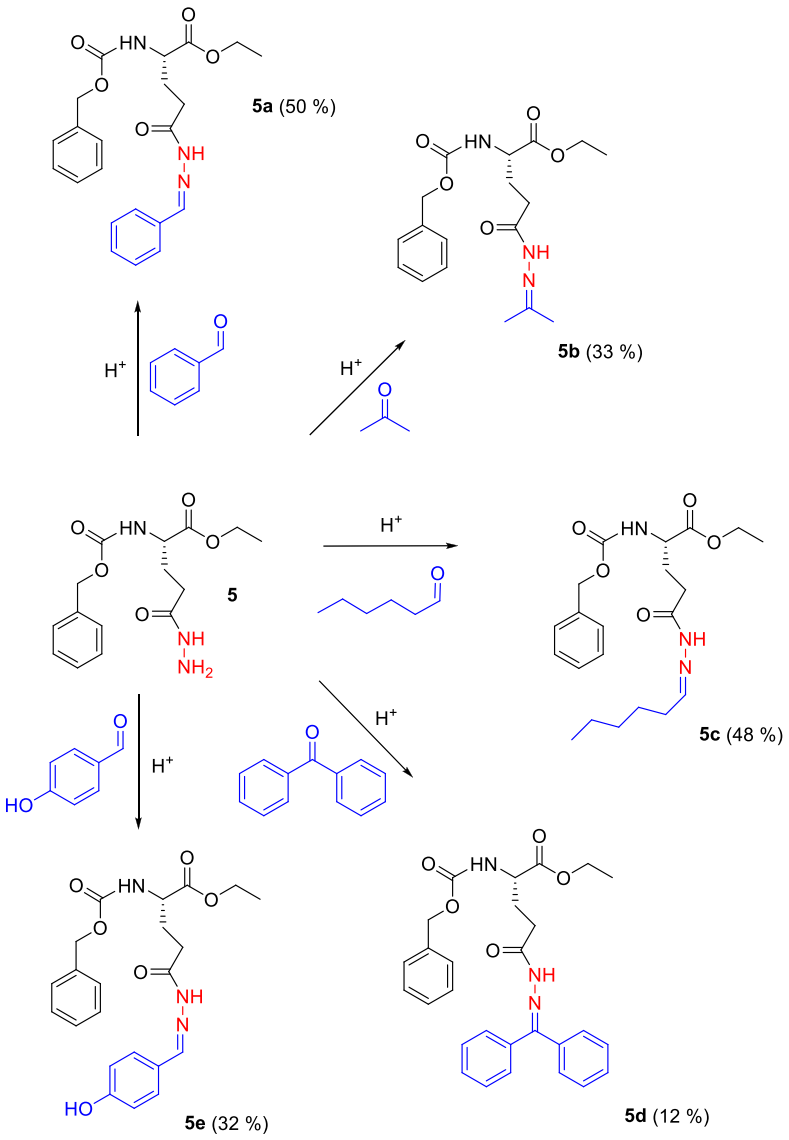
4.2. Priprava derivata hidrazona glutaminske kiseline i odabranih karbonilnih spojeva

4.2.1. Optimiranje reakcijskih uvjeta za dobivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona

Hidrazino-derivat glutaminske kiseline (**5**) nestabilan je u smjesi H_2SO_4, EtOH i H_2O koja se obično koristi za pripravu karbonil-2,4-DNP-hidrazona, usljed oksidacijskog djelovanja sulfatne kiseline. Osim toga, netopljiv je u vodi, stoga je bilo potrebno optimirati uvjete derivatizacije. Istraživanje stabilnosti praćeno je snimanjem MS spektara, odmah po otapanju derivatizacijskog reagensa, nakon 0,5 h, 1 h i 24 h. Nakon 1 h u smjesi H_2SO_4, EtOH i H_2O više nema molekulskog iona i javljaju se nove specije koje upućuju na njegov raspad. Stoga je smjesa H_2SO_4, EtOH i H_2O zamijenjena smjesom octene kiseline i metanola u omjeru 1:1, u kojoj je derivatizacijski reagens stabilan tijekom 24 h na sobnoj temperaturi. Osim toga, u pokusu s benzaldehidom je prilikom praćenja tijeka reakcije tankoslojnom kromatografijom na 254 nm uočen je dio neizreagiranog benzaldehida, pa je u reakcijama priprave korišena 3x manja količina karbonilnih spojeva.

Z-Glu($NHNH_2$)-OEt (**5**) je upotrijebljen kao derivatizacijski reagens za pripravu karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona (Shema 13.). Ovom reakcijom dobiveni su standardi benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**), aceton-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5b**), heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5c**), benzofenon-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5d**) i 4-OH-benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5e**). U reakciji sa cikloheksanonom je dobiven produkt, no tijekom izolacije dolazi do raspada, dok u reakciji s formaldehidom i acetaldehidom nisu dobiveni odgovarajući hidrazoni.

Aldehidi su dali bolje prinose (oko 50 %) za razliku od ketona (oko 30 %). Kod priprava benzofenonskog dobiven je najmanji prinos, zbog steričke zaklonjenosti karbonilne skupine benzofenona aromatskim prstenovima. Svi sintetizirani spojevi okarakterizirani su spektroskopskim i spektrometrijskim metodama.

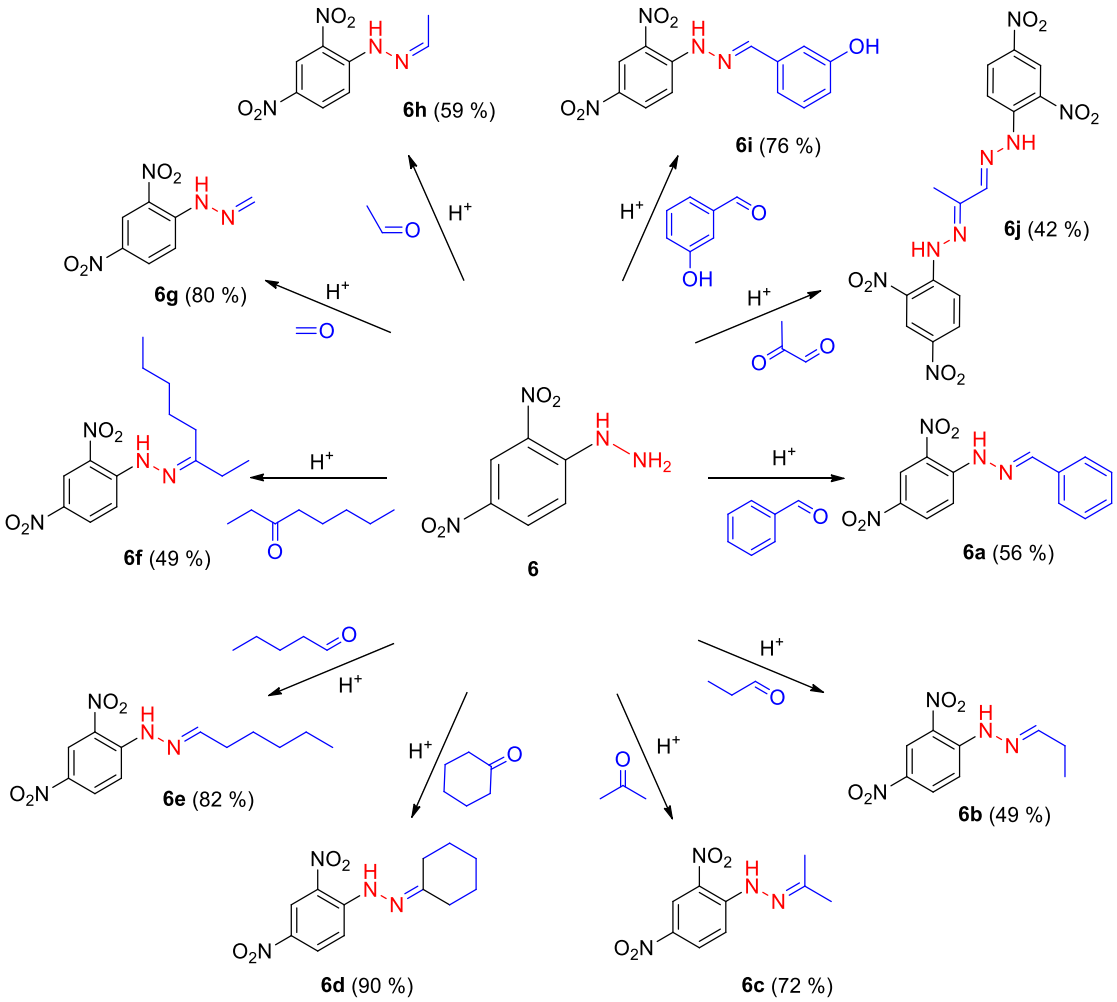


Shema 13. Priprava karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona

4.3. Priprava karbonil-2,4-dinitrofenilhidrazona

Kako bi istražili efikasnost pripravljenog derivatizacijskog reagensa, pripravljeni su i hidrazoni korištenjem najčešće korištenog derivatizacijskog reagensa za karbonilne spojeve 2,4-DNPH (**6**). Karbonil-2,4-dinitrofenilhidrazoni (karbonil-2,4-DNP-hidrazoni) priređeni su reakcijom DNPH i odabranih karbonilnih spojeva u kiselim reakcijskim uvjetima[6] po postupku Allena i suradnika[10] te Bradya.[11] DNPH je otopljen u smjesi dobivenoj miješanjem sumporne kiseline, vode i etanola. Dodatkom odabranog karbonilnog spoja kao 10 % otopine

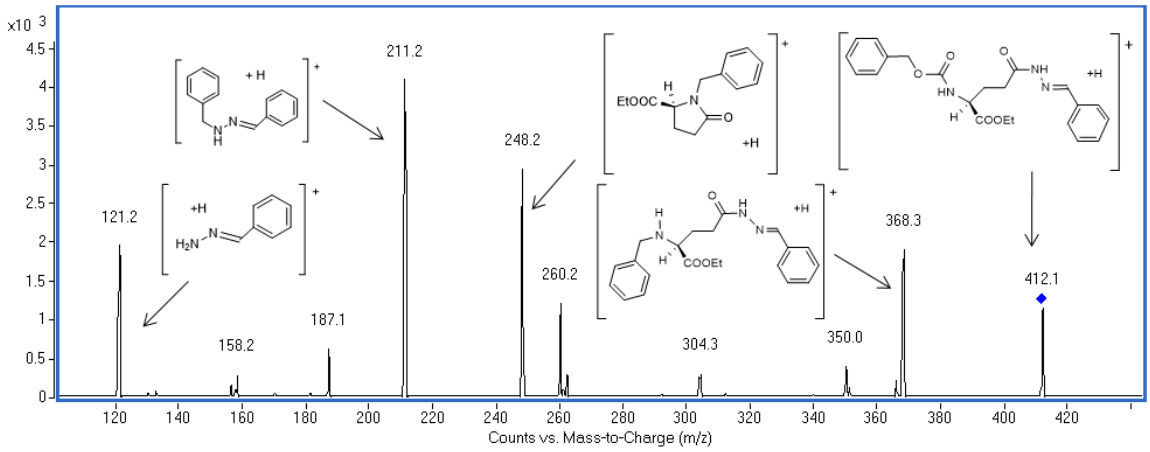
u etanolu uz 50 % molarni suvišak, produkt vrlo brzo istaloži u visokom prinosu. Po opisanom postupku pripravljeni su benzaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6a**), propanal-2,4-DNP-hidrazon (**6b**), aceton-2,4-DNP-hidrazon (**6c**), cikloheksanon-2,4-DNP-hidrazon (**6d**), heksanal-2,4-DNP-hidrazon (**6e**), 3-oktanon-2,4-DNP-hidrazon (**6f**), formaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6g**), acetaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6h**), 3-OH-benzaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6i**) i metilglioksal-2,4-DNP-hidrazon (**6j**) (Shema 14.). Svi sintetizirani spojevi okarakterizirani su spektroskopskim i spektrometrijskim metodama.



Shema 14. Priprava karbonil-2,4-DNP-hidrazona

4.4. MS/MS analiza karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona i karbonil-2,4-dinitrofenilhidrazona

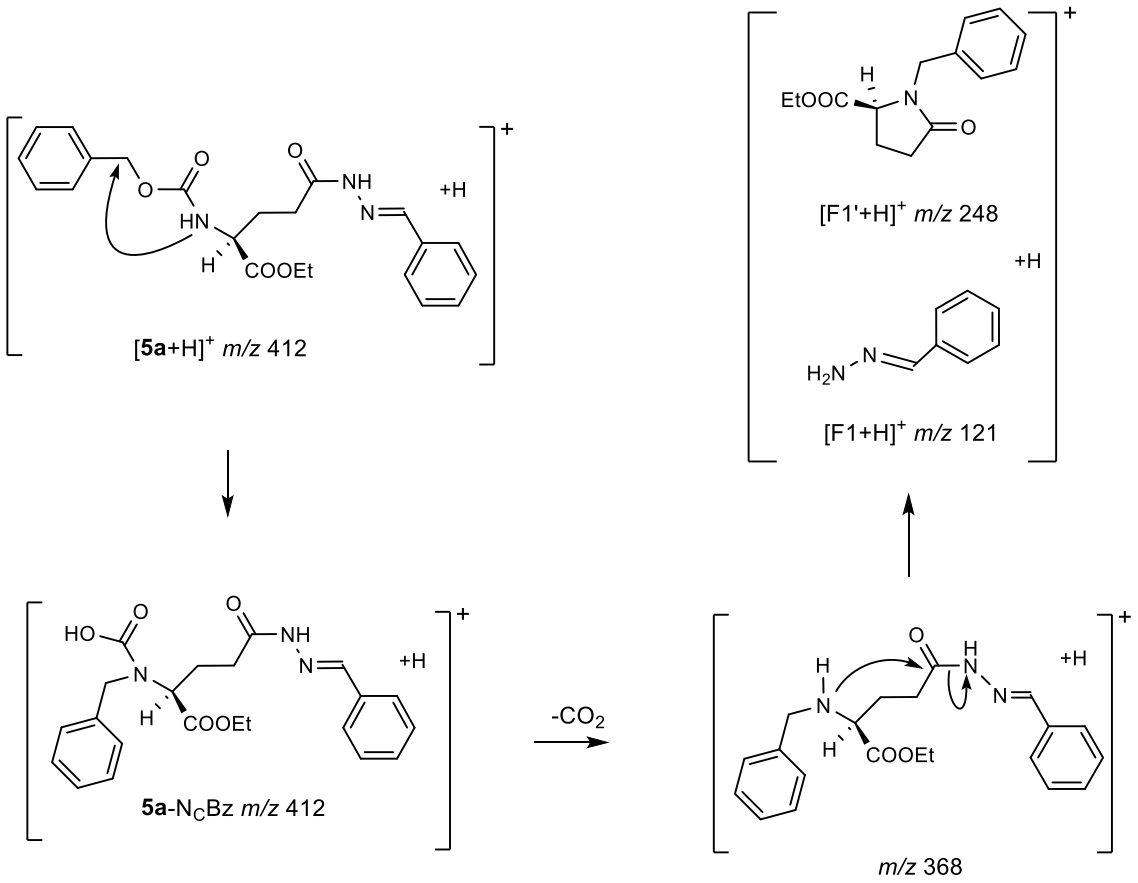
Na primjeru benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**) objašnjena je ionizacija i fragmentacija svih pripremljenih karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona.[69] Produkti su bazični spojevi koji dobro ioniziraju uz pozitivnu ionizaciju te se u spektrima masa uglavnom vide kao $[M+H]^+$ ioni ili kao adukti s natrijem, $[M+Na]^+$. **5a** s molekulskim ionom *m/z* 412 daje vrlo bogatu i specifičnu fragmentaciju u MS/MS eksperimentima (Slika 15.).



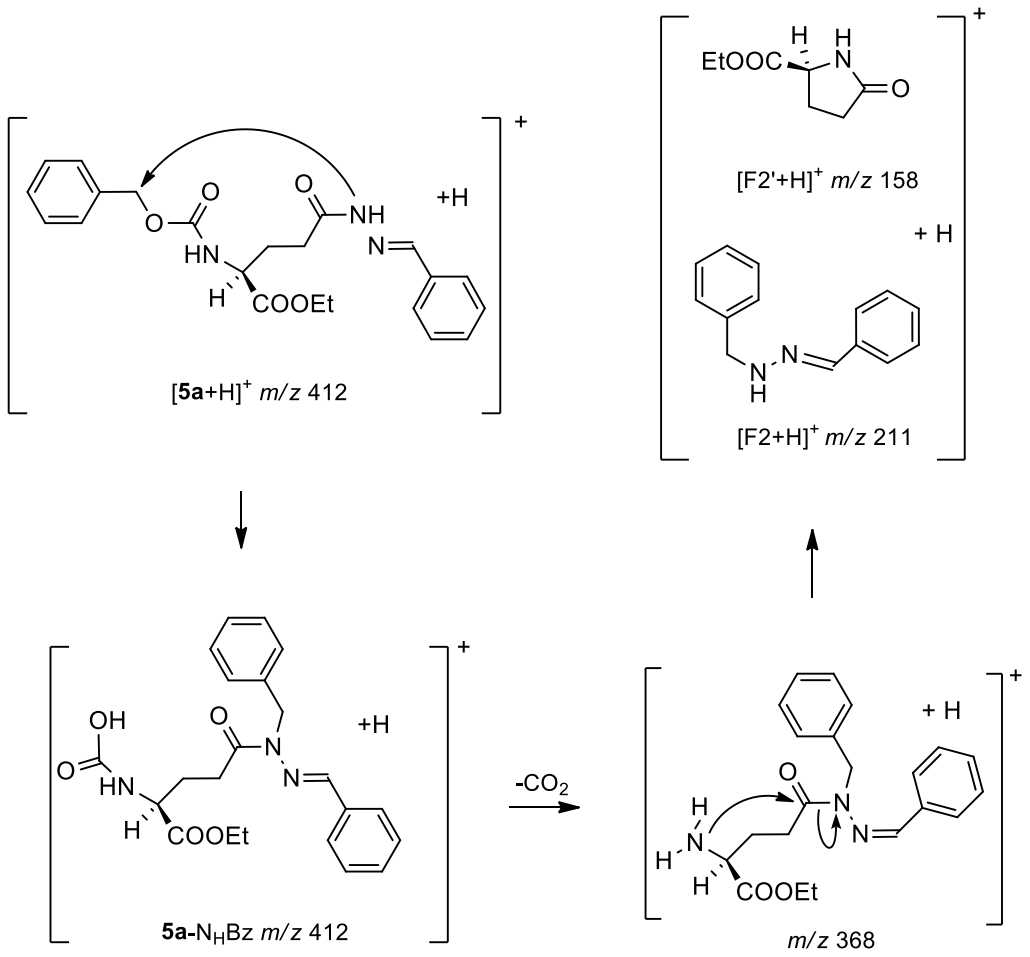
Slika 15. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 412 benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**)

Ion produkt *m/z* 368 nastaje gubitkom 44 Da što odgovara gubitku CO_2 skupine. Dekarboksilacija karbamatne skupine uz migraciju benzilne skupine od karbamatnog kisika (O_c) do karbamatnog dušika (N_c) dobro je opisana u literaturi za različite vrste protoniranih peptida.[69-72] Migracije benzilne skupine potaknute su intramolekulskim nukleofilnim (S_N2) reakcijama u plinskoj fazi. Hidrazon **5a** sadrži više nukleofilnih centara i svaki od njih može potaknuti migraciju benzilne skupine. Migracija benzilne skupine prema α-amino-skupini ($O_C \rightarrow N_C$ migracija) uz dekarboksilaciju daje ion produkt *m/z* 368 kao što je prikazano na Shemi 15. Pojava iona produkata *m/z* 248 ($[F1'+H]^+$) i iona benziliden-hidrazinske strukture *m/z* 121 ($[F1+H]^+$) potvrđuju fragmentacijski put, no ion *m/z* 121 može nastati iz roditeljskog iona *m/z* 412 prije dekarboksilacije. S druge strane, dekarboksilacija vezana uz migraciju benzilne skupine prema hidrazino-skupini bočnog lanca ($O_C \rightarrow N_H$ migracija) daje drugačiju

strukturu *m/z* 368 koja pak daljnjom fragmentacijom daje intenzivni ion produkt 1-benzil-2-benziliden-hidrazina $[F2+H]^+$ *m/z* 211 i ion produkt $[F2'+H]^+$ *m/z* 158 (Shema 16.).

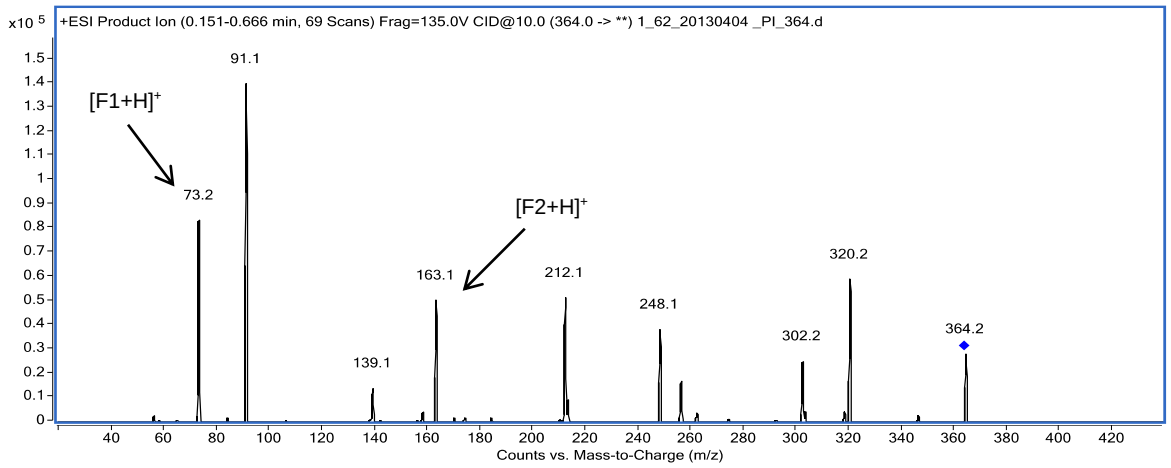


Shema 15. $O_C \rightarrow N_C$ migracija benzilne skupine derivata **5a**

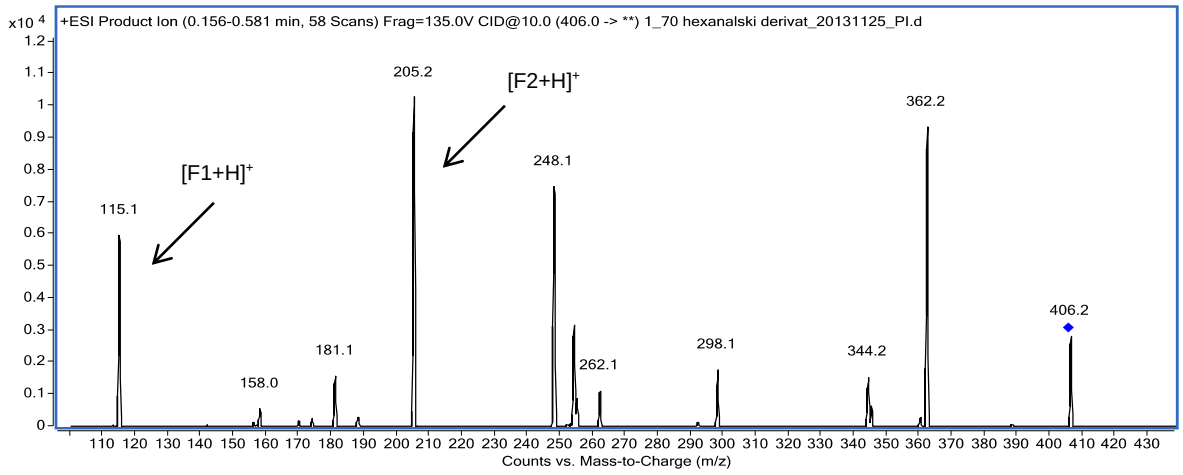


Shema 16. $O_C \rightarrow N_H$ migracija benzilne skupine derivata **5a**

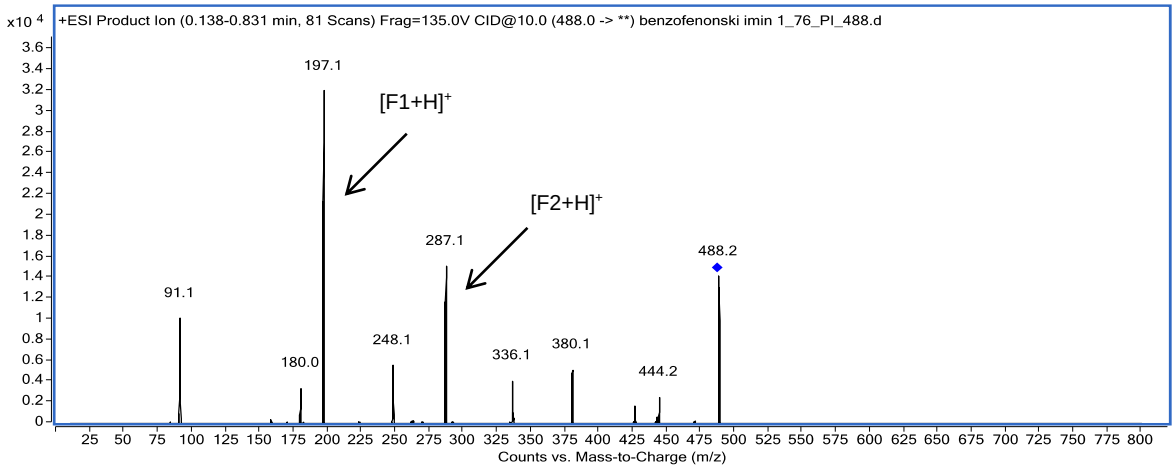
Ponašanje u MS/MS eksperimentima i opisani fragmentacijski putevi analogni su (ovisno o strukturi pojedinog karbonila) u svim priređenim karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazonima. Na Slikama 16.-19. dani su MS/MS spektri ostalih pripremljenih hidrazona.



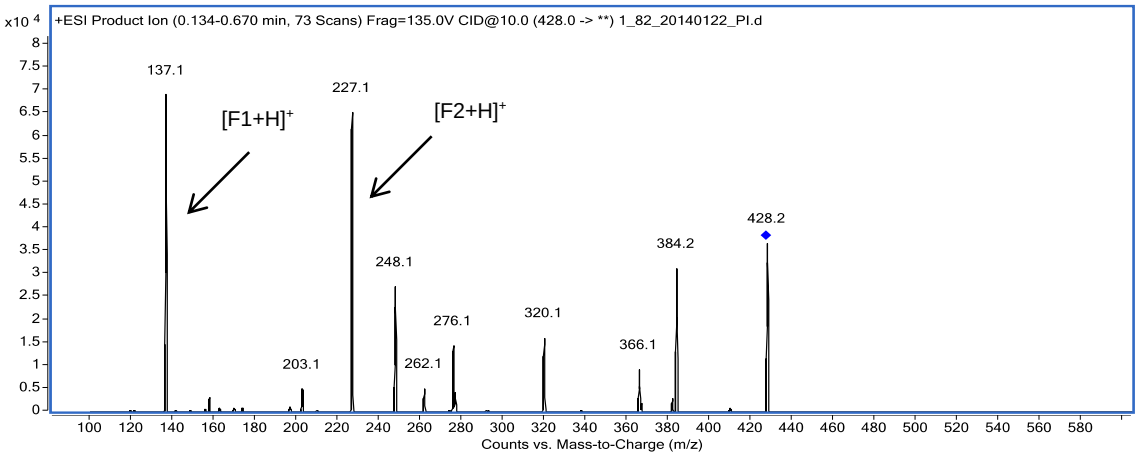
Slika 16. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 364 aceton-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5b**) s označenim ionima produktima $[F1+H]^+$ i $[F2+H]^+$



Slika 17. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 406 heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5c**) s označenim ionima produktima $[F1+H]^+$ i $[F2+H]^+$



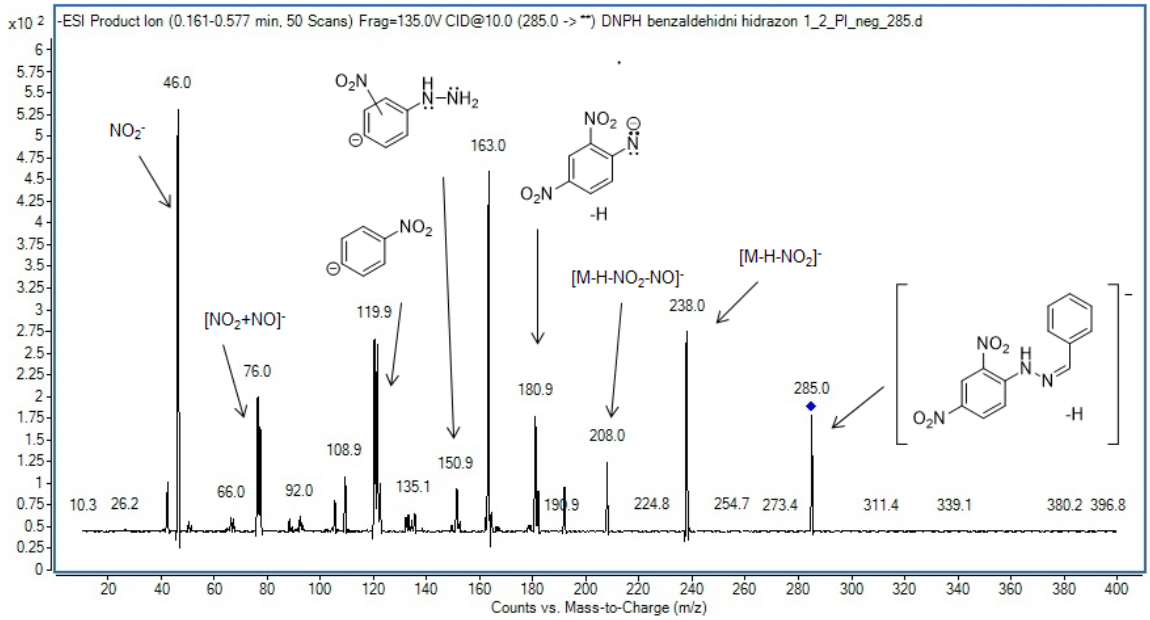
Slika 18. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 488 benzofenon-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5d**) s označenim ionima produktima $[F1+H]^+$ i $[F2+H]^+$



Slika 19. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 428 4-OH-benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5e**) s označenim ionima produktima $[F1+H]^+$ i $[F2+H]^+$

S druge pak strane, karbonil-2,4-DNP-hidrazoni loše ioniziraju. U pozitivnoj ionizaciji uglavnom se vide kao adukti s natrijem, dok u negativnoj ionizaciji nastaju čisti molekulski ioni relativno malog intenziteta. To su kiseli spojevi pa prilikom ionizacije lakše otpuštaju proton nego što ga primaju. $[M+Na]^+$ adukti teško se fragmentiraju, pa je MS/MS analiza provedena uz negativnu ionizaciju na molekulskom ionu $[M-H]^-$. U MS/MS spektru benzaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6a**) (Slika 20.) vidljivi su ioni produkti koji uglavnom

potječu od derivatizacijskog reagensa 2,4-dinitrofenilhidrazina uz dodatno pucanje nitro-skupina koje se ne odcijepe već prilikom ionizacije i pucanje hidrazinske veze reagensa. Isto se može primijetiti na svim sintetiziranim karbonil-2,4-DNP-hidrazonima.



Slika 20. MS/MS spektar molekulskog iona $[M-H]^-$ *m/z* 285 benzaldehid-2,4-DNP-hidrazona (**6a**)

Osim što je ionizacija nastalih produkata otežana, važan faktor zašto se DNPH ne bi trebao koristiti kao derivatizacijski reagens za analizu spojeva LC-MS/MS metodama leži u tome što dobiveni ioni produkti nisu dovoljno strukturno specifični da bi mogli biti upotrijebljeni kao prijelazi u MRM metodama. Točnije, teško se može zaključiti nastaje li pojedini ion produkt fragmentacijom reagensa i/ili derivata pa se stoga taj ion ne može upotrijebiti za razvoj dovoljeno selektivne i osjetljive LC-MS/MS metode, dakle za mjerenja koja se provode u niskim koncentracijama i u složenim matricama.

4.5. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona

Za razvoj MRM metode upotrebljena su dva specifična, ujedno i dva najintenzivnija fragmentna iona, kod derivata **5a** to su ioni produkti *m/z* 211 (kvantifikacijski) i *m/z* 248 (potvrdni).[69]

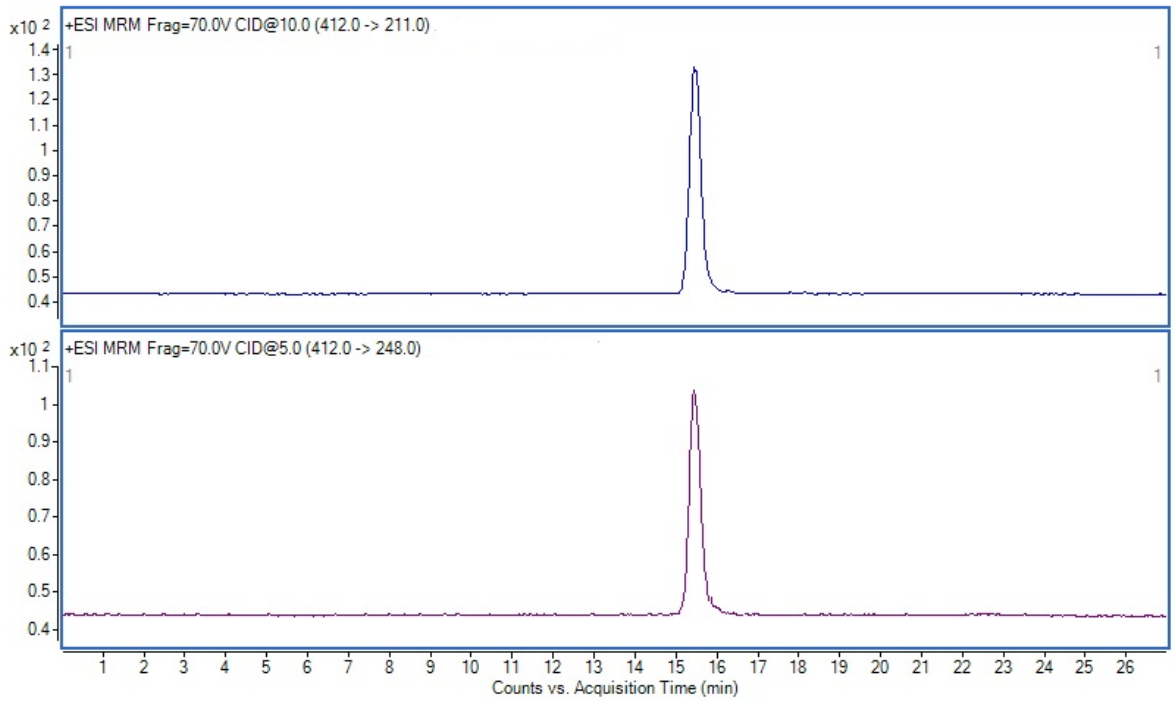
Sintetizirani spojevi dovoljno su hidrofilni za određivanje tekućinskom kromatografijom obrnutih faza. Između ostalih kolona, za kromatografsku analizu odabrana je nepolarna Kinetex C18 kolona na kojoj uz gradijentno eluiranje polarnim otapalima postignuta najbolja rezolucija. Kinetex s malom veličinom čestica optimalna je kolona za spektrometriju masa jer omogućuje korištenje niskih protoka i povećava osjetljivost MS analize.

4.6. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju i priprava modelnih otopina karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona

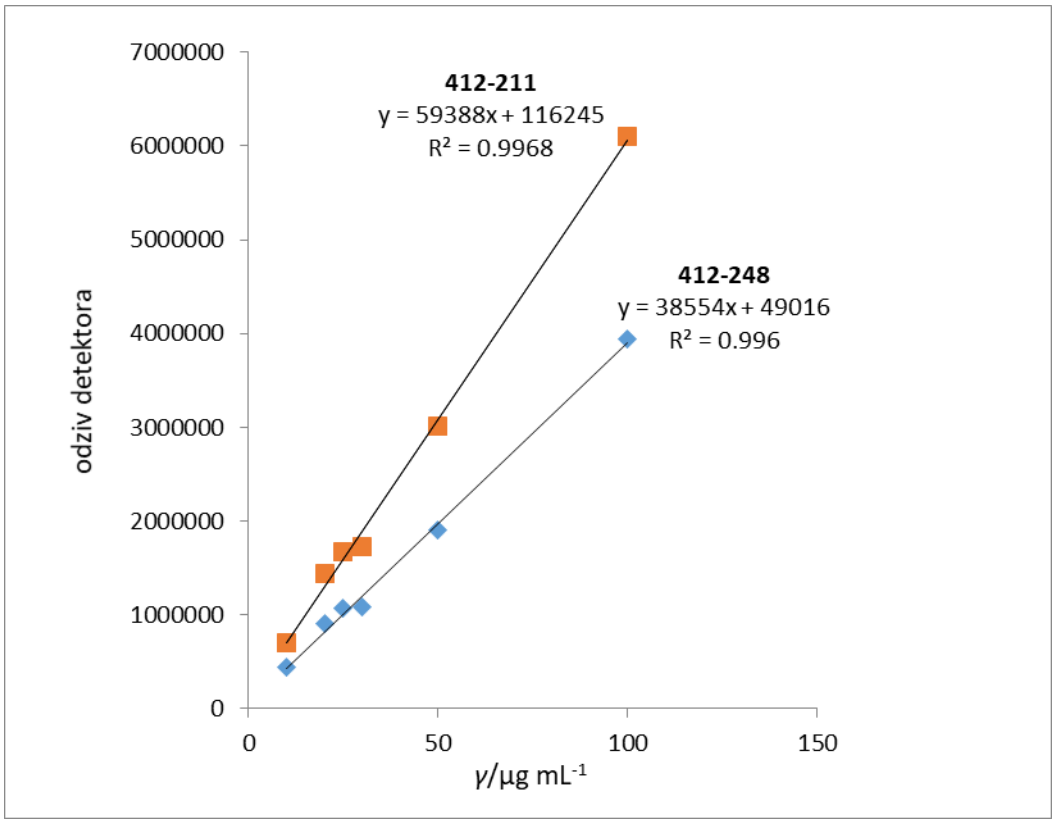
Kako bi se istražili optimalni uvjeti za derivatizaciju karbonila s novim derivatizacijskim reagensom **5**, pripremljena je serija modelnih otopina s benzaldehidom. LC-MS metodom istražena je stabilnost derivatizacijskog reagensa i benzaldehidnog derivata. Reagens **5** i benzaldehidni derivat **5a** stabilni su u smjesi vode, octene kiseline i metanola, pa je ta smjesa otapala odabrana za pripravu modelnih otopina (25 % vode, 7,5% octene kiseline, 67,5 % MeOH). Najbolji prinos derivatizacije dobiven je zakiseljavanjem s octenom kiselinom pri pH 3. Povišena temperatura (60 ^{0}C) utječe na raspad reagensa i zahtjeva duže vrijeme derivatizacije, dok je najveće prinos produkta dobiven pri sobnoj temperaturi nakon 120 minuta.

Nakon dobivanja preliminarnih rezultata pod istim uvjetima provedeni su eksperimenti derivatizacijskog protokola u modelnoj otopini kako bi se utvrdilo da li je derivatizacijska reakcija kvantitativna. Derivatizacijski reagens **5** dobiven je u obliku TFA soli, a utvrđeno je da je optimalni molarni omjer derivatizacijskog reagensa **5** i benzaldehida 7:1 (u eksperimentalne rezultate uračunata je i kontaminacija toluena benzaldehidom koji se koristi kod uparavanja TFA tijekom priprave derivatizacijskog reagensa).

Količina nastalog derivata **5a** određena je preko poznate količine dodanog benzaldehida, prateći na LC-MS/MS ukupnu površinu nastalog produkta (Slika 21.). Stoga je na LC-MS/MS injektirano 10 μL standardnih otopina derivata **5a** u MeOH masenih koncentracija 10 μg mL^{-1}, 20 μg mL^{-1}, 25 μg mL^{-1}, 50 μg mL^{-1} i 100 μg mL^{-1}. Kalibracijski pravac za kvantifikacijski prijelaz dobiven je linearnom regresijom s R^2 vrijednosti 0,9968, a za potvrdni 0,9960 (Slika 22.). Potom je injektirano 10 μL modelne otopine. Nađena nepoznata koncentracija **5a** nakon korekcije iz blanka modelne (pozitivan na produkt zbog kontaminacije toluena benzaldehidom) iznosila je 34,2 μg mL^{-1} te je izračunom utvrđeno da su količina nastalog produkta i dodanog benzaldehida ekvimolarne te da je derivatizacijska reakcija kvantitativna.[69] Isti rezultati dobiveni su kod derivatizacije 4-OH-benzaldehida.



Slika 21. MRM kromatogram benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazona (**5a**)



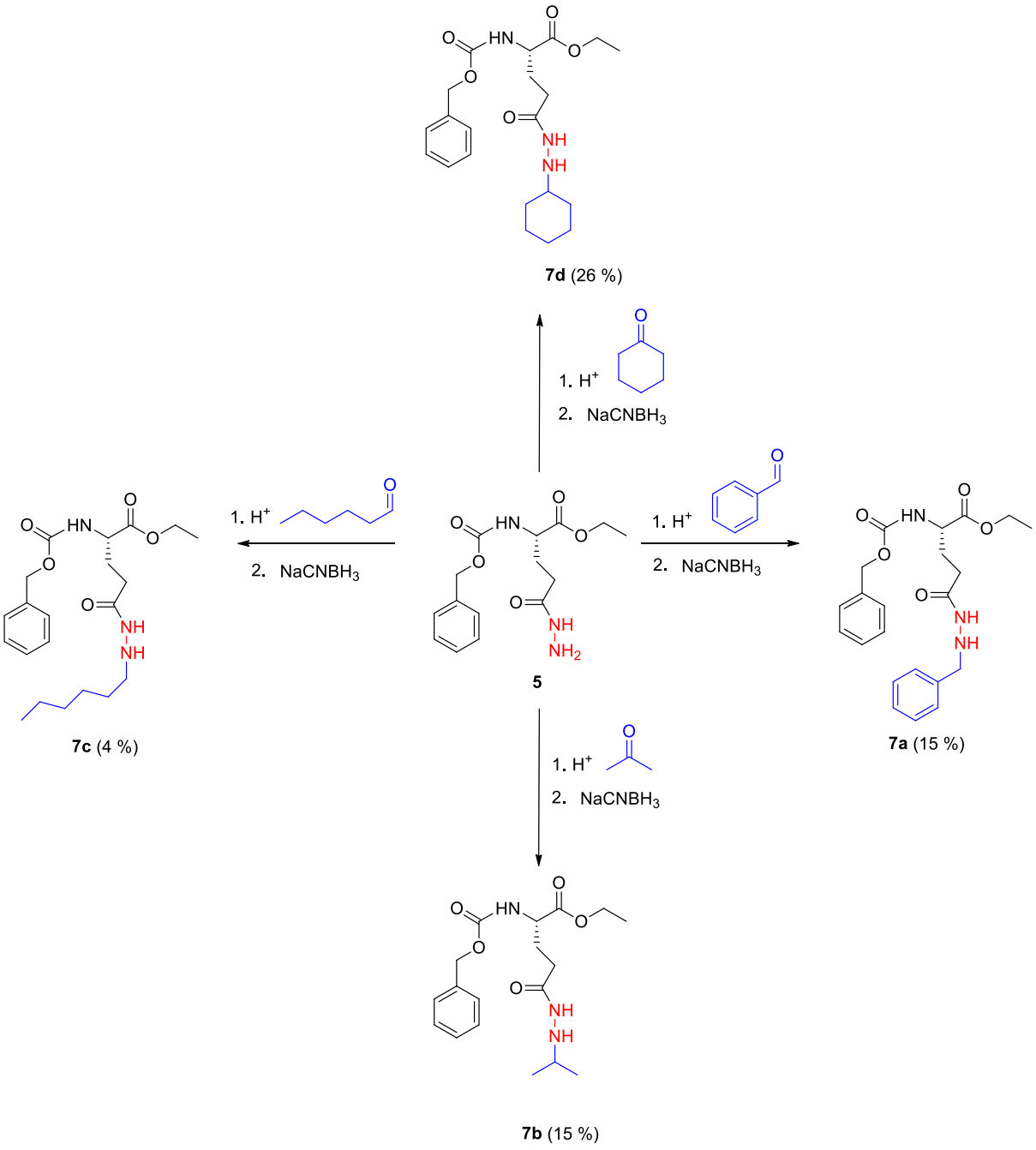
Slika 22. Kalibracijski pravci za benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazon (**5a**) s dva MRM prijelaza: kvantifikacijski 412-211 i potvrdni 412-248

Nakon benzaldehida i analoga istraženi su aceton, heksanal i benzofenon no derivatizacijske reakcije provedene u modelnoj otopini nisu bile kvantitativne. Utvrđeno je da nastali acetonski i heksanalski hidrazoni već u modelnoj otopini, a potom i na kromatografskoj koloni hidroliziraju na hidrazin ako iminska veza nije stabilizirana delokalizacijom elektrona poput aromatskog sustava u slučaju benzaldehidnog derivata.[37] U slučaju benzofenonskog derivata, derivatizacijska reakcija nije kvantitativna zbog lošije reaktivnosti benzofenona.

4.7. Reduktivna aminacija karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona u karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazide

Kako bi povećali stabilnost nastalih produkata i kako bi se isti mogli upotrijebiti kao standardi za istraživanje kvantitativnosti derivatizacijskih reakcija u modelnim otopinama, istražena je redukcija dobivenih hidrazona u hidrazide. Kao redukcijski reagensi istraženi su natrijev borhidrid, Zn u obliku praha i natrijev cijanoborhidrid, između kojih je odabran natrijev cijanoborhidrid jer su njegovim korištenjem dobiveni najviši prinosi hidrazida. Reakcija se sastoji od dva koraka: u prvom, već opisanom stupnju, derivatizacijski reagens reagira s karbonilnim spojem pri čemu nastaje odgovarajući hidrazon, dok je drugi korak redukcija hidrazona u hidrazid bez prethodne izolacije. Reakcija je provedena u acetonitrilu kako bi se smanjila mogućnost raspada hidrazonskog derivata nastalog u prvom stupnju.

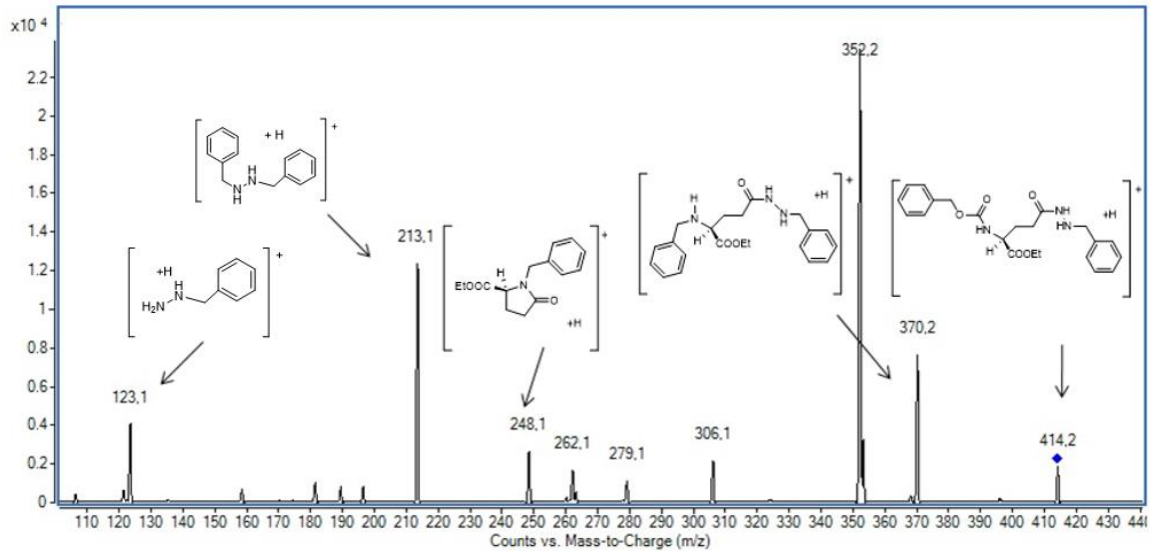
Po opisanom postupku pripravljena su četri hidrazidna derivata: benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7a**), aceton-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7b**), heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7c**) i cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7d**) (Shema 17.). Produkte je bilo teško izolirati taloženjem, stoga su očišćeni i izolirani korištenjem tekućinske kromatografije obrnutih faza uz *homemade* semipreparativnu C18 kolonu i redom dobiveni u malom prinosu. Najveći prinos dobiven je na cikloheksanonskom derivatu **7d** (26 %). Iako je priprava spojeva otežana, dobivene su dovoljne količine derivata koji su se mogli upotrijebiti kao standardi u eksperimentima na modelnim otopinama. Svi sintetizirani spojevi okarakterizirani su spektroskopskim i spektrometrijskim metodama.



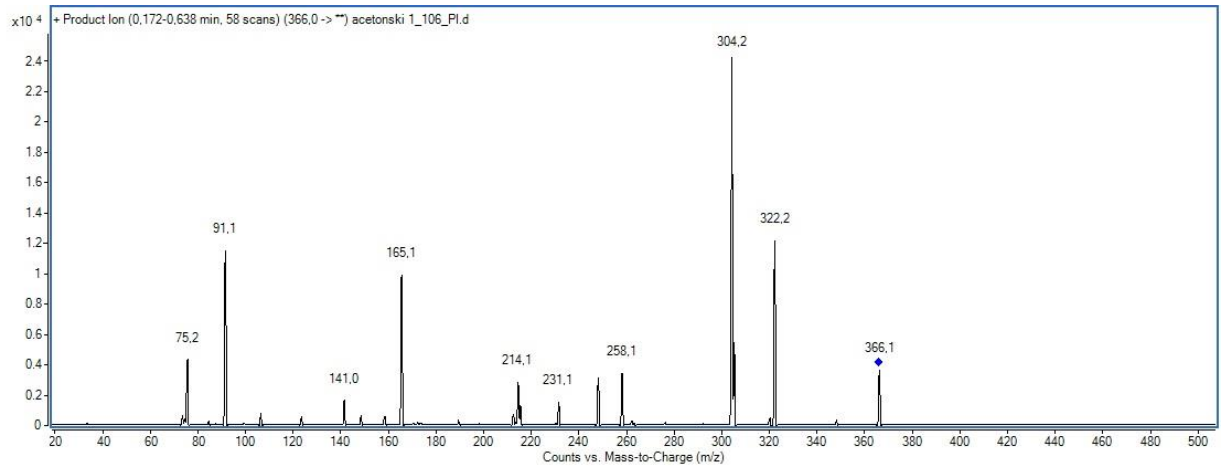
Shema 17. Priprava karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida **7a-7d**

4.8. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida

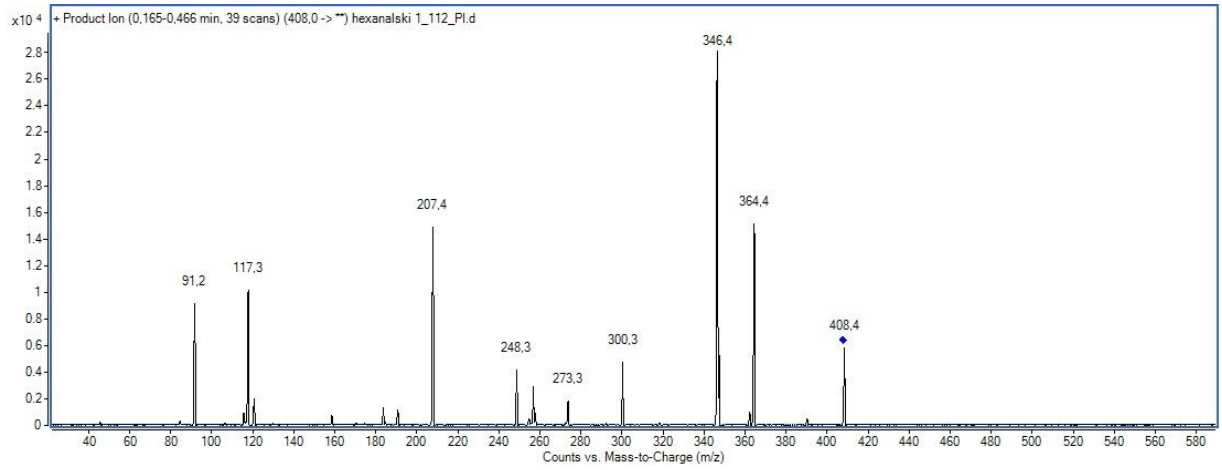
Na primjeru derivata **7a** (Slika 23.) može se vidjeti da hidrazidni produkti pokazuju analognu fragmentaciju s hidrazonima uz 2 Da više. Isti obrazac potvrđen je kod svih sintetiziranih hidrazidnih derivata. Osim toga, svi ioni produkti dobiveni u MS/MS eksperimentima strukturno su vrlo specifični i vrlo upotrijebivi za razvoj MRM metode. **7a** *m/z* 414 daje specifičnu fragmentaciju u MS/MS eksperimentima s najintenzivnijim signalima *m/z* 213 (kvantifikacijski) i *m/z* 123 (potvrdni). Na Slikama 24.-26. dani su MS/MS spektri ostalih pripremljenih hidrazida. Spektrometar masa podešen je prema metodi za hidrazone u koju su uneseni optimirani prijelazi za hidrazide. Kromatografsko razdvajanje provedeno je također na Kinetex C18 koloni. Sastav otapala za gradijentno eluiranje bili su voda i acetonitril kojima je dobivena zadovoljavajuća eluacija svih hidrazidnih derivata.



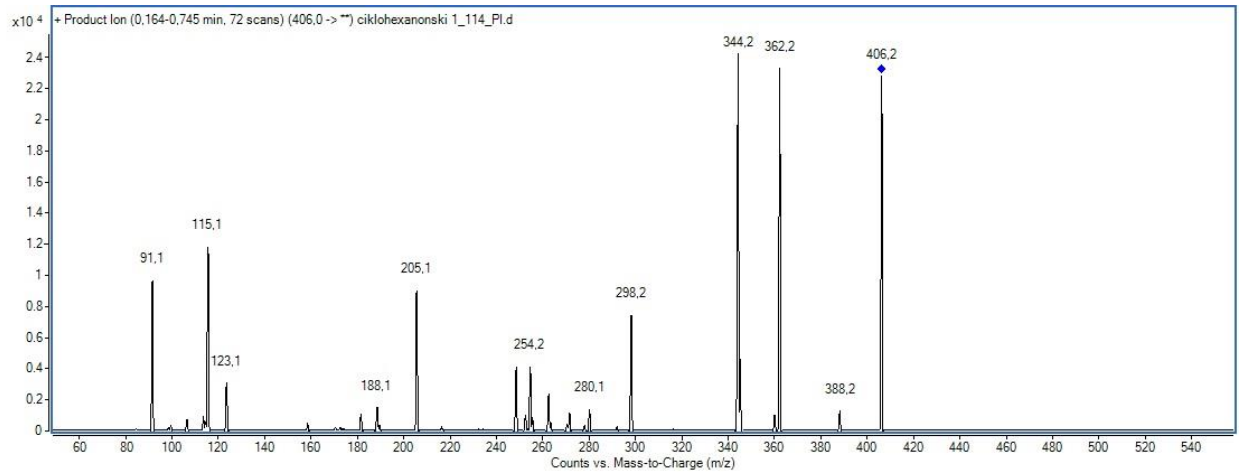
Slika 23. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 414 benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7a**)



Slika 24. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 366 aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7b**)



Slika 25. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 408 heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7c**)



Slika 26. MS/MS spektar molekulskog iona $[M+H]^+$ *m/z* 406 cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7d**)

Parametri spektrometra masa za MRM metodu (energija ionizacije i kolizijska energija) podešeni su pojedinačno za svaki analit sa ciljem dobivanja najvećeg odziva pojedinog MRM signala.

4.9. Optimiranje uvjeta za derivatizaciju i priprava modelnih otopina karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazida

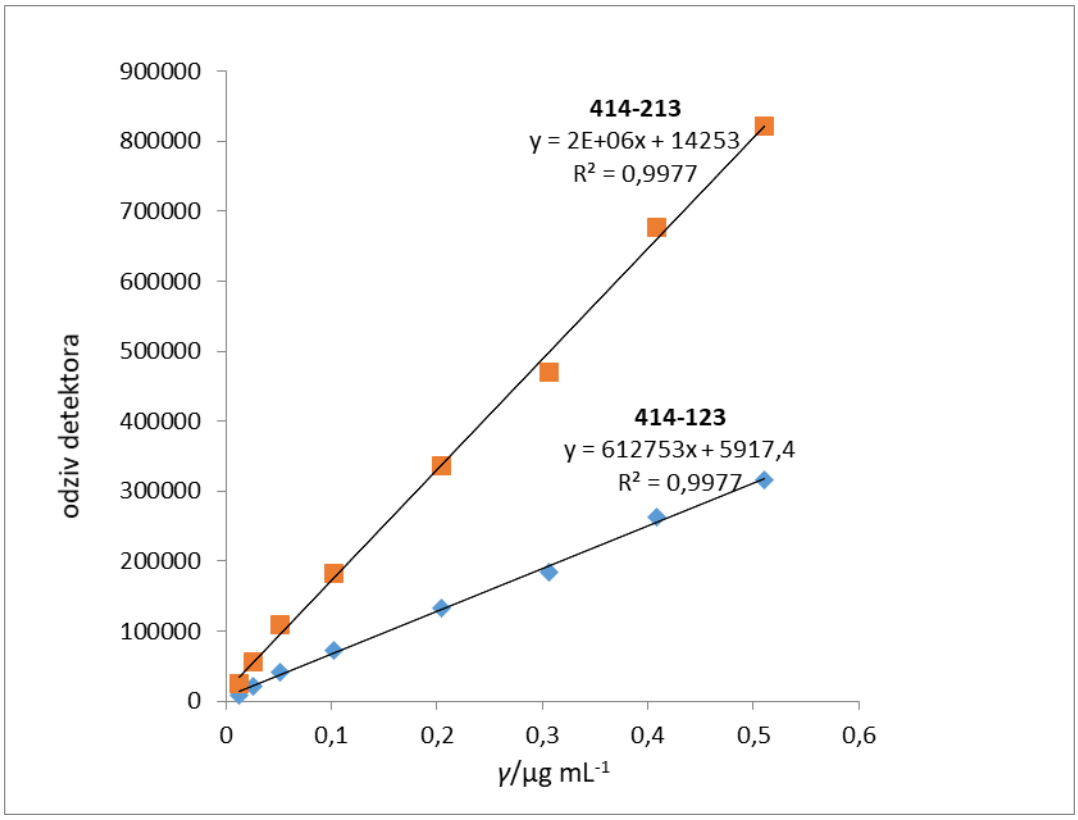
*4.9.1. Modelne otopine benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7a**)*

Derivatizacijske reakcije istražene su na modelnim otopinama *in situ*, ovdje na primjeru nastanka benzaldehidnog derivata.

Istraženi su uvjeti reakcije redukcije koji su se nadovezali na reakciju dobivanja hidrazona. Optimalni molarni omjer derivatizacijskog reagensa i benzaldehida koji je već utvrđen kod modelnih otopina u kojima su praćeni hidrazoni iznosio je 7:1, a reakcija je provedena miješanjem 2 h na sobnoj temperaturi. Optimalni suvišak $NaBH_3CN$ je 100 puta veći u odnosu na reagens, a optimalno vrijeme reakcije redukcije još dodatna 2 h. Također je istražen optimalni pH za provođenje redukcijske reakcije i optimalni volumen octene kiseline u modelnim otopinama. Pri dodatku 7,5 % octene kiseline dobiven je pH 3 koji je optimalan za provedbu reakcije redukcije.

Prema podacima iz Tablice 4 pripravljena je serija kalibracijskih modelnih otopina. Osnovna otopina benzaldehida pripremljena je u acetonitrilu masene koncentracije 0,408 mg mL^{-1}. Miješanjem iste koncentracije derivatizacijskog reagensa (3,05 mg mL^{-1}) i različitih koncentracija benzaldehida u modelnim otopinama dobivene su različite masene koncentracije produkta **5a**, a nakon redukcije produkta **7a**. Svaka modelna otopina korigirana je prema potrebi za pripadajući blank. Uzorci su prije injektiranje razrijeđeni s 10 ekvivalenata smjese koja je korištena kao otapalo za modelne otopine i čini ju 67,5 % ACN, 7,5 % octene kiseline, 25 % vode i velikog suviška $NaBH_3CN$.

Prateći oba MRM prijelaza (kvantifikacijski 414-213 i potvrdni 414-123) konstruirani su kalibracijski pravci u kojima je prikazana ovisnost odziva pojedinog prijelaza u odnosu na koncentraciju dodanog benzaldehida. Na LC-MS/MS injektirano je 10 μL razrijeđenih otopina. Kalibracijski pravaci dobiveni su linearnom regresijom s R^2 vrijednosti 0,9977 za kvantifikacijski i potvrdni prijelaz (Slika 27.). Stabilnosti modelnih otopina su zadovoljavajuće, ponovljive su površine kalibracijske točke u višem i nižem području dobivene odmah po pripravi i nakon čuvanja standardnih otopina 24 h u frižideru.

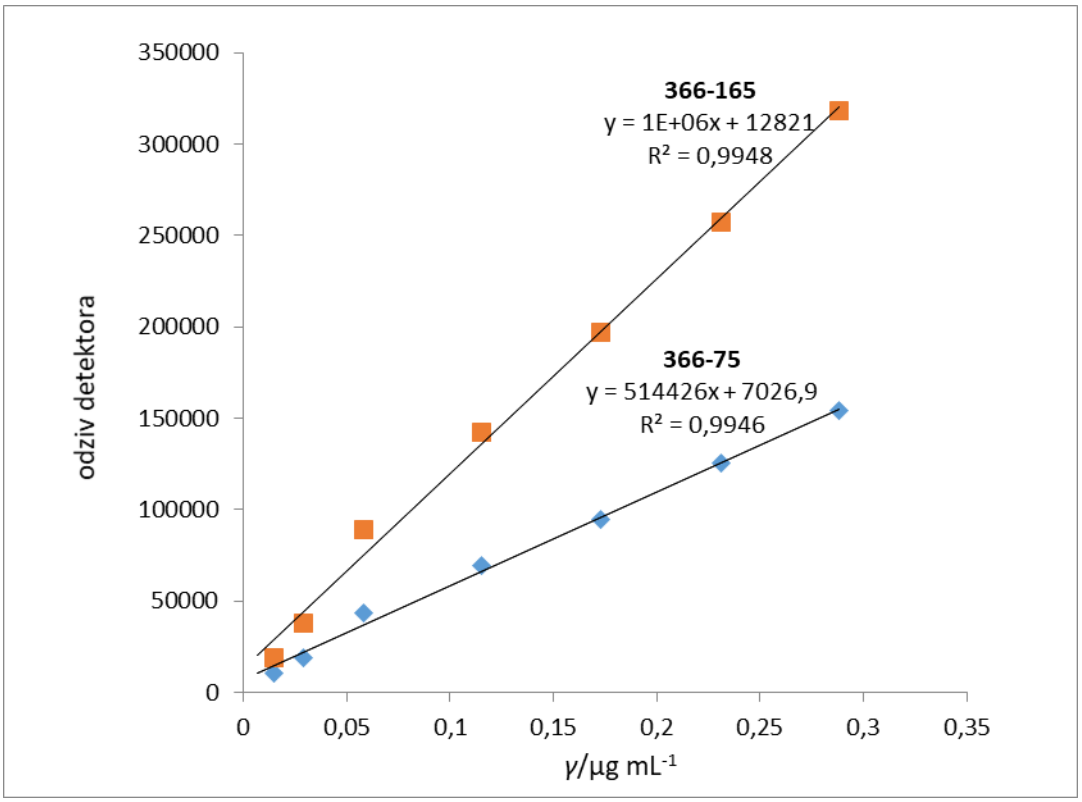


Slika 27. Kalibracijski pravci za modelne otopine benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7a**) s dva MRM prijelaza: kvantifikacijski 414-213 i potvrdni 414-123

*4.9.2. Modelne otopine aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7b**)*

Prema istom protokolu pripremljena je serija modelnih otopina s acetonom Masena koncentracija osnovne otopine acetona pripremljene u acetonitrilu iznosila je 0,231 mg mL^{-1}. Dodatak acetona u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

U MRM metodu uvršteni su optimalni parametri za acetonski derivat **7b**, kvantifikacijski prijelaz *m/z* 366-165 i potvrdni prijelaz *m/z* 366-75 (energija ionizacije 100 V, kolizijska energija 10 eV za *m/z* 366-75 i za *m/z* 366-165). Kalibracijski pravaci dobiveni su linearnom regresijom s R^2 vrijednosti 0,9948 za kvantifikacijski i 0,9946 za potvrdni prijelaz (Slika 28.).

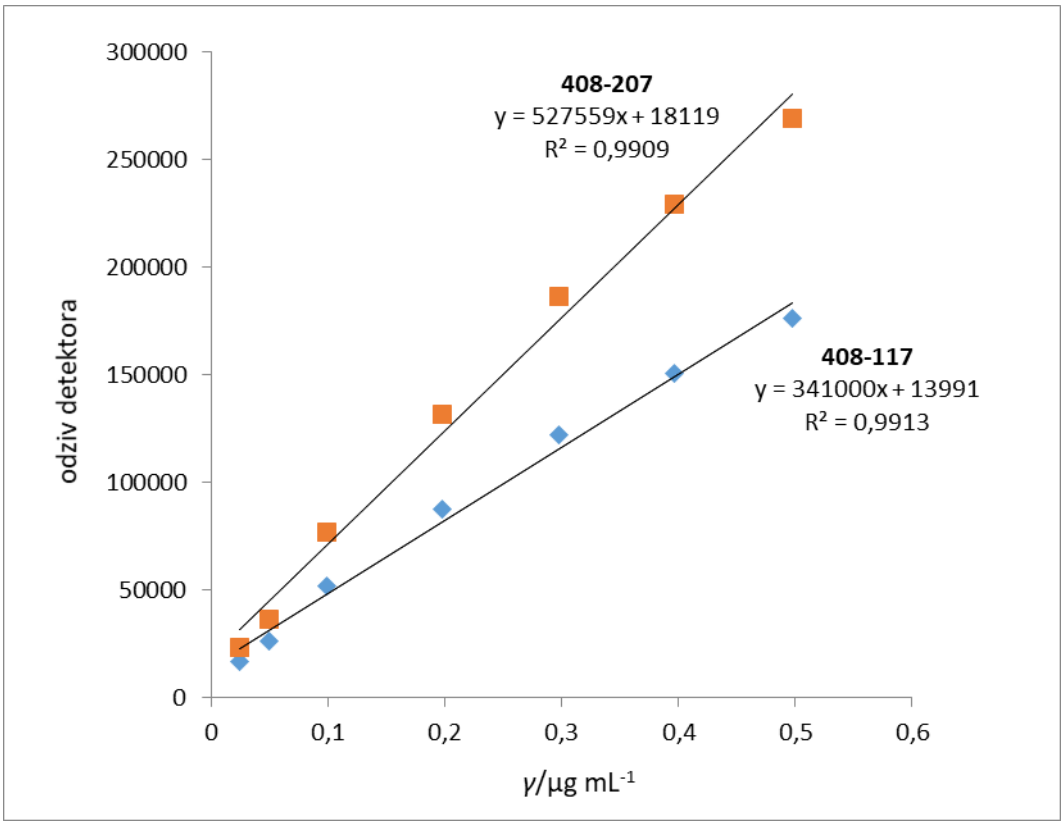


Slika 28. Kalibracijski pravci za modelne otopine aceton-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7b**) s dva MRM prijelaza: kvantifikacijski 366-165 i potvrdni 366-75

*4.9.3. Modelne otopine heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7c**)*

Prema istom protokolu pripremljena je serija modelnih otopina sa heksanalom. Masena koncentracija osnovne otopine heksanala pripremljene u acetonitrilu iznosila je 0,398 mg mL^{-1}. Dodatak heksanala u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

U MRM metodu uvršteni su optimalni parametri za heksanalski derivat **7c**, kvantifikacijski prijelaz *m/z* 408-207 i potvrdni prijelaz *m/z* 408-117 (energija ionizacije 90 V, kolizijska energija 10 eV za *m/z* 408-207 i za *m/z* 408-117). Kalibracijski pravaci dobiveni su linearnom regresijom s R^2 vrijednosti 0,9909 za kvantifikacijski i 0,9913 za potvrdni prijelaz (Slika 29.).

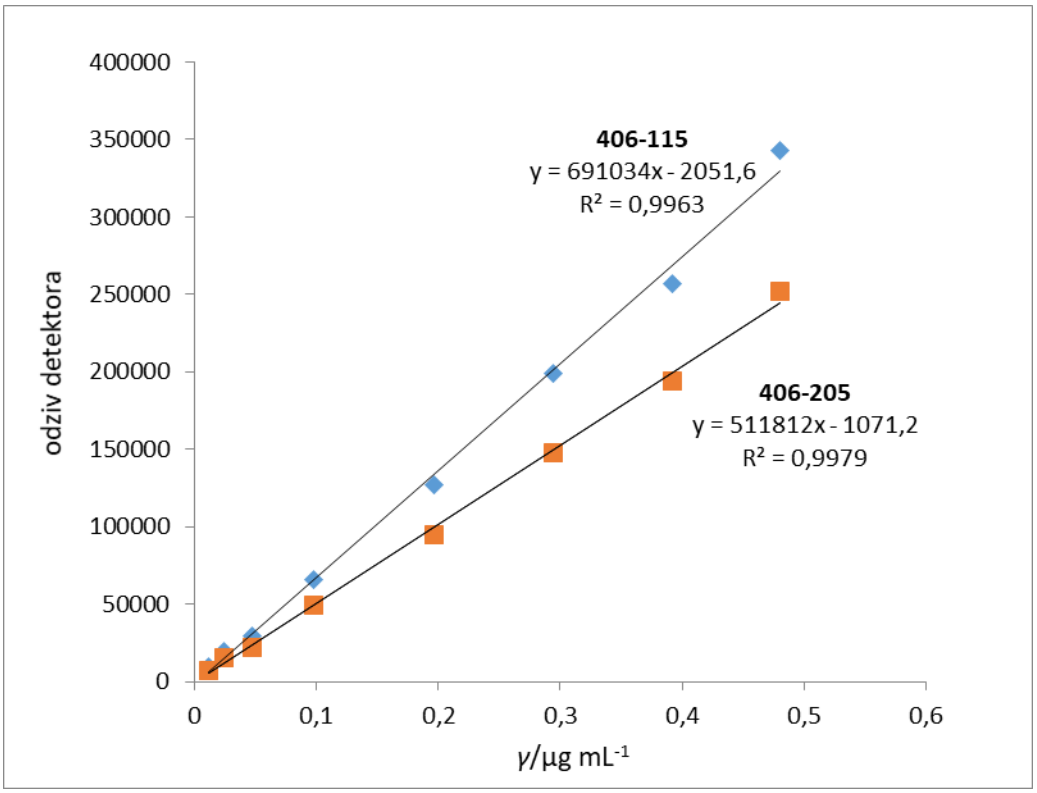


Slika 29. Kalibracijski pravci za modelne otopine heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7c**) s dva MRM prijelaza: kvantifikacijski 408-207 i potvrdni 408-117

*4.9.4. Modelne otopine cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7d**)*

Prema istom protokolu pripremljena je serija modelnih otopina sa cikloheksanonom. Masena koncentracija osnovne otopine cikloheksanona pripremljene u acetonitrilu iznosila je 0,392 mg mL^{-1}. Dodatak cikloheksanona u svakoj modelnoj otopini iznosio je kako slijedi u Tablici 4.

U MRM metodu uvršteni su optimalni parametri za cikloheksanonski derivat **7d**, kvantifikacijski prijelaz *m/z* 406-205 i potvrdni prijelaz *m/z* 406-115 (energija ionizacije 100 V, kolizijska energija 15 eV za *m/z* 406-205 i 10 eV za *m/z* 406-115). Kalibracijski pravaci dobiveni su linearnom regresijom s R^2 vrijednosti 0,9979 za kvantifikacijski i 0,9963 za potvrdni prijelaz (Slika 30.).



Slika 30. Kalibracijski pravci za modelne otopine cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazida (**7d**) s dva MRM prijelaza: kvantifikacijski 406-205 i potvrdni 406-115

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu osmišljen je i pripravljen novi reagens za derivatizaciju karbonilnih spojeva, hidrazino-derivat glutaminske kiseline Z-Glu($NHNH_2$)-OEt (**5)** koji je upotrebljen za određivanje karbonilnih spojeva LC-MS/MS metodom. Derivat je pripremljen korištenjem standardnih metoda peptidne sinteze.

Reakcijom reagensa **5** i odabranih karbonilnih spojeva pripremljena je serija derivata karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona i to: benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazon (**5a**), aceton-Z-Glu-OEt-hidrazon (**5b**), heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazon (**5c**), benzofenon-Z-Glu-OEt-hidrazon (**5d**) i 4-OH-benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazon (**5e**).

Kako bi se povećala stabilnost nastalih produkata provedena je *in situ* reduktivna aminacija karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazona u karbonil-Z-Glu-OEt-hidrazide korištenjem $NaCNBH_3$ i na taj su način dobivena četri hidrazidna derivata: benzaldehid-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7a**), aceton-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7b**), heksanal-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7c**) i cikloheksanon-Z-Glu-OEt-hidrazid (**7d**).

Nastali produkti su izolirani te okarakterizirani spektroskopskim i spektrometrijskim metodama.

Nakon provedene sinteze detaljno su istražena ponašanja nastalih hidrazonskih (**5**a-**5e**) i hidrazidnih (**7**a-**7d**) derivata u MS i MS/MS eksperimentima. Osim što dobro ioniziraju, obje vrste derivata u koliziji induciranoj disocijaciji pokazuju brojne i vrlo specifične ione produkte, koji su zatim upotrijebljeni za razvoj LC-MS/MS metode kojom je moguće pratiti karbonilne spojeve u nižim koncentracijama i u složenim matricama. Istraženi su i optimirani reakcijski uvjeti koji su osigurali kvantitativnost derivatizacijske reakcije.

Za usporedbu, sintetizirani su i okarakterizirani produkti odabranih karbonilnih spojeva s najčešće korištenim reagensom za derivatizaciju karbonilnih spojeva, 2,4-dinitrofenilhidrazinom pri čemu su dobiveni benzaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6a**), propanal-2,4-DNP-hidrazon (**6b**), aceton-2,4-DNP-hidrazon (**6c**), cikloheksanon-2,4-DNP-hidrazon (**6d**), heksanal-2,4-DNP-hidrazon (**6e**), 3-oktanon-2,4-DNP-hidrazon (**6f**), formaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6g**), acetaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6h**), 3-OH-benzaldehid-2,4-DNP-hidrazon (**6i**) i metilglioksal-2,4-DNP-hidrazon (**6j**).

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

ACN	acetonitril
APT	*J*-modulirana spinska jeka (engl. *attached proton test*)
AcOH	octena kiselina
$CDCl_3$	deuterirani kloroform
CD_3CN	deuterirani acetonitril
CH_2Cl_2	diklormetan
CID	kolizijom inducirana disocijacija (engl. *collision induced dissociation)*
DMSO-d_6	deuterirani dimetilsulfoksid
DMF	dimetilformamid
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DNP-hidrazid	2,4-dinitrofenilhidrazid
DNP-hidrazon	2,4-dinitrofenilhidrazon
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjam (engl. *electrospray ionization*)
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
FA	mravlja kiselina
Glu	glutaminska kiselina
Glu-hidrazid	hidrazid derivata glutaminske kiseline
Glu-hidrazon	hidrazon derivata glutaminske kiseline
HPLC-UV	vezani sustav tekućinska kromatografija visoke razlučivosti - detekcija ultraljubičastim zračenjem (engl. *high performance liquid chromatography-ultraviolet detection*)
HRMS	spektrometrija mase visoke razlučivosti (engl. *high resolution mass spectrometry*)
H_2SO_4	sumporna kiselina
LC-MS/MS	vezani sustav tekućinska kromatografija-tandemna spektromatrija masa (eng. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)
MeOH	metanol
MRM	praćenje višestrukih reakcija (engl. *multiple reaction*

	monitoring)
MS	spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)
$NaBH_3CN$	natrijev cijanoborhidrid
$NaHCO_3$	natrijev hidrogenkarbonat
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*)
SIM	praćenje odabranog iona (eng. *selected ion monitoring*)
SRM	praćenje odabranih reakcija (engl. *selected reaction monitoring*)
TFA	trifloroctena kiselina
QQQ	trostruki kvadrupol

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. N. Neng, J. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 3155–3163.
2. W. Huang, G. Fang, C. Wang, *Science of the Total Environment* **345** (2005) 261–272.
3. T. Salthammer, S. Mentese, R. Marutzky, *Chem. Rev.* **110** (2010) 2536–2572.
4. V. Osorio, Z. Cardeal, *J. Braz. Chem. Soc.* **24** (2013) 1711–1718.
5. G. A. Cordis, D. K. Das, W. Riedel, *J. Chromatogr. A* **798** (1998) 117–123.
6. S. Uchiyama, Y. Inaba, N. Kunugita, *J. Chromatogr. B* **879** (2011) 1282–1289.
7. Y. Chi, Y. Feng, S. Wen, H. Lü, Z. Yu, W. Zhang, G. Sheng, J. Fu, *Talanta* **72** (2007) 539–545.
8. M. Vogel, A. Büldt, U. Karst, *Fresenius J. Anal. Chem.* **366** (2000) 781–791.
9. X. Q. Qiao, R. Wang, L. H. Zhang, G. L. Yang, Y. K. Zhang, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **40** (2012) 1123–1129.
10. C. F. H. Allen, J. H. Richmond, *J. Org. Chem.* **02** (1937) 222–226.
11. O. L. Brady, *J. Chem. Soc.* **0** (1931) 756–759.
12. C. E. Baños, M. Silva, *Talanta* **77** (2009) 1597–1602.
13. J. E. Szulejko, K. H. Kim, *Trends in Analytical Chemistry* **64** (2015) 29–41.
14. Y. Lin, P. Wang, L. Hsieh, K. Ku, Y. Yeh, C. Wu, *Journal of Chromatography A* **1216** (2009) 6377–6381.
15. S. de M. Ochs, M. Fasciotti, R. P. Barreto, N. G. de Figueiredo, F. C. Albuquerque, M. C. G. Pontes Massa, I. Gabardo, A. D. P. Netto, *Talanta* **81** (2010) 521–529.
16. T. Santa, *Biomed. Chromatogr.* **25 (**2011) 1–10.
17. C. Zwiener, T. Glauner, F. H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* **372** (2002) 615–621.
18. C. E. Baños, M. Silva, *J. Chromatogr. B* **878** (2010) 653–658.
19. A. Yasuhara, Y. Tanaka, M. Makishima, S. Suzuki, T. Shibamoto, *J. Chromatograph. Separat. Techniq* **2** (2011) 108–113.
20. T. Higashi, S. Ogawa, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **162 (**2016) 57–69.
21. T. Santa, O. Y. Al-Dirbashi, T. Fukushima, *Drug Discov. Ther.* **1 (**2007) 108–118.
22. T. Santa, *Drug Discov. Ther.* **7** (2013) 9–17.
23. D. Borrey, E. Moerman, A. Cockx, V.Engelrelst, M. R. Langlois, *Clinica Chimica Acta* **382** (2007) 134–137.
24. M. Kushnir, A. Rockwood, W. Roberts, E. Pattison, W. Owen, A. Bunker, A. Meikle, *Clinical Chemistry* **52** (2006) 1559–1567.

25. M. S. Rashed, L. Y. Al-Ahaidib, O. Y. Al-Dirbashi, M. Al Amoudi, M. M.A. Al-Sayed, Z. Rahbeeni, Z. Al-Hassnan, A. Al-Dbaas, M. Al-Owain, M. Ni Luanaigh, *Anal. Biochem.* **339** (2005) 310–317.
26. C. C. Lai, C. H. Tsai, F. J Tsai, C. C. Lee, W. D. Lin, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **15** (2001) 2145–2151.
27. H. Hong, Y. Wang, *Anal Chem.* **79** (2007) 322–326.
28. H. L. Lorda, J. Rosenfelda, V. Volovicha, D. Kumbhareb, B. Parkinson, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1292–1298.
29. O. Y. Al-Dirbashia, M. S. Rashed, H. J. T. Brink, C. Jakobs, N. Filimban, L. Y. Al-Ahaidib, M. Jacob, M. M. Al-Sayed, Z. Al-Hassnan, E. Faqeih, *J. Chromatogr. B* **831** (2006) 274–280.
30. I. C. O'Brien-Coker, G. P. A. I. Mallet, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **15** (2001) 920–928.
31. H. J. Kim, H.S. Shin, *Analytica Chimica Acta* **702** (2011) 225– 232.
32. T. Higashi, A. Yamauchi, K. Shimada, *J. Chromatogr. B* **825** (2005) 214–222.
33. T. Santa, O, Y. Al-Dirbashi, T. Ichibangase, M. S. Rashed, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* **22** (2008) 115–118.
34. Z. Sun, X. Wang, Y. Cai, J. Fu, J. You, *Talanta* **120** (2014) 84–93.
35. N. Guo, C. Peng, Q. Zhu, B. F. Yuan, Y. Q. Feng, *Anal. Chim. Acta*. **967** (2017) 42–51.
36. S. Uchiyama, M. Ando, S. Aoyagi, *J. Chromatogr. A* **95** (2003) 95–102.
37. J. Kalia, R. Raines, *Angew. Chem.* **47** (2008) 7523–7526.
38. S. Uchiyama, Y. Inaba, M. Matsumoto, G. Suzuki, *Anal Chem.* **81** (2009) 485-489.
39. M. Periasamy, M. Thirumalaikumar, *J. Organomet. Chem.* **609** (2000) 137–151.
40. R .F. Borch, A. I. Hassid, *J. Org. Chem.* **37** (1972) 1673–1674.
41. R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **93** (1971) 2897–2904.
42. J. Zhang, P. G. Blazecka, J. G. Davidson, *Org. Lett.* **5** (2003) 553–556.
43. A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff,, R. D. Shah, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 3849–3862.
44. A. Pelter, R. M. Rosser, S. Mills, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** (1984) 717–720.
45. M. D. Bomann, I. C. Guch, M. DiMare, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 5995–5996.
46. B. C. Ranu, A. Majee, A. Sarkar, *J. Org. Chem.* **63** (1998) 370–373.

47. G. B. Giovenzana, D. Imperio, A. Penoni, G. Palmisano, *Beilstein J. Org. Chem.* **7 (**2011) 1095–1099.
48. T. Tsukinoki, Y. Mitoma, S. Nagashima, T. Kawaji, I. Hashimoto, M. Tashiro, *Tetrahedron Letters* **39** (1998) 8873-8876.
49. D. Zimmer, *Chromatographia* **57** (2003) S325–S332.
50. R. Kostiainen, T. J. Kauppila, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 685–699.
51. T. M. Annesley, *Clin. Chem.* **49 (**2003) 1041–1044.
52. C. R. Mallet, Z. Lu, J. R. Mazzeo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18 (**2004) 49–58.
53. A. Cappiello, G. Famiglini, L. Rossi and M. Magnani, *Anal. Chem*, **69** (1997) 5136–5141.
54. V. S. Mannur, D. Patel, V. S. Mastiholimath, G. Shah, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **6** (2011) 34–37.
55. C. S. Ho, C. W. K Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen, and H. L. Tai, *Clin. Biochem. Rev.* **24** (2003) 3–12.
56. J. A. Syage, S. S. Cai, L. C. Short, *LCGC North America* **26** (2008) 286–296.
57. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina* **45** (2009) 218–232.
58. https://www.slideshare.net/amitpatel745/instrumentation-and-application-of-lcmsms-in-bioanalysis (preuzeto 10. rujna 2017.)
59. C. J. Krusemark, B. L. Frey, P. J. Belshaw, L. M. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20** (2009) 1617–1625.
60. A. Kruve, K. Kaupmees, J. Liigand, M. Oss, I. Leito, *J. Mass Spectrom.* **48** (2013) 695–702.
61. K. A. Mortiera, G. F. Zhang, C. H. Van Peteghem, W. E. Lambert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15** (2004) 585–592.
62. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf (preuzeto 20. rujna 2017.)
63. https://www.scribd.com/presentation/108674069/Tandem-MS-for-Drug-Analysis-Lecture (preuzeto 20. rujna 2017.)
64. http://slideplayer.com/slide/3835833/ (preuzeto 20 rujna 2017.)
65. H. Lee, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **28** (2007) 1161–1202.
66. M. Gredičak, A. Kolonić, I. Jerić, *Amino Acids* **35** (2008) 185–194.

67. V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang, G. Cheng, *Methods* **35** (2005) 211–222.

68. S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedro*n **60** (2004) 2447–2467.

69. L. Brkljačić, I. Jerić, *J. Mass Spectrom.* **53** (2018) 649-654.

70. T. Aplin, J. H. Jones, *Chem. Commun.* **0** (1966) 794–796.

71. B. Danieli, F. M. Rubino, A. Cremonesi, *Org. Mass Spectrom.* **24** (1989) 225–229.

72. E. Mammoliti, G. Sindona, N. Uccella, *Org. Mass Spectrom.* **27** (1992) 495–501.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime:	Lidija Brkljačić
Datum rođenja:	09. srpnja 1978.
Mjesto i država rođenja:	Zagreb, Hrvatska
E-mail adresa:	lidija.brkljacic@irb.hr

Obrazovanje

2008. − 2018.	Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij, područje prirodnih znanosti, polje kemija, grana analitička kemija
1996. − 2003.	Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer: diplomirani inženjer kemije
1992. − 1996.	VII. Gimnazija, Zagreb, smjer: opći
1986. − 1992.	Osnovna škola Ivan Filipović, Zagreb

Radno iskustvo

05/2017. − danas	viši stručni suradnik u Institutu Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomimetičku kemiju
10/2010. – 05/2017.	stručni suradnik u Institutu Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomimetičku kemiju
08/2007. – 06/2010.	organski sintetičar/analitičar u Chirallica d.o.o.
02/2006. – 08/2007.	stručni suradnik u Institutu Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za biogeokemiju organskih spojeva
06/2004. – 02/2006.	tehnolog u Inkeru d.d.

Članstvo

Hrvatsko kemijsko društvo

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima

1. L. Brkljačić, I. Jerić, *"Glutamic acid-related hydrazine reagent for the derivatization of carbonyl compounds", J. Mass Spectrom.* **53** (2018) 649-654.

2. I. Đapić, R. Kobetic, L. Brkljačić, S. Kezić, I. Jakaša, *"Quantification of free fatty acids in human stratum corneum using tandem mass spectrometry and surrogate analyte approach", Biomed Chromatogr.* **32** (2018) doi: 10.1002/bmc.4056.
3. D. Dabić, Dario, L. Brkljačić, T. Tandarić, M. Žinić, R. Vianello, L. Frkanec, R. Kobetić, *"The Metal Effect on Self-Assembling of Oxalamide Gelators Explored by Mass Spectrometry and DFT Calculations", J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **29** (2018) 103–113.
4. I. Kopriva, I. Jerić, L. Brkljačić, *"Explicit-Implicit Mapping Approach to Nonlinear Blind Separation of Sparse Nonnegative Dependent Sources from a Single-Mixture: Pure Component Extraction from Nonlinear Mixture Mass Spectra", Journal of chemometrics* **29** (2015) 615–626.
5. I. Kopriva, I. Jerić, M. Filipović, L. Brkljačić, *"Empirical Kernel Map Approach to Nonlinear Underdetermined Blind Separation of Sparse Nonnegative Dependent Sources: Pure Components Extraction from Nonlinear Mixtures Mass Spectra", Journal of chemometrics* **28** (2014) 704–715.
6. I. Kopriva, I. Jerić, L. Brkljačić, *"Nonlinear Mixture-wise Expansion Approach to Underdetermined Blind Separation of Nonnegative Dependent Sources", Journal of chemometrics* **27** (2013) 189–197.
7. L. Brkljačić, M. Sabalić, I. Salarić, I. Jerić, I. Alajbeg, I. Nemet, *"Development and validation of a liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the quantification of opiorphin in human saliva", Journal of chromatography B* **879** (2011) 3920-3926.

Sažetci u zbornicima skupova

1. I. Jerić, L. Brkljačić, I. Kopriva, *"Computationally efficient separation of large number of analytes from small number of mixture mass spectra", 18th edition of EuroAnalysis The European Conference on Analytical Chemistry*, Bordeaux, Francuska, 2015 (znanstveni skupovi i radionice, poster).
2. L. Brkljačić, I. Jerić, *"Glutamic acid-derived hydrazine reagent for derivatization of carbonyl compounds", X . Susret mladih kemijskih inženjera*, Zagreb, Hrvatska, 2014 (znanstveni skupovi i radionice, usmeno)

3. I. Đapić, L. Brkljačić, I. Jakaša, S. Kežić, R. Kobetić, *"LC-ESI-MS characterization of free fatty acids in human stratum corneum", X . Susret mladih kemijskih inženjera*, Zagreb, Hrvatska, 2014 (znanstveni skupovi i radionice, poster).
4. L. Brkljačić, M. Sabalić, I Salarić, I. Alajbeg, I. Jerić, I. Nemet, *"Development and validation of LC–MS/MS method for the quantification of opiorphin in human saliva", 13. međunarodna škola kromatografije*, Zagreb, Hrvatska, 2012 (znanstveni skupovi i radionice, poster).
5. M. Sabalić, L. Brkljačić, I Salarić, I. Alajbeg, I. Jerić, I. Nemet, *"Salivary opiorphin as a potential marker of oral disease", EAOM* Athens, Grčka, 2012 (znanstveni skupovi i radionice, poster).

Znanstvena suradnja

2004. – 2007. suradnica na EU FP6 projektu *Reduction of environmental risks, posed by emerging contaminants, through advanced treatment of municipal and industrial wastewaters (EMCO)* (voditelj dr. Marijan Ahel).

2012. – 2015. suradnica na HRZZ projektu *Analiza nelinearnih komponenata s primjenama u kemometriji i patologiji* (voditelj dr. Ivica Kopriva).

2015. – 2019. suradnica na HRZZ projektu *Višekomponentne reakcije u sintezi peptidnih mimetika (MIMICRy)* (voditelj dr. Ivanka Jerić).

2017. – 2021. suradnica na HRZZ projektu *Strukturne dekompozicije empirijskih podataka za računalno potpomognutu dijagnostiku bolesti* (voditelj dr. Ivica Kopriva).

Sudjelovanje u nastavi

Sudjelovanje u nastavi kolegija Praktikum iz opće kemije (asistent), Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012, preddiplomski studij biologije i kemije.

Strani jezici

Engleski jezik: aktivno u govoru i pismu.

Njemački jezik: pasivno u govoru i pismu.