

Sinteza kiralnih 3,5-disuostituiranih i fenilamino derivata parazoantina A i F iz beta-laktama: eneantoseparacija, apsolutna konfiguracija i biološka aktivnost

Jurin, Mladenka

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:965908>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-28**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



Sveučilište u Splitu
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Mladenka Jurin

**SINTEZA KIRALNIH 3,5-
DISUPSTITUIRANIH HIDANTOINA I
FENILAMINO-DERIVATA PARAZOANTINA
A I F IZ BETA-LAKTAMA:
ENANTIOSEPARACIJA, APSOLUTNA
KONFIGURACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2021.

University of Split
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Mladenka Jurin

**SYNTHESIS OF CHIRAL 3,5-
DISUBSTITUTED HYDANTOINS AND
PHENYLAMINO DERIVATIVES OF
PARAZOANTHINES A AND F FROM BETA-
LACTAMS: ENANTIOSEPARATION,
ABSOLUTE CONFIGURATION AND
BIOLOGICAL ACTIVITY**

DOCTORAL THESIS

Split, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Mladenka Jurin

**SINTEZA KIRALNIH 3,5-
DISUPSTITUIRANIH HIDANTOINA I
FENILAMINO-DERIVATA PARAZOANTINA
A I F IZ BETA-LAKTAMA:
ENANTIOSEPARACIJA, APSOLUTNA
KONFIGURACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Marin Roje

Split, 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Mladenka Jurin

**SYNTHESIS OF CHIRAL 3,5-
DISUBSTITUTED HYDANTOINS AND
PHENYLAMINO DERIVATIVES OF
PARAZOANTHINES A AND F FROM BETA-
LACTAMS: ENANTIOSEPARATION,
ABSOLUTE CONFIGURATION AND
BIOLOGICAL ACTIVITY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Dr. Marin Roje, associate professor

Split, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Pristupnica **Mladenka Jurin**, dipl. ing. kemije

predala je dana: _____ doktorsku disertaciju izrađenu pod mentorstvom
izv. prof. dr. sc. Marina Roje (viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković)

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Igor Jerković, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Izv. prof. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Dr. sc. Maja Majerić Elenkov, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

povoljno je ocijenilo disertaciju, a Fakultetsko vijeće je na sjednici dana _____
prihvatilo ocjenu i odobrilo obranu pred povjerenstvom u sljedećem sastavu:

Prof. dr. sc. Igor Jerković, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Izv. prof. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Dr. sc. Andreja Jakas, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Obrana doktorske disertacije održat će se dana: _____

Dekan

UDK:	547 – 318 (043.3)
Znanstveno područje:	prirodne znanosti
Znanstveno polje:	polje kemija
Znanstvena grana:	organska kemija
Institucija:	Institut Ruđer Bošković, Zavod za kemiju materijala, Laboratorij za biotehnologiju u akvakulturi
Voditelj rada:	Izv. prof. dr. sc. Marin Roje, viši znanstveni suradnik
Broj stranica:	269
Broj shema:	48
Broj slika:	57
Broj tablica:	24
Broj literaturnih referenci:	240
Datum obrane:	2. srpnja 2021.
Sastav povjerenstva za obranu:	Prof. dr. sc. Igor Jerković, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu Dr. sc. Andreja Jakas, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Rad je pohranjen u:	Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35; Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Ruđera Boškovića 31; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb.

Tema rada prihvaćena je na 30. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, održanoj dana 4. studenog 2019. godine.

Zahvale

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Marinu Roji na odabiru teme, stručnom vodstvu, korisnim savjetima i raspravama te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Od srca zahvaljujem dr. sc. Rozelindri Čož-Rakovac, voditeljici projekta "Bioprospecting Jadranskog mora - BioProCro", koja je omogućila da u sklopu projekta provedem ovo istraživanje. Hvala Vam što ste mi dopustili da ovo istraživanje provedem pod vodstvom mentora izv. prof. dr. sc. Marina Roje.

Zahvaljujem članovima Povjerenstva za ocjenu doktorske disertacije prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću, izv. prof. dr. sc. Ani Radonić i dr. sc. Maji Majerić Elenkov koji su svojim savjetima pridonijeli da ova disertacija bude što kvalitetnija.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Vesni Sokol, voditeljici poslijediplomskog sveučilišnog dokorskog studija Kemija mediteranskog okoliša, koja mi je svojim savjetima i uputama puno pomogla.

Zahvaljujem dr. sc. Andreji Lesac, voditeljici Laboratorija za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković što je dopustila da dio eksperimentalnog rada izradim u njenom laboratoriju. Hvala i svim ostalim članovima laboratorija koji su mi pomogli, svatko na svoj način, kroz cijelo vrijeme izrade ovog rada.

Posebno hvala mojim kolegama iz Labosa 138, dr. sc. Darku Kontrecu, Anđeli Buljan, Antoniji Ožegović i Robertu Junioru Kelmanu na nesebičnoj pomoći, vremenu koje su odvojili za mene tijekom izrade ovog rada te na ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem dr. sc. Višnji Stepanić na in silico predviđanju ADMET parametara trans- β -laktamskih urea, 3,5-disupstituiranih hidantoina i parazoantina, na nesebičnom prijenosu znanja, pomoći i vrijednim sugestijama tijekom pisanja in silico karakterizacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Gennaru Pescitelli sa Zavoda za kemiju Sveučilišta u Pizi na određivanju apsolutnih konfiguracije 3-amino- β -laktama i 3,5-disupstituiranih hidantoina primjenom TDDFT matematičke metode.

Zahvaljujem kolegama dr. sc. Krunoslavu Bojaniću i Denisu Vadlja, mag. ing. bioproc., na ispitivanju antimicrobne aktivnosti pripremljenih β -laktamskih urea.

Zahvaljujem dr. sc. Tomislavu Portadi za pomoć kod nomenklature sintetiziranih spojeva.

Zahvaljujem dr. sc. Miranu Čoklo i dr. sc. Lejli Ferhatović Hamzić s Instituta za antropologiju na HR-MS analizama.

Zahvaljujem dr. sc. Marku Marjanoviću iz Biocentra na ispitivanju antitumorske aktivnosti pripremljenih spojeva.

Zahvaljujem dr. sc. Vjekoslavu Štruilu na snimanju FTIR-ATR spektara.

Zahvaljujem dr. sc. Mariji Matković na snimljenim CD spektrima hidantoina.

Zahvaljujem Marceli Šikić, univ. bacc. chem. na određivanje tališta pripremljenih spojeva.

Zahvaljujem Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković na snimljenim spektrima tijekom izrade ovog rada, a posebno dr. sc. Ani Čikoš na korisnim diskusijama i velikoj pomoći pri interpretaciji 2D NMR spektara.

Hvala mojim prijateljima na moralnoj podršci i razumijevanju, hvala što su tu uz mene, usprkos tome što sam ih često zapostavljala zbog posla. Žao mi je zbog toga i nastojat ću to ispraviti.

Veliko hvala mojoj mami i sestrama koje su moj stup podrške, pomoći i moja sigurna luka. Zahvaljujem im što su uvijek vjerovala u mene i ostvarenje mojih ciljeva!

Rad na ovoj doktorskoj disertaciji financiran je iz sredstava znanstveno-istraživačkog projekta "Bioprospecting Jadranskog mora - BioProCro" (KK.01.1.1.01.0002). Projekt sufinancira Vlada Republike Hrvatske i Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj. A ja im se ovim putem zahvaljujem na financiranju ovog istraživanja.



Sažetak

β -Laktami i hidantoini pokazuju raznoliku biološku aktivnost. Cilj ove doktorske disertacije bio je priprava kiralnih 3,5-disupstituiranih hidantoina i fenilamino-derivata parazoantina A i F polazeći iz β -laktama. Provedena istraživanja obuhvatila su njihovu enantioseparaciju, određivanje apsolutne konfiguracije te ispitivanja biološkog djelovanja. Dijastereomerna smjesa *cis*- i *trans*-3-amino- β -laktama **3** i **4** dobivena je reakcijom ciklokondenzacije metilnog estera glicina i imina **1a,b**. Enantiomerno čisti *trans*-3-amino- β -laktami **4c,d** dobiveni su reakcijom ciklokondenzacije (+)- ili (-)-mentilnog estera glicina s iminom **1a**. Racemični *trans*-3-amino- β -laktam **4e** dobiven je Staudingerovom reakcijom između karboksilne kiseline aktivirane 2-klor-1-metilpiridin-jodidom i imina **1a**. Amino skupina na C-3 položaju β -laktamskog prstena poslužila je u daljnjoj sintetskoj nadogradnji prstena. Kondenzacijom amino skupine β -laktama s različitim aromatskim i alifatskim izocijanatima pripravljene su β -laktamske uree **12a-v**, koje su potom intramolekulskom transformacijom prevedene u kiralne 3,5-disupstituirane hidantoina **13a-i/14a-i**. U pokušajima sinteza fenilamino-derivata parazoantina A i F, reakcija kondenzacije između *N*-Boc-aminopropanala i anilina nije uspjela. S ciljem enantioseparacije novosintetiziranih molekula razvijene su enantioselektivne HPLC i SFC metode za odjeljivanje kiralnih β -laktamskih urea **12a-v** i 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** upotrebom polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza. Kod primjene SFC kromatografije, ispitan je utjecaj kiralne nepokretne faze, vrste alkoholnog modifikatora, udjela trietilamina, temperature kolone i povratnog tlaka na enantioseparaciju β -laktamskih urea **12a-v**. Apsolutne konfiguracije 3-amino- β -laktama i 3,5-disupstituiranih hidantoina određene su primjenom ECD spektroskopije i TDDFT matematičke metode. U sklopu određivanja *in silico* biološke aktivnosti novosintetiziranih molekula predviđeni su ADME i toksikološki parametri *trans*- β -laktamskih urea, 3,5-disupstituiranih hidantoina, prirodnih parazoantina A-J i fenilamino-derivata parazoantina A i F. Antimikrobno djelovanje β -laktamskih urea **12a-v** ispitano je u *in vitro* uvjetima na odabranim sojevima bakterija i gljivica. Novosintetizirane *trans*-3-amino- β -laktamske uree **12a-v** nisu pokazale antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Antiproliferativno djelovanje *trans*-3-amino- β -laktamskih urea **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t** i 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** ispitano je u *in vitro* uvjetima pomoću MTT testa na staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), karcinoma jajnika (A2780), karcinoma dojke (MCF-7) te netransformiranih ljudskih fibroblasta (HFF-1). Najjači citotoksični učinak na staničnu liniju MCF-7 pokazao je hidantoin **14c** a β -laktamska urea **12p** na staničnu liniju A2780. Spojevi **13g**, **13h**, **14c**, **14g** i **14h** pokazuju citotoksični učinak na zdrave HFF-1 stanice.

Ključne riječi: 3-amino- β -laktami, *trans*- β -laktamske uree, 3,5-disupstituirani hidantoini, fenilamino-derivati parazoantina A i F, enantioseparacija, apsolutna konfiguracija, biološka aktivno

Abstract

β -Lactams and hydantoins show various biological activities. The goal of this doctoral thesis was to synthesize chiral 3,5-disubstituted hydantoins and phenylamino derivatives of Parazoanthine A and F from β -lactams. Conducted research comprised their enantioseparation, absolute configuration determination and biological evaluation. Diastereomeric mixture of *cis*- and *trans*-3-amino- β -lactams **3** and **4** was synthesized using cyclocondensation reaction of glycine methyl ester and imine **1a,b**. Enantiomerically pure *trans*-3-amino- β -lactams **4c,d** were synthesized using cyclocondensation reaction of (+)- or (-)-glycine menthyl ester with imine **1a**. Racemic *trans*-3-amino- β -lactam **4e** was synthesized by the Staudinger reaction of carboxylic acid activated with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide with imine **1a**. The amino group at the C-3 position of the β -actam ring was used for further structural upgrade. β -Lactams ureas **12a-v** were prepared by the condensation reaction of the amino group of β -lactam ring with various aromatic and aliphatic isocyanates, which were then converted into chiral 3,5-disubstituted hydantoins **13a-i/14a-i** via intramolecular transformation. Furthermore, the synthesis of phenylamino derivatives of Parazoanthine A and F was attempted, but the condensation reaction of *N*-Boc-aminopropanal with aniline did not proceed. Enantioselective HPLC methods were developed for the separation of *trans*- β -lactam ureas **12a-v** and 3,5-disubstituted hydantoins **13a-i** and **14a-i**, and also SFC method for the separation of *trans*- β -lactams ureas **12a-v**, on the polysaccharide-based chiral stationary phases. The effect of the chiral stationary phase, type of alcoholic modifier, the volume fraction of triethylamine, column temperature, and backpressure on the separation efficiency were investigated. The absolute configurations of 3-amino- β -lactams and 3,5-disubstituted hydantoins was determined by ECD spectroscopy and TDDFT calculations. In addition, set of ADME and toxicity parameters were predicted for *trans*- β -lactam ureas, 3,5-disubstituted hydantoins, natural Parazoanthines A-J and phenylamino derivatives of Parazoanthines A i F. The antimicrobial activity of *trans*- β -lactams ureas **12a-v** was tested *in vitro* against different strains of bacteria and fungi. All new *trans*- β -lactams ureas **14a-v** have shown no antibacterial and antifungal activity. The antiproliferative activity of *trans*- β -lactam ureas **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** and **12t** and 3,5-disubstituted hydantoins **13a-i** and **14a-i** was determined *in vitro* using the MTT assay on liver hepatocellular carcinoma (HepG2), ovarian carcinoma (A2780), breast adenocarcinoma (MCF-7) and untransformed human fibroblasts (HFF-1). Hydantoin **14c** showed the strongest cytotoxic effect against MCF-7 cell line and β -lactam urea **12p** against A2780 cell line. Compounds **13g**, **13h**, **14c**, **14g** and **14h** showed cytotoxic effect against healthy HFF-1 cells.

Keywords: 3-amino- β -laktams, *trans*- β -lactams ureas, 3,5-disubstituted hydantoins, phenylamino derivatives of Parazoanthine A and F, enantioseparation, absolute configuration and biological activity

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	OPĆI DIO	5
2.1.	β-Laktami	5
2.1.1.	Sinteza β -laktama	8
2.1.1.1.	Staudingerova (2+2) keten-imin cikloadicija	9
2.1.1.1.1.	Sinteza 3-amino- β -laktama	12
2.1.1.1.2.	Asimetrična Staudingerova sinteza 3-amino- β -laktama i njihovih prekursora	15
2.1.1.1.2.1.	Asimetrična indukcija kiralnim iminom.....	15
2.1.1.1.2.2.	Asimetrična indukcija kiralnim ketenom	17
2.1.1.1.2.3.	Dvostruka asimetrična indukcija.....	19
2.1.1.2.	Ciklokondenzacija enolata kiralnog estera i imina	19
2.1.2.	β -Laktami kao građevne jedinice mnogih kemijskih spojeva	24
2.2.	Hidantoini	25
2.2.1.	Biološki aktivni hidantoini	26
2.2.2.	Hidantoini iz morskih organizama.....	27
2.2.3.	Sinteza hidantoina	29
2.2.3.1.	Priprava 3,5-disupstituiranih hidantoina	31
2.3.	Parazoantini	48
2.3.1.	Sinteza parazoantina A i F.....	50
2.3.2.	Sinteza parazoantina B i C	53
2.4.	Superkritična fluidna kromatografija	55
2.5.	In silico modeliranje.....	58
3.	METODIKA	61
3.1.	Materijali i metode	61
3.2.	In silico karakterizacija trans-β-laktamskih urea, 3,5-disupstituiranih hidantoina, parazoantina A-J i fenilamino-derivata parazoantina A i F	65
3.2.1.	Predviđanja primjenom programa ADMET Predictor	66
3.2.2.	Predviđanja primjenom programa DataWarrior.....	67
3.2.3.	Predviđanja primjenom internetskog poslužitelja admetSAR	67
3.3.	Priprava 3-amino-β-laktama	68
3.3.1.	Priprava imina	68
3.3.1.1.	N-(4-Fluorfenil)-1-(4-metoksifenil)metanimin 1a	68
3.3.1.2.	1-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(4-fluorfenil)metanimin 1b	69
3.3.2.	Priprava diastereomerne smjese cis/trans-3-amino- β -laktama.....	69
3.3.2.1.	Priprava metil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)-acetata 2	69

3.3.2.2.	Priprava <i>cis/trans</i> -3-amino- β -laktama 3 i 4	70
3.3.2.2.1.	<i>cis/trans</i> -3-Amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on 3	71
3.3.2.2.2.	<i>cis/trans</i> -3-Amino-4-(2H-1,3-benzodioksol-5-il)-1-(4-fluorfenil)azetidin-2-on 4	72
3.3.3.	Stereoselektivna sinteza <i>trans</i> -3-amino- β -laktama.....	73
3.3.3.1.	Priprava <i>N</i> -benzoksikarbonilglicina 5	73
3.3.3.2.	Priprava mentilnih estera <i>N</i> -benzoksikarbonilglicina 6a,b	73
3.3.3.2.1.	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-Mentilni ester <i>N</i> -benzoksikarbonilglicina 6a	74
3.3.3.2.2.	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(+)-Mentilni ester <i>N</i> -benzoksikarbonilglicina 6b	75
3.3.3.3.	Priprava mentilnih estera glicina 7a,b	76
3.3.3.3.1.	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-Mentilni ester glicina 7a	76
3.3.3.3.2.	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(+)-Mentilni ester glicina 7b	77
3.3.3.4.	Priprava mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata 8a,b	78
3.3.3.4.1.	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(-)-Mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetat 8a	78
3.3.3.4.2.	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-(+)-Mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetat 8b	79
3.3.3.5.	Priprava <i>trans</i> -3-amino- β -laktama 3c,d	80
3.3.3.5.1.	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-Amino-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on 3c	80
3.3.3.5.2.	(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-Amino-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on 3d	81
3.3.4.	Priprava ($\pm$)- <i>trans</i> -3-amino- β -laktama 3e	82
3.3.4.1.	Priprava ($\pm$)- <i>cis/trans</i> -2-[1-(4-fluorfenil)-2-(4-metoksifenil)-4-oksoazetidin-3-il]-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -izoidol-1,3-diona 9 i 10	82
3.3.4.2.	Priprava ($\pm$)- <i>trans</i> -3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona 3e	84
3.4.	Priprava ($\pm$)-<i>trans</i>-β-laktamskih urea 12a-v.....	85
3.4.1.	<i>N</i> -Alil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12a	85
3.4.2.	<i>N</i> -Heksil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12b	86
3.4.3.	<i>N</i> -Ciklopentil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12c	87
3.4.4.	<i>N</i> -Cikloheksil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12d ...	88
3.4.5.	<i>N</i> -4-fenilbutil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12e	90
3.4.6.	<i>N</i> -Furfuril- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12f	91
3.4.7.	<i>N</i> -Fenil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12g	92
3.4.8.	<i>N</i> -Benzil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12h	93
3.4.9.	<i>N</i> -[(<i>S</i>)-(-)-1-Feniletil]- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12i	94
3.4.10.	<i>N</i> -Benzoil- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12j	95
3.4.11.	<i>N</i> -(2-Klorfenil)- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12k ..	97
3.4.12.	<i>N</i> -(3-Klorfenil)- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12l ..	98
3.4.13.	<i>N</i> -(4-Klorfenil)- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12m	99
3.4.14.	<i>N</i> -(4-Metoksifenil)- <i>N'</i> -[($\pm$)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12n	100

3.4.15.	<i>N</i> -(4- <i>tert</i> -Butilfenil)- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12o	101
3.4.16.	<i>N</i> -(3-Klor-4-metilfenil)- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12p	102
3.4.17.	<i>N</i> -(3,5-Dimetilfenil)- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12r	103
3.4.18.	<i>N</i> -[Bis-(3,5-Trimetilfenil)]- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12s	104
3.4.19.	<i>N</i> -(2,6-Dimetilfenil)- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12t	105
3.4.20.	<i>N</i> -(2,6-Diizopropilfenil)- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12u	106
3.4.21.	<i>N</i> -(1-naftil)- <i>N'</i> -[(±)- <i>trans</i> -1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12v	107
3.5.	Priprava (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i	108
3.5.1.	3-Alil-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13a/14a	109
3.5.2.	3-Heksil-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13b/14b	111
3.5.3.	3-Ciklopentil-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13c/14c	113
3.5.4.	3-(Furfuril)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13d/14d	115
3.5.5.	3-Benzil-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13e/14e	117
3.5.6.	3-(4- <i>tert</i> -Butilfenil)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13f/14f	119
3.5.7.	3-(3-klor-4-metilfenil)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13g/14g	121
3.5.8.	3-(3,5-Dimetilfenil)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13h/14h	123
3.5.9.	3-(2,6-Dimetilfenil)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion 13i/14i	125
3.6.	Sinteza fenilamino-derivata parazoantina A i F	127
3.6.1.	Priprava <i>tert</i> -butilnog estera <i>N</i> -(3-hidroksi-propil)karbaminske kiseline 15	127
3.6.2.	Priprava <i>tert</i> -butilnog estera <i>N</i> -(3-okso-propil)karbaminske kiseline 16	127
3.6.3.	Priprava <i>tert</i> -butilnog estera <i>N</i> -[(3-fenilimino)propil]karbaminske kiseline 18a	128
3.6.4.	Priprava imina 18b-i	128
3.6.5.	Priprava 3-(4-metoksifenil)akrilolil-azida 19	129
3.6.6.	Priprava 1-(2-izocijanatovinil)-4-metoksibenzena 20	130
3.6.7.	Priprava 3-[(<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino]propionske kiseline 29	130
3.6.8.	Priprava <i>tert</i> -butilnog 3-okso-3-(fenilamino)propil]karbamata 30	131
3.6.9.	Priprava <i>tert</i> -butilnog estera <i>N</i> -[(3-fenilimino)propil]karbaminske kiseline 18a redukcijom sekundarnog amida 30	132
3.7.	Enantioseparacija (±)-<i>trans</i>-β-laktamskih urea 12a-v i (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i	132

3.7.1.	Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea 12a-v primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	132
3.7.1.1.	Utjecaj kiralne nepokretne faze	132
3.7.1.2.	Utjecaj temperature	133
3.7.2.	Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea 12a-v primjenom superkritične fluidne kromatografije	133
3.7.2.1.	Utjecaj kiralne nepokretne faze	133
3.7.2.2.	Utjecaj modifikatora	133
3.7.2.3.	Utjecaj bazičnog aditiva	134
3.7.2.4.	Utjecaj temperature kolone	134
3.7.2.5.	Utjecaj povratnog tlaka	134
3.7.3.	Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	134
3.8.	Biološki eksperimentalni dio	135
3.8.1.	Određivanje antimikrobne aktivnosti	135
3.8.2.	Određivanje antitumorske aktivnosti	136
4.	REZULTATI I RASPRAVA	138
4.1.	In silico karakterizacija trans-β-laktamskih urea, 3,5-disupstituiranih hidantoina, parazoantina A-J i fenilamino-derivata parazoantina A i F	138
4.1.1.	Apsorpcija	140
4.1.2.	Distribucija	149
4.1.3.	Metabolizam i ekskrecija	153
4.1.4.	Toksičnost	160
4.2.	Priprava 3-amino-β-laktama	166
4.2.1.	Priprava imina 1a,b	166
4.2.2.	Priprava cis/trans-3-amino- β -laktama 3 i 4	167
4.2.3.	Stereoselektivna sinteza trans-3-amino- β -laktama 3c,d	172
4.2.4.	Priprava cis/trans-3-ftalimido- β -laktama 9 i 10	173
4.2.5.	Priprava ($\pm$)-trans-3-amino- β -laktama 3e	176
4.3.	Priprava ($\pm$)-trans-β-laktamskih urea 12a-v	177
4.4.	Priprava ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i	178
4.5.	Priprava fenilamino-derivata parazoantina A i F	183
4.6.	Enantioseparacija ($\pm$)-trans-β-laktamskih urea 12a-v i ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i superkritične fluidne kromatografije	188
4.6.1.	Enantioseparacija ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea 12a-v primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	191
4.6.1.1.	Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea 12a-v	191

4.6.1.2.	<i>Utjecaj temperature na enantioseparaciju (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-f, 12h-j i 12m-r primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti</i>	203
4.6.2.	<i>Enantioseparacija (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v primjenom superkritične fluidne kromatografije</i>	206
4.6.2.1.	<i>Utjecaj polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	206
4.6.2.2.	<i>Utjecaj vrste alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi na enantioseparaciju (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	217
4.6.2.3.	<i>Utjecaj volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi na enantioseparaciju (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	220
4.6.2.4.	<i>Utjecaj temperature kolone na enantioseparaciju (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	222
4.6.2.5.	<i>Utjecaj povratnog tlaka na enantioseparaciju (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	226
4.6.3.	<i>Usporedba HPLC i SFC enantioseparacije (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	227
4.6.4.	<i>Enantioseparacija (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti</i>	229
4.7.	Određivanje apsolutne konfiguracije	233
4.7.1.	<i>Apsolutna konfiguracija 3-amino-β-laktama</i>	233
4.7.2.	<i>Apsolutna konfiguracija 3,5-disupstituiranih hidantoina</i>	237
4.8.	Biološka ispitivanja	240
4.8.1.	<i>Ispitivanje antimikrobne aktivnosti (±)-trans-β-laktamskih urea 12a-v</i>	240
4.8.2.	<i>Ispitivanje antitumorske aktivnosti (±)-trans-β-laktamskih urea 12a, 12b, 12c, 12f, 12h, 12o, 12p, 12r i 12t i (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i</i>	241
5.	ZAKLJUČAK	247
6.	LITERATURA	252
7.	POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA KRATICA	263
8.	PRILOG	VI
9.	ŽIVOTOPIS	LXXI

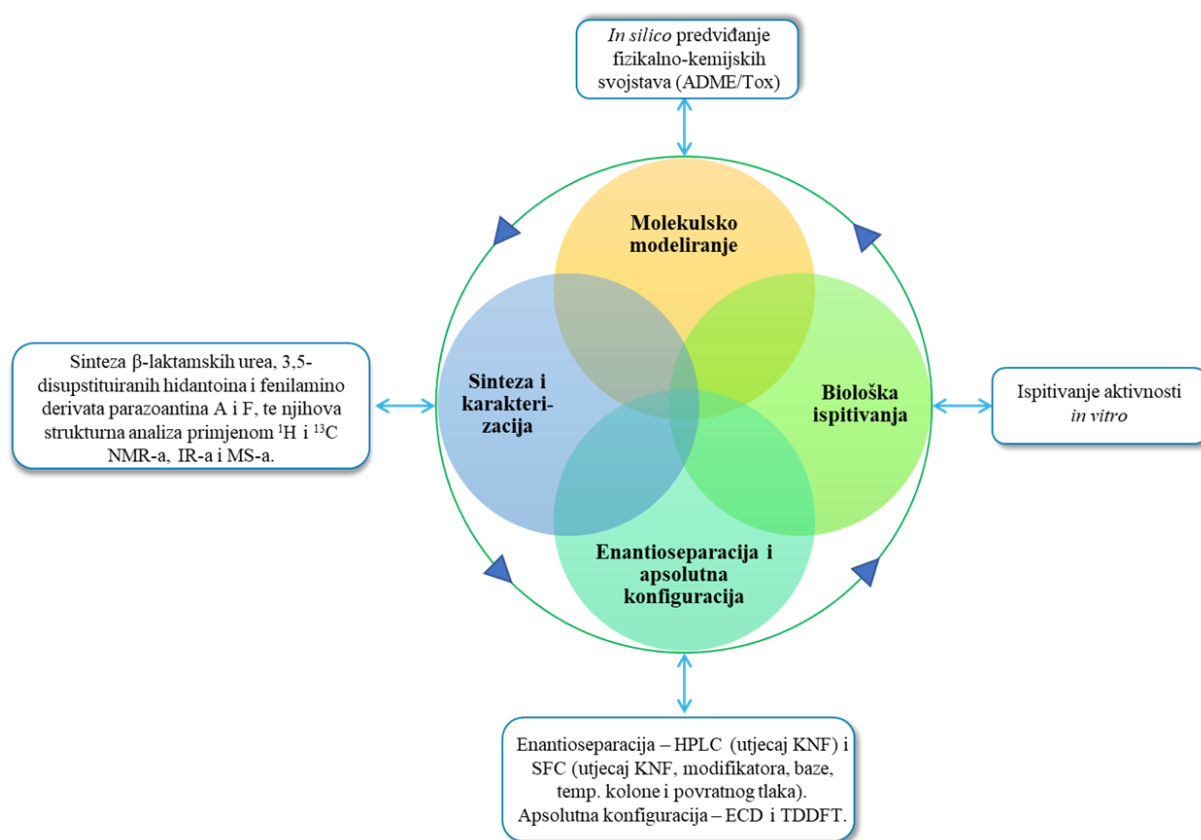
1. UVOD

β -Laktami (azetidin-2-oni), četveročlani ciklički amidi, pojavljuju se kao strukturni motiv u mnogim prirodnim spojevima (npr. penicilini, cefalosporini) i lijekovima (npr. ezetimib, piperacilin),¹ a pokazuju raznolika farmakološka djelovanja kao na primjer antibakterijsko, antitumorsko, protuupalno, antimalarijsko i analgetičko djelovanje.² Neki β -laktami također pokazuju inhibitorno djelovanje na neke enzime (humana leukocitna elastaza, humana citomegalovirusna proteaza, cistein proteaza, humana hidrolaza masno kiselinskih amida),³ a mogu djelovati i kao iznimno efikasni inhibitori apsorpcije kolesterola.³⁻⁴ β -Laktami su prepoznati kao važne građevne jedinice u sintezi velikog broja organskih spojeva,⁶ kao što su aziridini, azetidini, hidantoini, peptidi, peptidomimetici, poliaminoesteri, taksoidi i makrociklički spojevi.^{7,8}

Hidantoini (2,4-imidazolidinoni) su važna skupina heterocikličkih spojeva koja se nalaze u brojnim prirodnim i biološki aktivnim spojevima.^{9,10} Posjeduju široki spektar bioloških i farmakoloških svojstava uključujući antitumorska, antimikrobna, protuupalna, antikonvulzivna, antidijabetička, anti-HIV i slična svojstva.⁹ Također predstavljaju intermedijere u sintezi optički čistih prirodnih i neprirodnih aminokiselina.¹¹ Zbog izražene biološke aktivnosti intenzivno se istražuju novi putevi i metode sinteze različitih spojeva koji u svojoj strukturi posjeduju hidantoini prsten. Različiti alkaloidi koji su izolirani iz morskih organizama (aplisinopsin, aksinohidantoin, namidinen, hemimikalin A i B, parazoantini) i bakterija (hidantocidin) imaju hidantoini prsten u svojoj strukturi.¹²⁻¹⁴

Parazoantini su skupina jedinstvenih prirodnih 3,5-disupstituiranih hidantoina koja je izolirana iz sredozemne moruzgve *Parazoanthus axinellae*.¹⁴⁻¹⁶ Svi prirodni optički aktivni parazoantini A, D, F, G i J su (S)-konfiguracije, a parazoantini B, C, E, H i I su akiralni jer imaju egzocikličku dvostruku vezu Z-konfiguracije između C-5 i C-6 atoma.^{13,16} *In vitro* antitumorska aktivnost parazoantina A-E ispitana je na staničnim linijama humanih karcinoma (adenokarcinoma debelog crijeva HT-29, karcinoma dojke MDA-MB-231 i pluća A-549) te antimalarijska aktivnost na *Plasmodium falciparum* FcB1.¹⁴ Pokazalo se da ovi spojevi ne pokazuje značajnu antitumorsku i antimalarijsku aktivnost. Toksičnost parazoantina A-E je testirana na bakteriji *Vibrio fischeri* i utvrđeno je da najveću toksičnost pokazuje parazoantin C ($EC_{50} = 1,64 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Cilj ove doktorske disertacije bila je priprava kiralnih 3,5-disupstituiranih hidantoina i fenilamino-derivata parazoantina A i F intramolekulskom transformacijom racemičnih *trans*- β -laktamskih urea. Također, cilj je bio ispitati uvjete odjeljivanja enantiomera pripremljenih kiralnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i superkritičnom fluidnom kromatografijom upotrebom polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza. Dio istraživanja odnosio se na određivanje apsolutne konfiguracije odabranih molekula, predviđanje ADMET (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) svojstava te ispitivanje biološkog djeovanja u *in vitro* uvjetima, Slika 1.

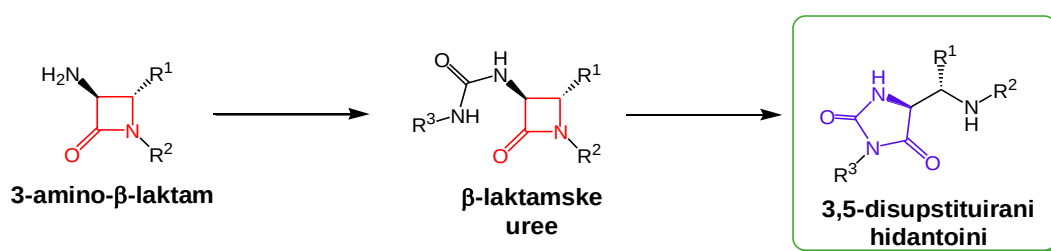


Slika 1. Međusobno povezani zadaci i aktivnosti u doktorskom radu

Enantiomerno čisti *trans*-3-amino- β -laktami pripremljeni su ciklokondenzacijom litijevih enolata mentilnih estera *N,N*-bis(silil)glicina i imina, dobivenih iz 4-metoksibenzaldehida i 4-fluoranilina. Međutim, reakcijama ciklokondenzacije enolata metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina i imina dolazi do nastanka diastereomerne smjese *cis*- i *trans*-3-amino- β -laktama.

U ovom radu također je opisana priprava racemične smjese *trans*-3-amino- β -laktama, koja je dobivena iz 3-ftalimido- β -laktama u reakciji s etilendiaminom. 3-Ftalimido- β -laktam

priređen je Staudingerovom reakcijom tj. (2+2)-ciklokondenzacijom imina i ketena. Primarna amino skupina na C-3 položaju β -laktama poslužila je u sintetskoj nadogradnji β -laktamske jezgre. Korištenjem ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama u kondenzacijskim reakcijama s različitim alkilnim i aromatskim izocijanatima priređene su ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree, koje su potom intramolekulskom transformacijom prevedene u 3,5-disupstituirane hidantoinne u prisutnosti natrijevog metoksida kao baze, Shema 1. Na kraju, primjenom iste metodologije pokušana je sinteza fenilamino-derivata parazoantina A i F. Iz sintetiziranog aldehida *N*-Boc-aminopropanala i anilina reakcijom kondenzacije pokušana je priprava imina potrebnog za dobivanje derivata parazoantina, no reakcija nije polučila uspjeh.



Shema 1. Općeniti sintetski put priprave kiralnih 3,5-disupstituiranih hidantoina i derivata parazoantina

Svi pripremljeni spojevi u potpunosti su okarakterizirani različitim analitičkim metodama. Za karakterizaciju spojeva korištena je NMR spektroskopija, IR spektrometrija čvrstih i tekućih faza te spektrometrija masa visoke rezolucije. Dijastereoselektivnost reakcija praćena je 1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Optički aktivnim spojevima određeno je optičko skretanje na polarimetru te su izračunati specifični kutevi zakretanja. Čistoća spojeva određena je tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz UV-VIS detektor. Ispitano je odjeljivanje enantiomera pripremljenih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama. Nadalje, ispitan je utjecaj kiralnih nepokretnih faza, utjecaj alkoholnih modifikatora, utjecaj volumnog udjela trietilamina u pokretnoj fazi, utjecaj temperature i povratnog tlaka na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskim urea superkritičnom fluidnom kromatografijom uz superkritični ugljikov(IV) oksid kao glavnu komponentu pokretne faze. Apsolutna konfiguracija *cis*- i *trans*-3-amino- β -laktama i 3,5-disupstituiranih hidantoina određena je usporedbom njihovih eksperimentalno izmjerenih ECD (engl. *Electronic Circular Dichroism*) spektara s ECD spektrima izračunatim pomoću TDDFT (engl. *Time-Dependent Density Functional Theory*) matematičke metode u acetonitrilu. Napravljeno je i *in silico* predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava, tj. ADMET svojstava, β -

laktamskih urea, 3,5-disupstituiranih hidantoina, prirodnih parazoantina A-J i fenilamino-derivata parazoantina A i F. Nadalje, svim novosintetiziranim ($\pm$)-*trans*- β -laktamskim ureama, u *in vitro* uvjetima, ispitano je antibakterijsko djelovanje na Gramm-negative bakterije *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i Gramm-pozitivnu bakteriju *Staphylococcus aureus*, i antifungalno djelovanje na gljivice *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultati testiranja pokazali su da ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **14a-v** nemaju učinak na testirane bakterije i gljivice. Također, ispitano je antitumorsko djelovanje ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea i 3,5-disupstituiranih hidantoina MTT testom na staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), karcinoma jajnika (A2780), karcinoma dojke (MCF-7) te netransformiranih ljudskih fibroblasta (HFF-1) u *in vitro* uvjetima.

β -Laktamske uree **12b**, **12c**, **12h**, **12o**, **12p** i **12r** pokazale su srednje jako antiproliferativno djelovanje na staničnim linijama ljudskih karcinoma HepG2, A2780 i MCF-1. β -Laktamska urea **12d** pokazuje zanemarivo djelovanje na HepG2 stanice ($IC_{50} = 82 \mu\text{mol L}^{-1}$), a spojevi **12a** i **12t** ne pokazuju antiproliferativnu aktivnost ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na HepG2 stanice. β -laktamske uree **12p** i **12r** pokazale su citotoksično djelovanje na zdrave stanice fibroblasta ljudske kože HFF-1.

3,5-disupstituirani hidantoini s alilnom **14a** i furfurilnom **13d** skupinom na N-3 položaju hidantoinskog prstena ne pokazuju antiproliferativnu aktivnost ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na svim ispitivanim staničnim linijama. Također i njihovi diastereomeri **13b** i **14d** pokazuju zanemarivu ili slabu aktivnost na svim ispitivanim staničnim linijama. Hidantoinski spoj **14c** s ciklopentilnom skupinom na N-3 položaju hidantoinskog prstena pokazao je najjače antiproliferativno djelovanje na stanice karcinoma dojke MCF-7. Spoj **13f** s 4-*tert*-butilfenilnom skupinom na N-3 položaju hidantoinskog prstena pokazao je srednje jako antiproliferativno djelovanje na HepG2, A2780 i MCF-1. Spojevi **13g**, **13h**, **14c**, **14g** i **14h** imaju citotoksični učinak na zdrave HFF-1 stanice.

2. OPĆI DIO

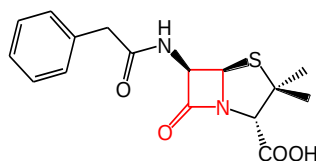
2.1. β -Laktami

β -Laktami su važna skupina heterocikličkih spojeva te ih se može pronaći kao strukturni motiv u prirodnim spojevima, biološki aktivnim i farmaceutskim spojevima, Slika 2.¹⁷



Slika 2. Struktura najjednostavnijeg β -laktama, azetidin-2-ona

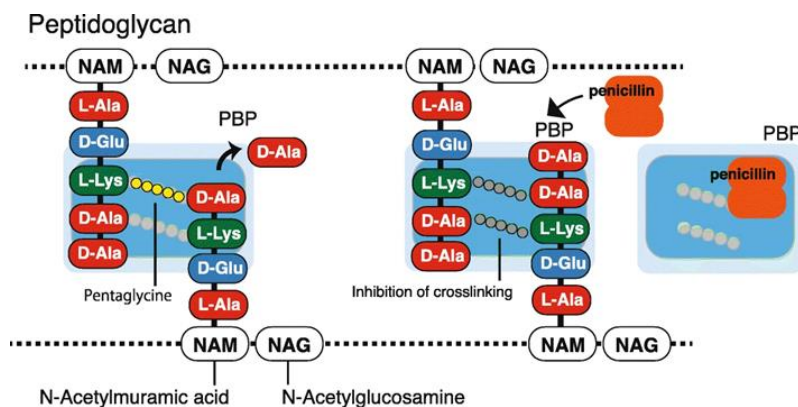
Flemingovim otkrićem penicilina G 1928. godine, potaknut je nagli razvoj istraživanja na području biološke izolacije i sinteze raznovrsnih β -laktamskih antibiotika, Slika 3.¹⁸



Slika 3. Struktura penicilina G

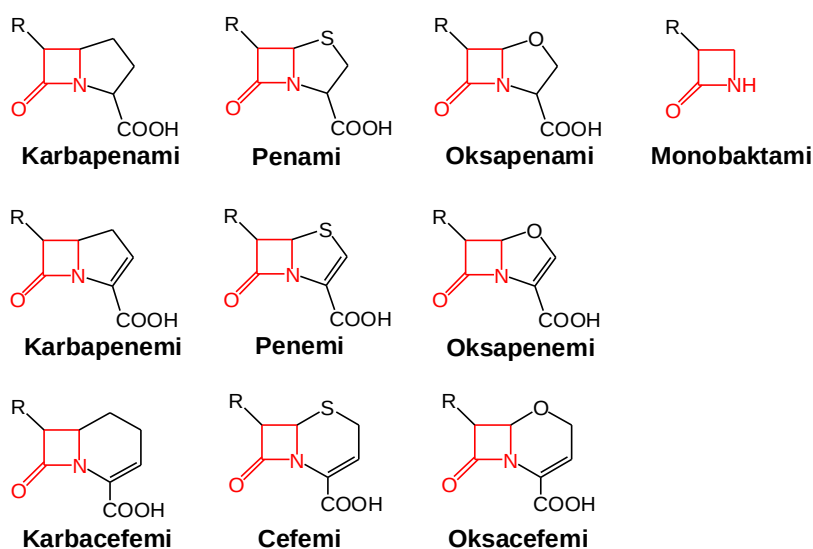
β -Laktami su zbog raznolike biološke aktivnosti značajni spojevi u medicinskoj kemiji.⁴ Četveročlani β -laktamski prsten zajedničko je strukturno obilježje mnogih β -laktamskih antibiotika.^{17,19} Zbog sličnosti u kemijskoj građi, β -laktamski antibiotici imaju isti mehanizam djelovanja²⁰ te sličnosti u farmakološkim i imunološkim obilježjima.²¹ β -Laktami djeluju baktericidno na bakterije tako što inhibiraju specifičan enzim koji je odgovoran za sintezu peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterije. Peptidoglikani su vrlo važni u funkciji bakterija, naročito Gramm-pozitivnih. Kod Gramm-pozitivnih bakterija je sloj peptidoglikana mnogo deblji nego kod Gramm-negativnih bakterija. Glavne komponente peptidoglikana su polisaharidi u kojima se izmjenjuju *N*-acetilglukozamin (NAG) i *N*-acetilmuraminska kiselina (NAM) te pentapeptid (L-Ala-D- γ -Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) koji se pričvršćuje za *N*-acetilmuraminsku kiselinu i završava D-alanil-D-alanin aminokiselinskim ostacima. Nastajanje i ugradnja pojedinih dijelova peptidoglikana odvija se kroz tri faze i velik broj enzimatskih reakcija. β -Laktamski antibiotici djeluju na samom kraju toga niza, Slika 4. Tijekom procesa postraničnog vezanja (transpeptidacije) sa susjednim peptidom, protein koji veže penicilin

(engl. *Penicillin Binding Protein*, PBP) uklanja završni alanin iz peptida. Ovo isprepletanje omogućuje čvrstoću stanične stijenke. β -laktamski antibiotici su strukturni analozi D-alanil–D-alanin dipeptida i kovalentno se vežu za aktivno mjesto PBP-a. Ovim vezanjem onemogućuje se reakcija transpeptidacije i zaustavlja se sinteza peptidoglikana, zbog čega bakterijska stanica propada. β -Laktamski antibiotici ubijaju bakterijske stanice samo u fazi njihova aktivnog rasta i sinteze stanične stijenke.²²



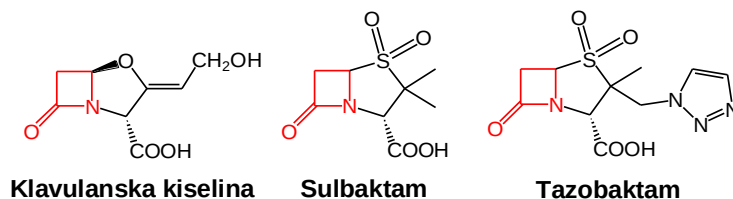
Slika 4. Zaustavljanje sinteze peptidoglikana iz stanične stijenke bakterija putem inhibicije proteina PBP pomoću β -laktamskih antibiotika (preuzeto iz Sawa i sur., 2020.)²²

U skupinu β -laktamskih antibiotika ubrajaju se penami (penicilini), cefemi (cefalosporini), karbapenemi, karbacefemi, monobaktami i drugi, Slika 5.²³ β -Laktamski antibiotici predstavljaju jedne od najčešće korištenih antibiotika.²⁴



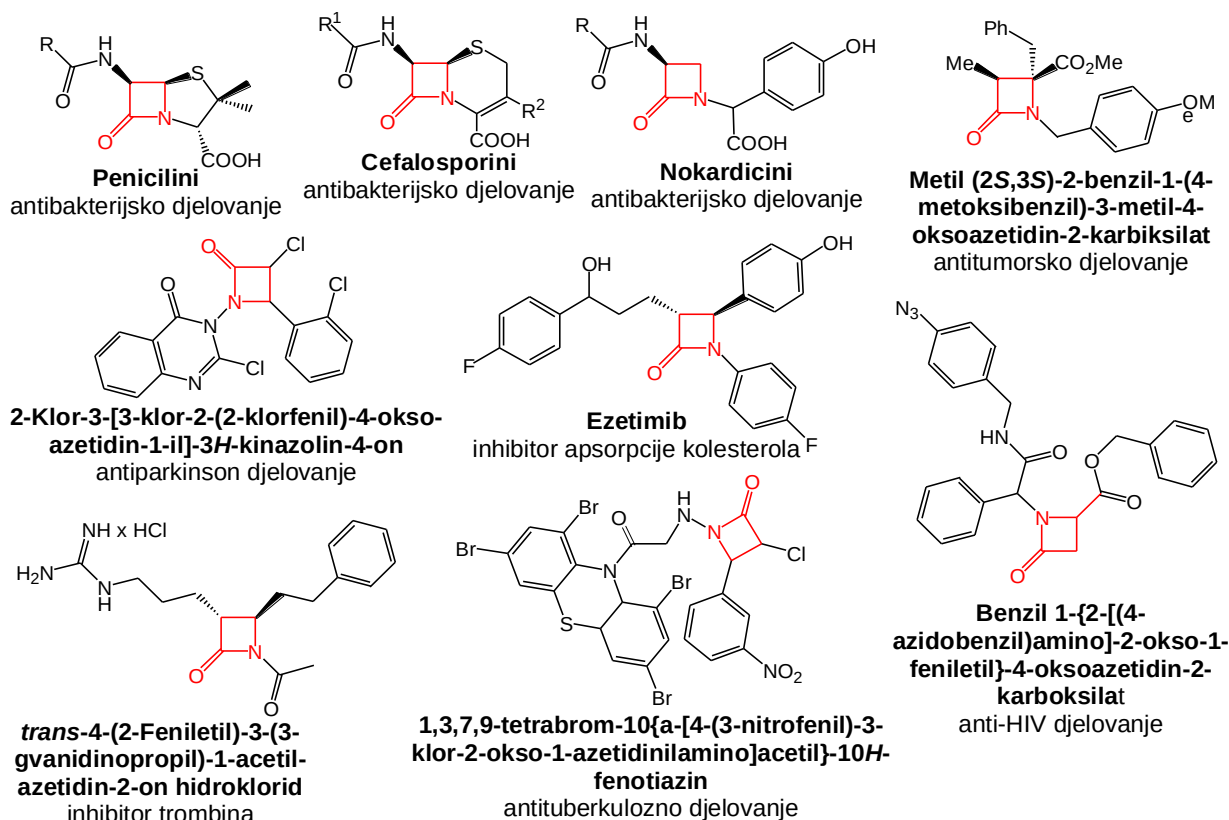
Slika 5. Različite strukture β -laktamskih antibiotika

Međutim, uz njih se obično navode i inhibitori β -laktamaza (klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam) koji imaju β -laktamsku strukturu, ali im je antibakterijsko djelovanje slabije, Slika 6.^{20,21}



Slika 6. Inhibitori β -laktamaza

Najpoznatija je antibiotska aktivnost, međutim β -laktamski derivati su također inhibitori različitih ljudskih enzima, kao što su triptaza, kinaza, cistein-proteaza i leukocit-elastaza.^{4,25} Isto tako posjeduju antituberkuloznu, antifungalnu, anti-HIV, antimalarijsku, antitumorsku, analgetsku, antidijabetičku i protuupalnu aktivnost,^{4,5,19} a koriste se i kao lijekovi za liječenje Parkinsonove bolesti.^{4,8} β -Laktami također mogu djelovati i kao iznimno efikasni inhibitori apsorpcije kolesterola.^{26,27} Nadalje, β -laktami inhibiraju djelovanje vazopresina na njegov receptor VIa.^{8,25} Na Slici 7 prikazani su neki biološki aktivni β -laktami.

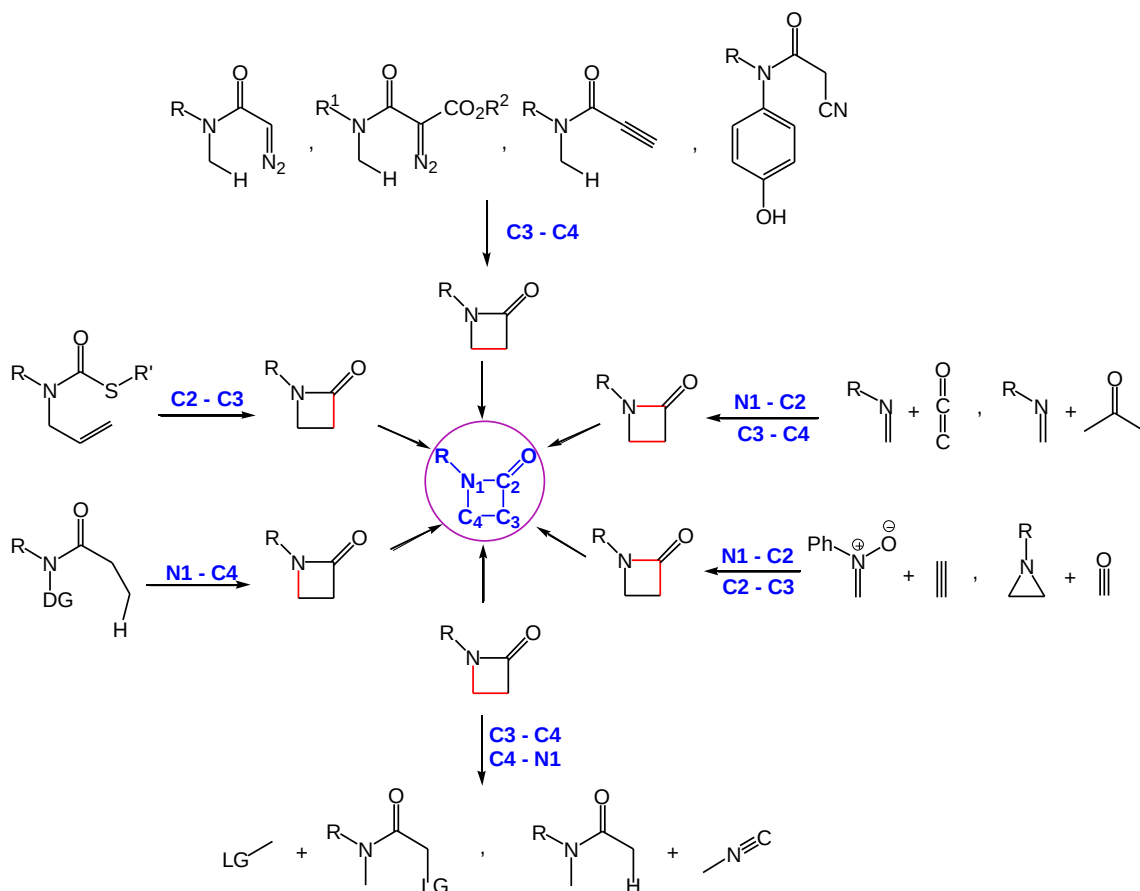


Slika 7. Primjeri nekih bioloških aktivnih β -laktamskih spojeva

2.1.1. Sinteza β -laktama

U literaturi su opisani različiti postupci dobivanja β -laktama.^{8,17,18,23,28-30} Pripraviti se mogu klasičnim metodama sinteze u otopini^{17,18,23,28} te sintezom na čvrstoj fazi.^{23,29,31,32} Isto tako, novije metode sinteze β -laktama opisuju njihovu pripremu bez prisustva otapala (engl. *Solvent Free*),³³ kao i pripremu uz pomoć mikrovalnog zračenja (MW) u otopini.^{34,35} Na Slici 8 prikazane su mogućnosti pripreme četveročlanog laktamskog prstena.^{18,23,28} β -Laktamski prsten moguće je dobiti stvaranjem:

- C3 – C4 veze (npr. umetanje karbena u C-H vezu, aktivacija/nukleofilna adicija),
- N1 – C2 i C3 – C4 veza (npr. Staudingerova i aza-Reformatski reakcija),
- N1 – C2 i C2 – C3 veza (npr. Kinugasa reakcija, umetanje ugljikovog(II) oksida u aziridinski prsten),
- C3 – C4 i C4 – N1 veza (npr. reakcija α -halohidroksimata i sumporovih ilida),
- N1 – C4 veze (npr. oksidativna amidacija) i
- C2 – C3 veze (npr. radikalska ciklizacija).

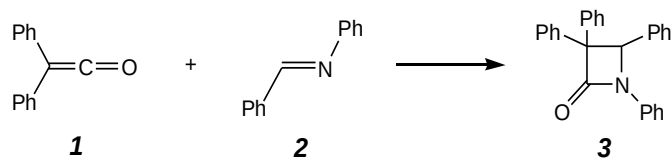


Slika 8. Sinteza β -laktamskog prstena

Dvije najčešće metode priprave β -laktama su Staudingerova reakcija između ketena i imina, te ciklokondenzacija enolata kiralnog estera i imina. Obje metode dovode do stvaranja N1-C2 veze i C3-C4 veze.^{17,18,29}

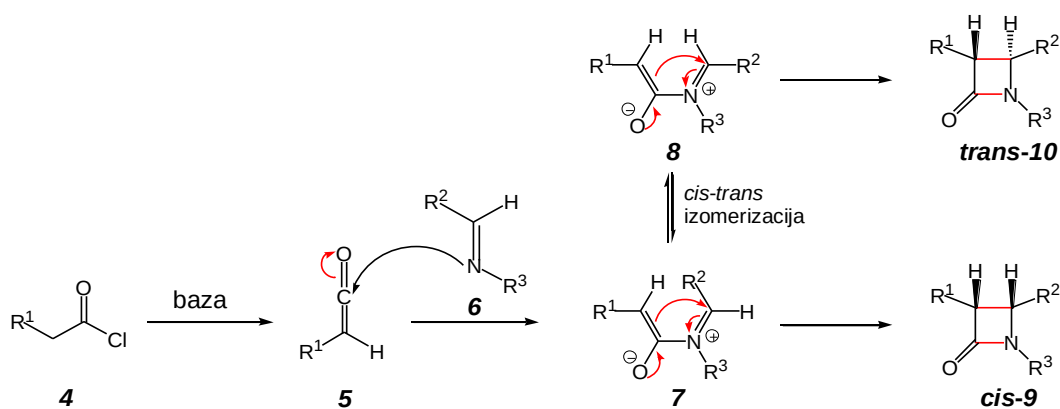
2.1.1.1. Staudingerova (2+2) keten-imin cikloadicija

Staudingerova reakcija opisana je 1907. godine od strane njemačkog znanstvenika Hermanna Staudingera.¹⁸ Reakcijom difenilketena **1**, *in situ* generiranog iz acil-halogenida i baze, te imina **2** dobivenog iz anilina i benzaldehida, pripremao je 1,3,3,4-tetrafenilazetid-2-on **3**, Shema 2.^{17,17,29}



Shema 2. Priprava 1,3,3,4-tetrafenilazetid-2-ona **3**

U Staudingerovoj sintezi dolazi do reakcije ketena s iminom pri čemu nastaje odgovarajući β -laktam.^{17,18,28,29} U reakciji se formiraju kiralni centri na C-3 i C-4 položaju β -laktamskog prstena.³⁶ Posljedično, ovom reakcijom može nastati jedan stereoizomer, *cis*- ili *trans*- β -laktam, ili smjesa *cis*- i *trans*- β -laktama.^{17,29,36} Predloženi mehanizam reakcije prikazan je na Shemi 3. Osim eksperimentalno,^{17,36} mehanizam Staudingerove reakcije proučavan je i metodama računalne kemije.³⁷



Shema 3. Mehanizam Staudingerove reakcije

Početni korak u mehanizmu reakcije jest nukleofilna adicija dušikovog atoma imina **6** na *sp*-hibridiziran ugljikov atom ketena **5**. Pri tome nastaje zwitterionski međuprodukt **7**, a u drugom koraku dolazi do intramolekulske nukleofilne adicije enolata na iminski dio, odnosno do konrotarnog elektrocikličkog zatvaranja prstena u *cis*- β -laktam **9**. Međutim, međuprodukt **7** procesom *cis-trans*-izomerizacije prelazi u međuprodukt **8**, a potom konrotarnim elektrocikličkim zatvaranjem prstena nastaje *trans*- β -laktam **10**.^{29,36} Prema tome, *cis*- β -laktam **9** nastaje iz zwitterionskog međuprodukta **7** koji nosi (*E*)-iminski dio, ali ako se dogodi izomerizacija do zwitterionskog međuprodukta **8** koji nosi (*Z*)-iminski dio, onda reakcijom nastaje *trans*- β -laktam **10**.²⁹ Ovo je opće prihvaćen mehanizam Staudingerove reakcije koji se može pronaći u literaturi iako još nije sasvim razjašnjen.³⁶

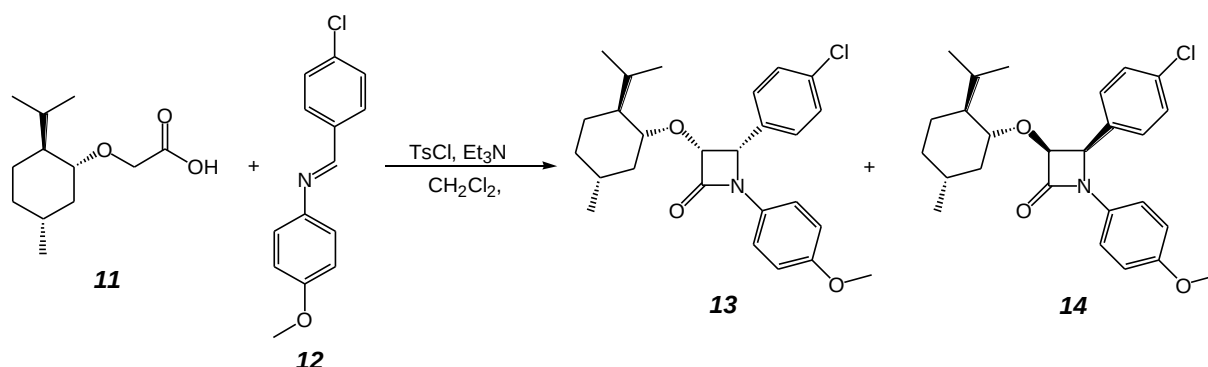
Pokazalo se da stereoselektivnost Staudingerove reakcije ovisi o temperaturi, otapalu, bazi, aditivima, redosljedu dodavanja reaktanata, o supstituentima na ketenu, ali i o supstituentima na polaznom iminu.^{17,29} Polarnost otapala može utjecati na mehanizam izomerizacije: nepolarna otapala pogoduju stvaranju *cis*- β -laktama, dok polarna otapala pogoduju stvaranju *trans*- β -laktama, što je vjerojatno posljedica stabilizacije zwitterionskog međuprodukta u polarnim otapalima, što omogućava izomerizaciju dvostruke veze prije zatvaranja prstena.¹⁷ Primjenom Bose-Evans ketena, odnosno ketena s jakim elektron donirajućim supstituentom, poput *O*-alkil/aril ili *N*-alkil/aril, u reakciji s iminom nastaju *cis*- β -laktami. Primjenom Jarhan ketena, kao na primjer ftalimidoketena, reakcijom s iminom nastaje smjesa *cis*- i *trans*- β -laktama. Međutim, primjenom Moore-ovih ketena sa slabim elektron donirajućim supstituentima, kao na primjer *S*-alkil/aril, alkil ili aril, pretežito nastaju *trans*- β -laktamski produkti.³⁶

Acil-halogenidi toksične su kemikalije³⁷ s visokom osjetljivošću na vodu i vlagu, što otežava njihovo rukovanje.²⁸ U dodiru s vodom raspadaju se na polaznu karboksilnu kiselinu i halogenovodik.³⁷ U novijim istraživanjima, kao prekursor za generiranje ketena *in situ* koristi se aktivirana karboksilna kiselina.^{5,18} Za aktivaciju karboksilnih kiselina koriste se na primjer Mukaiyama reagens, Vilsmeier reagens, etil-kloroformat, cijanurni klorid-DMF kompleks, *p*-toluensulfonil-klorid (tosil-klorid), Dane-ova sol, DMSO-Ac₂O kompleks,¹⁸ *N*-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin (EEDQ), 1,1'-karbonildiimidazol i drugi reagensi.⁵

Jarrahpour i suradnici sintetizirali su seriju β -laktama polazeći iz kiralnog imina i/ili kiralne karboksilne kiseline s ciljem ispitivanja antimikrobne i antimalarijske aktivnosti.²

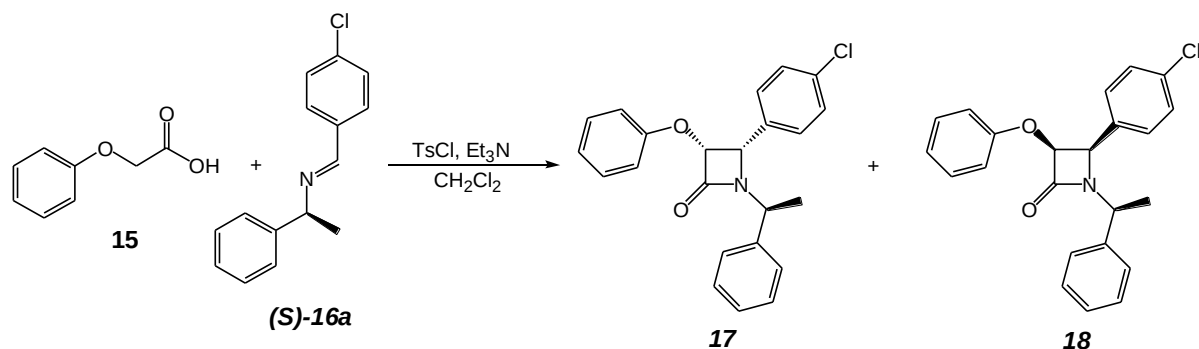
Početna kiralna karboksilna kiselina, mentoksioctena kiselina **11**, dobivena je iz (–)-mentola i kloroctene kiseline u prisutnosti natrija u refluksirajućem toluenu. Kiralna kiselina **11** zatim reagira s iminom **12** uz tosil-klorid i trietilamin kao Lewisovu bazu, pri čemu nastaje

dijastereoizomerna smjesa spojeva *cis*-**13** i *cis*-**14** u omjeru 60:40 u iskorištenju od 50 %, Shema 4.



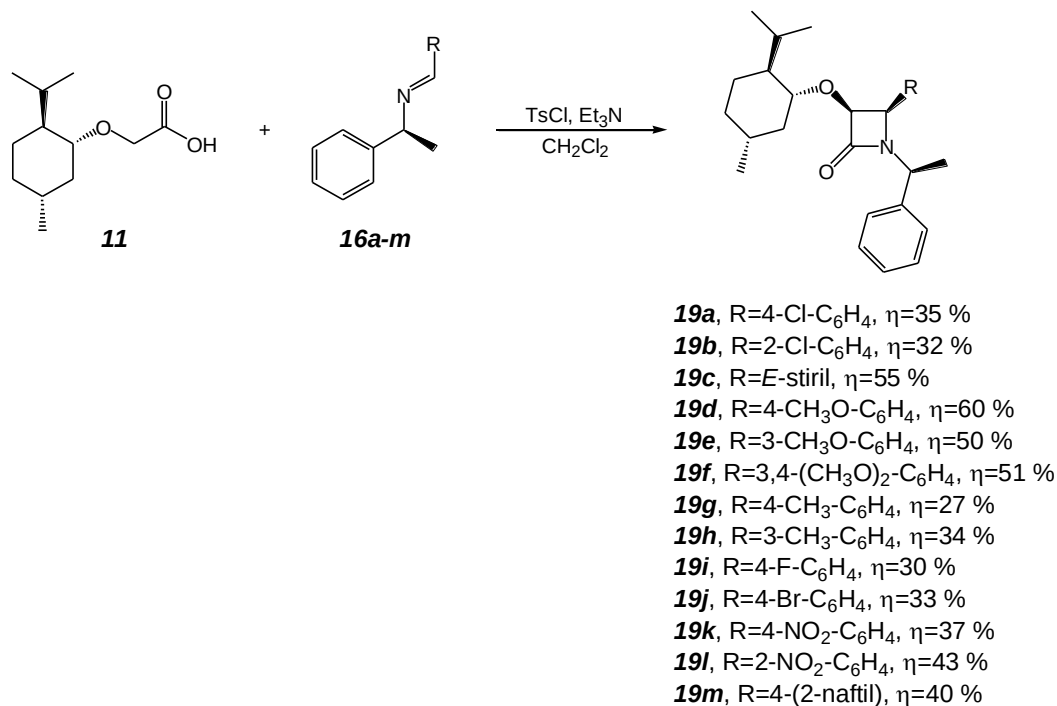
Shema 4. Sinteza *cis*-β-laktama **13** i **14** iz kiralne kiseline **11** i akiralnog imina **12**

Polazeći od kiralnog imina **16a** i akiralne karboksilne kiseline **15** dobivena je dijastereoizomerna smjesa *cis*-β-laktama **17** i **18**, u dobrom prinosu sa slabom dijastereoselektivnošću u omjeru 55:45, Shema 5.



Shema 5. Sinteza *cis*-β-laktama **16** i **17** iz akiralne kiseline **15** i kiralnog imina **16a**

Međutim, Staudingerovom reakcijom između kiralne karboksilne kiseline **11** i kiralnih imina **16a-m** uz tosil-klorid i trietilamin kao bazu, nastaju β-laktami **19a-m** u dobrom iskorištenju (27–60 %) i s izvrsnom dijastereoselektivnošću (d.v.=100 %, d.v. – skraćenica za dijastereomerni višak), Shema 6. Kiralni imini **16a-m** dobiveni su kondenzacijskom reakcijom (S)-(-)-1-feniletilamina i različito supstituiranih benzaldehida u refluksirajućem etanolu. Najbolje iskorištenje od 60 % dobiveno je u reakciji imina **19d**, dobivenog iz 4-metoksibenzaldehida i (S)-(-)-1-feniletilamina **16d**, i mentoksiotene kiseline **11**.

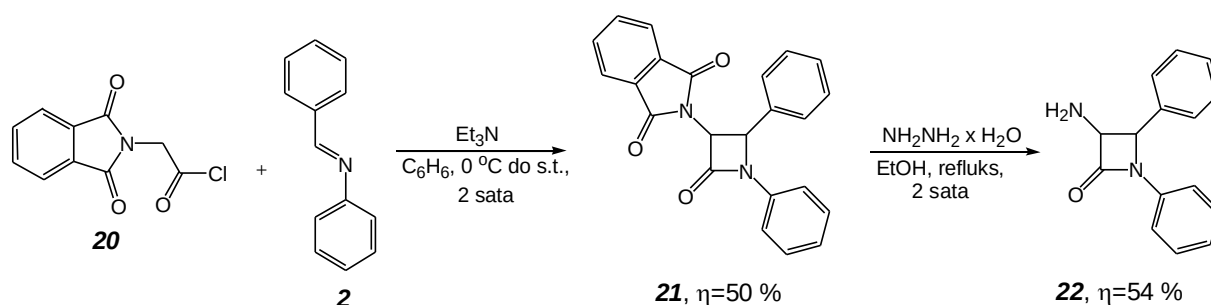


Shema 6. Sinteza *cis*-β-laktama **19a-m** iz kiralne kiseline **11** i kiralnog imina **16a-m**

Antimikrobna aktivnost spojeva **13**, **14**, **17**, **18** i **19a-m** ispitana je na Gramm-pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* te Gramm-negativnim bakterijama *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Utvrđeno je da ovi spojevi ne pokazuju značajnu aktivnost na testirane bakterije. Nadalje, ispitana je i antimalarijska aktivnost na *Plasmodium falciparum* K14. Svih 15 ispitivanih spojeva pokazalo je umjerenu do izvrsnu antimalarijsku aktivnost (IC₅₀=8–50 μmol L⁻¹). Spojevi s 3-metoksifenilnom skupinom **19e** (IC₅₀ = 8 μmol L⁻¹), 3,4-dimetoksifenilnom **9f** (IC₅₀ = 8 μmol L⁻¹) i naftilnom skupinom **19m** (IC₅₀ = 10 μmol L⁻¹) na C-4 atomu β-laktama pokazali su bolju aktivnost od referentnog spoja klorkinina, dok je spoj s 4-bromfenilnom skupinom **19j** pokazao antimalarijsku aktivnost jednaku kao i klorkinin (IC₅₀ = 11 μmol L⁻¹).

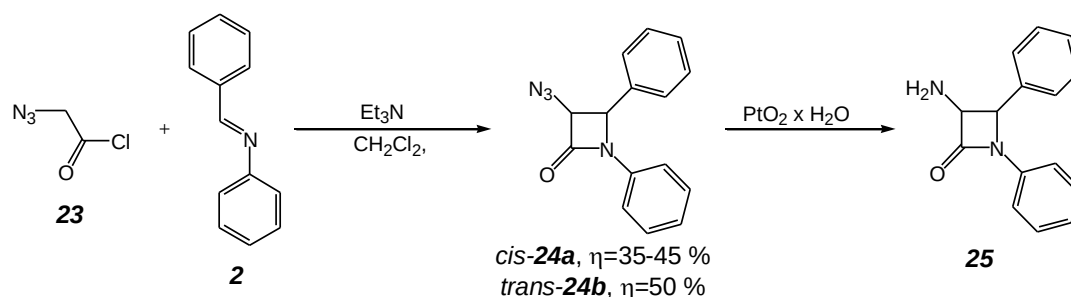
2.1.1.1.1. Sinteza 3-amino-β-laktama

Sheehan i Ryan prvi su 1951. godine pripravili 3-amino-β-laktam **22**, Shema 7. Reakcijom ketena dobivenog iz ftalimidoacetil-klorida **20** i imina **2** u prisutnosti trietilamina pripravili su 3-ftalimido-β-laktam **21** u dobrom iskorištenju (56 %). Hidrazinolizom ftalimida **21** u refluksirajućem etanolu dobiven je 3-amino-β-laktam **22**.^{18,39}



Shema 7. Sinteza 3-amino-1,4-difenil-azetidin-2-ona **22**

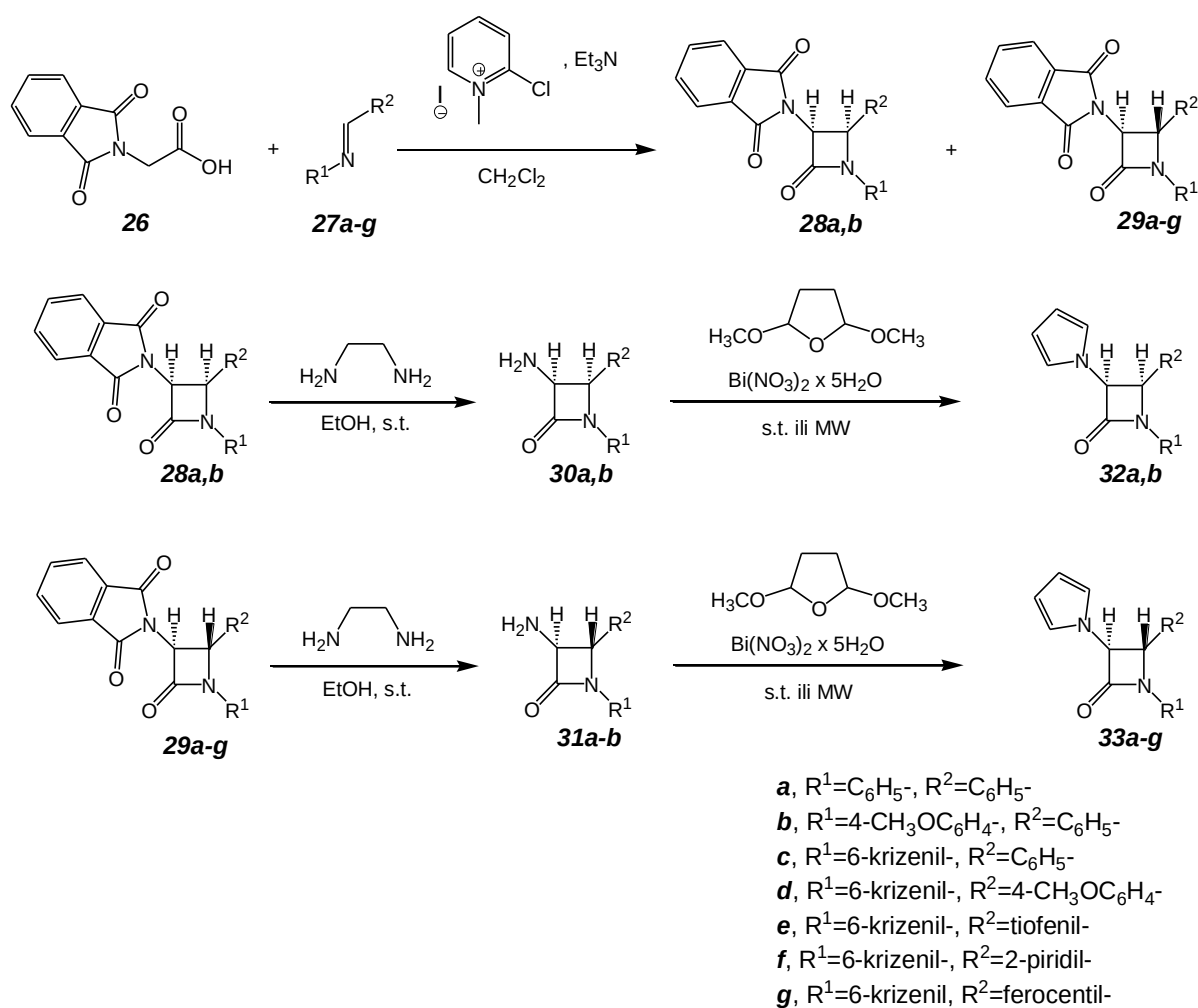
Bose i suradnici su 1967. godine opisali sintetski put za pripravu 3-amino- β -laktama **25** u kojemu se β -laktamski prsten pripravlja Staudingerovom reakcijom između azidoacetil-klorida **23** i imina **2**, Shema 8. Kao produkt dobiva se smjesa *cis*-**24a** i *trans*-**24b** 3-azido- β -laktama u omjeru 75:25 ili 25:75. Autori su uočili da redosljed dodavanja reaktanata utječe na *cis*-i *trans*-stereoselektivnost. Dodavanje kiselinskog klorida **23** otopini imina **2** i trietilamina pogoduje nastajanju *cis*-izomera (*cis:trans* = 75:25), dok *trans*-izomeru pogoduje dodavanje baze trietilamina smjesi kiselog klorida **23** i imina **2** (*cis:trans* = 25:75). U sljedećem reakcijskom koraku je elektron-odvlačeća azido skupina pomoću Adamsova katalizatora (PtO_2) konvertirana u elektron-donirajuću amino skupinu **25**, Shema 8.^{18,40}



Shema 8. Sinteza 3-amino- β -laktama **25** prema sintetskom putu opisanom od Bose i suradnika

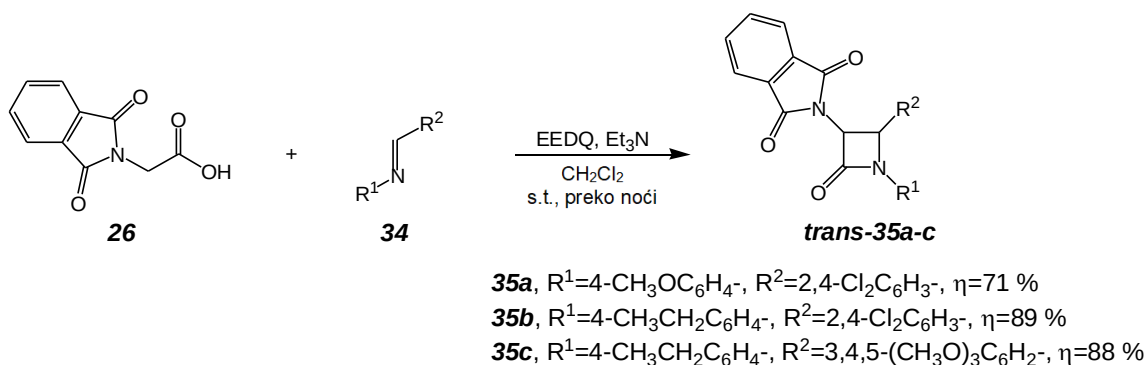
Bandyopadhyay i suradnici pripravili su različito supstituirane 3-pirol- β -laktame **32a,b** i **33a-g** iz 3-amino- β -laktama. β -Laktamski prsten sintetiziran je Staudingerovom (2+2) cikloadicijskom reakcijom između ftalimidooctene kiseline (*N*-ftaloilglicina) **26**, aktivirane 2-klor-1-metilpiridin-jodidom (Mukaiyama reagens) i imina **27a-g** uz trietilamin kao bazu pri čemu kao produkti nastaju 3-ftalimido- β -laktami **28a,b** i/ili **29a-g**, Shema 9. Spojevi s fenilnom ili 4-metoksifenilnom skupinom na N-1 atomu β -laktamskog prstena nastaju kao diastereoizomerna smjesa *cis*-**28a** i *trans*-**29a** izomera ili *cis*-**28b** i *trans*-**29b**, dok u slučaju spojeva s 6-krizenilnom skupinom **29c-g** na N-1 atomu nastaje samo *trans*-izomer. Dobivene

dijastereoizomerne smjese β -laktama **28a**, **29a** (*cis:trans* = 2:1) te **28b**, **29b** (*cis:trans* = 2:1) odvojene su kromatografski. 3-Amino- β -laktami **30a,b** i **31a-g** dobiveni su iz spojeva **28a,b** i **29a-g** uklanjanjem ftalimido skupine s β -laktamske amino skupine pomoću etilendiamina u etanolu. Pritom su produkti *cis*-**30a,b** i *trans*-**31a-g** dobiveni u 70–89 %-tnom iskorištenju. Dobiveni 3-amino- β -laktami, *cis*-**30a,b** i *trans*-**31a-g**, zatim reagiraju s 2,5-dimetoksi tetrahidrofuranom uz bizmutov(III) nitrat pentahidrat kao katalizator, pri čemu nastaju 3-pirol- β -laktami *cis*-**32a,b** ili *trans*-**33a-g**. Sinteze spojeva *cis*-**32a,b** i *trans*-**33a-g** provedene su na dva načina; konvencionalnom sintetskom metodom (12 sati, s.t.) i mikrovalnom sintetskom metodom (2–5 min, 50 °C, 300 W) pri čemu je prinos za spojeve *cis*-**32a,b** i *trans*-**33a-g** u reakciji izvedenoj pod utjecajem mikrovalnog zračenja (88–96 %) bio viši nego u konvencionalnoj metodi (43–77 %) te su produkti dobiveni u znatno kraćem reakcijskom vremenu u odnosu na konvencionalnu sintezu.⁴¹



Shema 9. Sinteza 3-pirol- β -laktama **33a-g**

Grupa znanstvenika, predvođena Zavar-om provela je Staudingerovu reakciju između karboksilne kiseline **26** aktivirane s EEDQ-om i imina **34** pomoću trietilamina u bezvodnom diklormetanu, pri čemu nastaju *trans*- β -laktami **35a-c**, Shema 10. Bez obzira na supstituent, produkti su dobiveni u visokim iskorištenjima (71–89 %), nakon prekrizalizacije iz 95 % etanola.⁵



Shema 10. Sinteza *trans*-3-ftalimido- β -laktama **35a-c**

2.1.1.1.2. Asimetrična Staudingerova sinteza 3-amino- β -laktama i njihovih prekursora

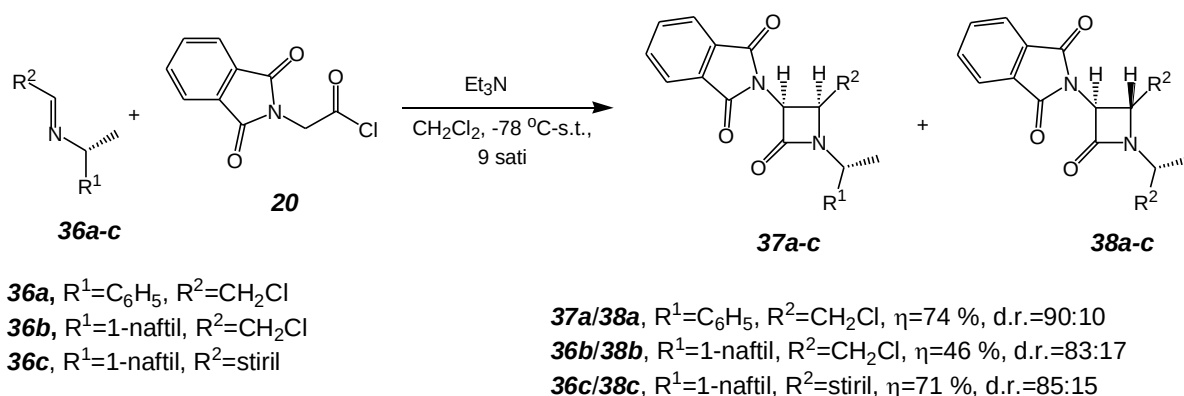
Asimetrična indukcija u Staudingerovoj reakciji može se ostvariti korištenjem.^{17,18,28,29}

- kiralnog imina i akiralnog ketena,
- kiralnog ketena i akiralnog imina i
- kiralnog ketena i kiralnog imina.

2.1.1.1.2.1. Asimetrična indukcija kiralnim iminom

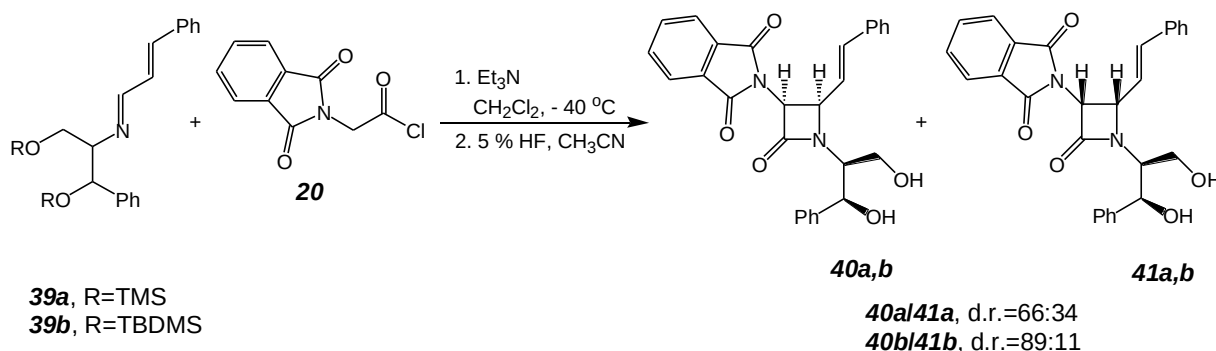
Kiralni imini mogu se dobiti iz kiralnih aldehida i akiralnih amina ili iz kiralnih amina i akiralnih aldehida. U većini slučajeva, umjerene do dobre diastereoselektivnosti primijećene su u Staudingerovim reakcijama upotrebom imina dobivenih iz jednostavnih kiralnih amina poput (*R*)-1-feniletilamina ili (*R*)-1-naftiletilamina. Reakcijom ftalimidoacetyl-klorida **20** s kiralnim iminom **36a**, dobivenim iz (*R*)-1-feniletilamina, u prisutnosti trietilamina nastaje diastereoizomerna smjesa *cis*-**37a** i *trans*- β -laktama **38a** u dobrom iskorištenju (74 %) i s dobrom diastereoselektivnošću (**37a/38a**, d.v.=90:10), Shema 11.⁴² Koristeći istu metodologiju, kasnije su Georg i Wu reakcijom kiralnih imina **36b,c** dobivenih iz (*R*)-(+)-1-(1-naftil)etilamina i različitih aldehida (*trans*-cinamilaldehida i kloroacetaldehida) i ftalimidoacetyl-

klorida **20** pripravili smjesu *cis*-4-stiril- β -laktama **37b** i **38b** u omjeru 85:15 i *cis*-4-klormetil- β -laktama **37c** i **38c** u omjeru 83:17. Osim toga, pripravili su i smjesu β -laktama **37a** i **38a** u niskom iskorištenju (20 %) i s dobrom diastereoselektivnošću (d.v.=80:20), polazeći od imina **36a**. Kada je kao amin korišten (*R*)-(+)-1-(1-naftil)etilamin dobiveni su β -laktamski produkti s nešto višim stupanjem asimetrične indukcije.⁴³



Shema 11. Sinteza β -laktama **37** i **38** asimetričnom indukcijom kiralnim iminom **36a-c**

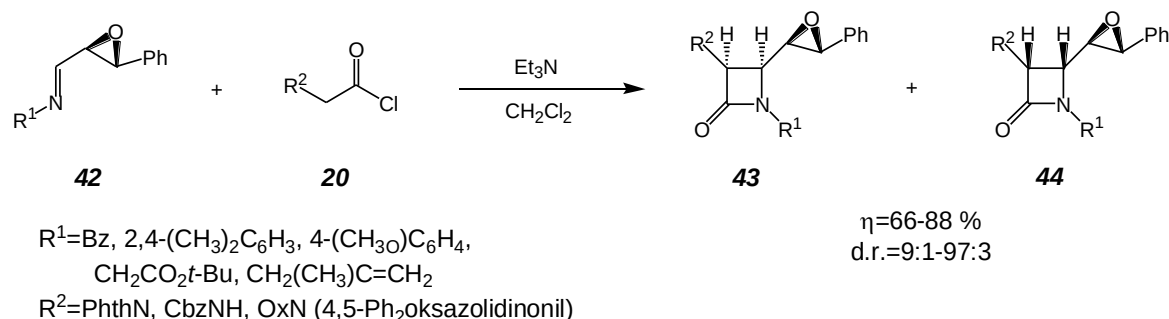
Reakcijom imina **39a** ($\text{R} = \text{TMS}$) s ftalimidoacetil-kloridom **20** dobivaju se β -laktami **40a** i **41a**, u dobrom iskorištenju i s niskom diastereoselektivnošću (d.v.=66:34). Zamjena trimetilsililne (TMS) zaštitne skupine u iminu **39a**, većom *tert*-butildimetilsililnom (TBDMS) skupinom u **39b** rezultirala je promjenom diastereomernog omjera **40b:41b** s 66:34 na 89:11, Shema 12.^{18,44}



Shema 12. Dijastereoselektivna sinteza *cis*-3-ftalimido-4-stiril- β -laktama **40a,b** i **41a,b**

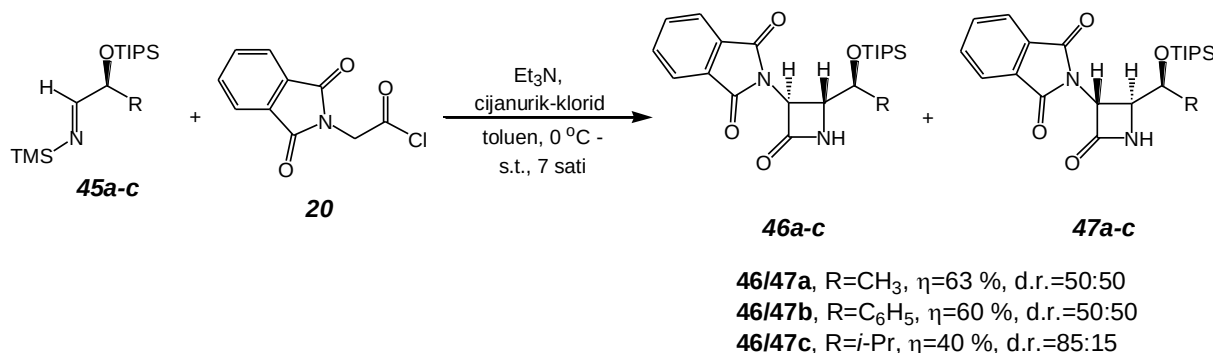
Primjerice, bolja stereoselektivnost u Staudingerovoj reakciji može se postići primjenom imina dobivenih iz kiralnih aldehida. U reakciji se mogu koristiti imini dobiveni iz α -oksialdehida, iz aldehidnih derivata šećera, α,β -epoksiimina i α -aminoaldehida. Reakcijom pretežito nastaju

cis- β -laktamski produkti. Na primjer, reakcijom kiralnog epoksiimina **42** s ftalimidoacetyl-kloridom **20** u prisutnosti trietilamina nastaje diastereoizomerna smjesa dva *cis*-3-amino- β -laktama **43** i **44** u omjeru diastereomera od 9:1 do 93:7, Shema 13.⁴⁵



Shema 13. Sinteza β -laktama **43** i **44** asimetričnom indukcijom kiralnim iminom **42**

Bandini i suradnici su 1996. godine pripravili *trans*-3-ftalimido- β -laktame **46a-c** i **47a-c** diastereoselektivnom sintezom *N*-(trimetilsilil)imina **45a-c**, dobivenog iz kiralnih *O*-silil zaštićenih α -hidroksialdehida, s ftalimidoacetyl-kloridom **20** u prisustvu trietilamina, Shema 14. U reakciji nastaju dva diastereoizomera u dobrom iskorištenju (40–63 %) i s dobrom diastereoselektivnošću (50:50 do 85:15). Najbolji rezultat (85:15) dobiven je korištenjem imina **45c** dobivenim iz aldehida s izopropilnom skupinom u bočnom lancu.⁴⁶

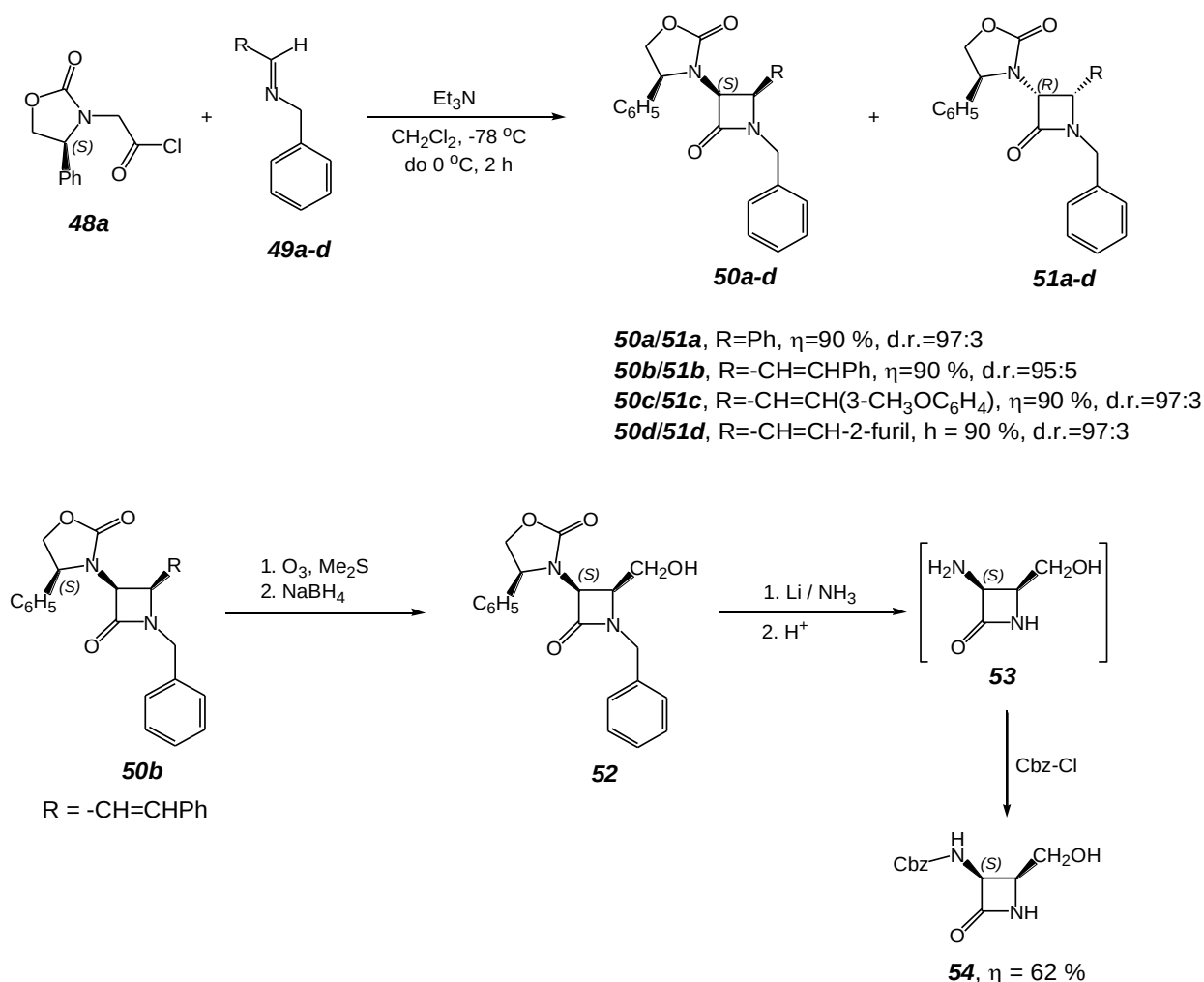


Shema 14. Diastereoselektivna sinteza *trans*-3-ftalimido- β -laktama **46a-c** i **47a-c**

2.1.1.1.2.2. Asimetrična indukcija kiralnim ketenom

Drugi pristup asimetričnoj Staudingerovoj (2+2) keten-imin cikloadiciji je primjena kiralnog ketena. Ova je strategija vrlo uspješna za asimetričnu sintezu *cis*-3-amino- β -laktama. Za kiralnu indukciju posredovanu ketenom najčešće se koriste kiralni oksazolidinonski zaštićeni aminoketeni, odnosno oksazolidinoni dobiveni iz (*S*)- i (*R*)-fenilglicina.^{17,18,29} Evans i Sjogren

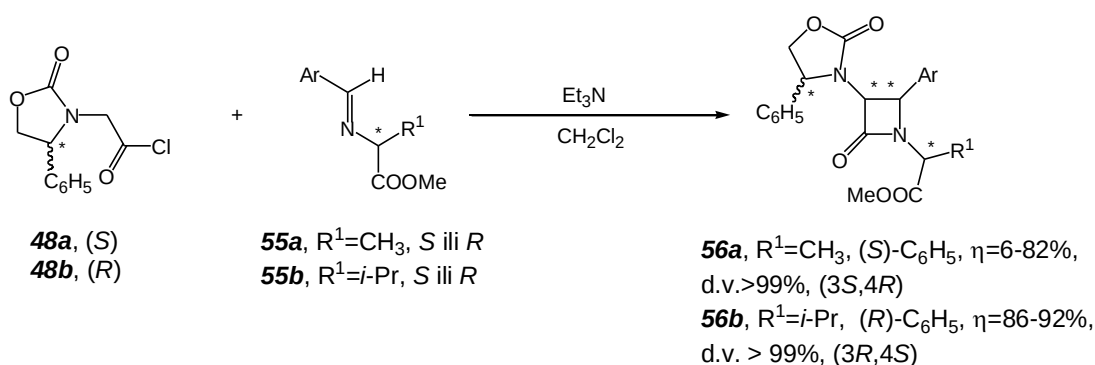
prvi su 1985. godine primijenili ovaj asimetrični pristup za dobivanje *cis*- β -laktama **50a-d**. Reakcijom (4*S*)-2-okso-4-feniloksazolidin-3-il-acetil-klorida **48a** i *N*-benzilimina **49a-d** nastaju β -laktami **50a-d** u odličnim iskorištenjima (80–90 %) i odlične diastereoselektivnosti (d.v.=92–97 %), Shema 15. Ozonolizom alkena **50b** (R=–CH=CHPh) uz dimetil-sulfid nastaje aldehid, a potom redukcijom karbonilne skupine pomoću NaBH₄ nastaje primarni alkohol **52** u odličnom iskorištenju (96 %). U sljedećem koraku spoju **52** se uklanja zaštitna oksazolidinonska skupina Birchovom redukcijom (Li u tekućem amonijaku) uz istodobnu *N*-debenzilaciju te se dobiva međuprodukt *cis*-3-amino- β -laktam **53**, koji s benzoksikarbonil-kloridom (Cbz-Cl) daje produkt **54** u iskorištenju od 62 %.⁴⁷



Shema 15. Asimetrična Staudingerova sinteza *cis*-3-*N*-Cbz- β -laktama **54** primjenom kiralnog ketena generiranog *in situ* iz acil-klorida **48a**

2.1.1.1.2.3. Dvostruka asimetrična indukcija

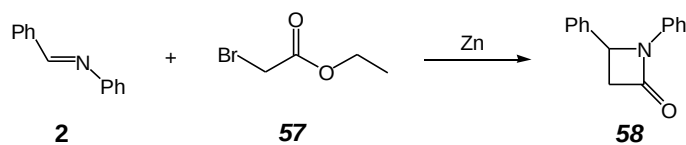
Ojima i suradnici prvi su 1987. godine ispitali dvostruku asimetričnu indukciju u Staudingerovoj reakciji između kiralnih acil-klorida **48a,b** i kiralnih imina **55a,b** dobivenih iz kiralnih amina uz trietilamin kao bazu, Shema 16. U ovoj reakciji kao produkt dobiven je *cis*- β -laktam **56a,b** u dobrom ili odličnom iskorištenju i odlične diastereoselektivnosti. Ojima i suradnici u ovom radu su utvrdili da stereokemijski ishod ove reakcije ne ovisi o kiralnom iminskom supstituentu.^{48,49}



Shema 16. Sintaza β -laktama dvostrukom asimetričnom indukcijom

2.1.1.2. Ciklokondenzacija enolata kiralnog estera i imina

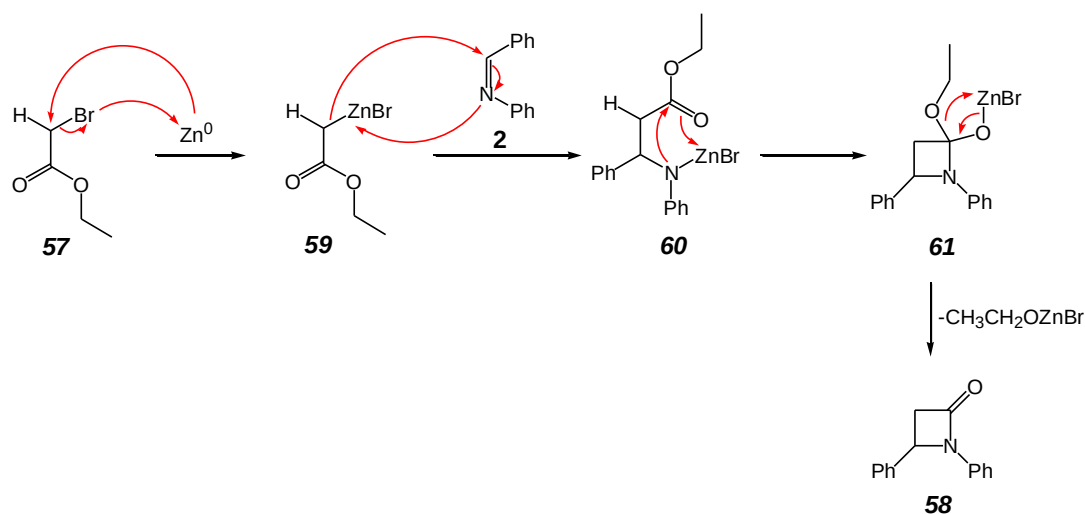
Gilman i Speeter prvi su 1943. godine opisali sintetski put za pripremu β -laktama ciklokondenzacijom enolata estera i imina.^{25,50} Reakcijom etil-bromacetata **57** s benzilidenanilinom **2** uz dodatak elementarnog cinka nastaje β -laktam **58** u dobrom iskorištenju od 56 %, Shema 17.



Shema 17. Gilman-Speeter reakcija

Predloženi mehanizam reakcije prikazan je na Shemi 18. Gilman-Speeter-ova reakcija uključuje stvaranje Reformatskovog reagensa **59** iz α -haloestera **57**. Nakon toga slijedi, nukleofilna adicija Reformatskovog reagensa **59** na imin **2** pri čemu nastaje međuprodukt **60** te

dolazi do intramolekulske ciklizacije pri čemu nastaje heterociklički spoj **61** koji potom daje četveročlani β -laktamski prsten **58**.⁵⁰



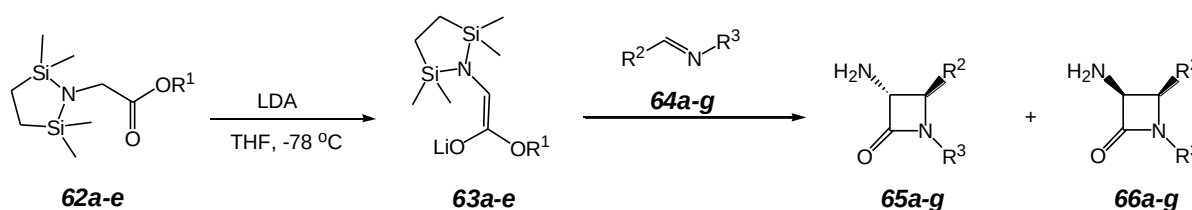
Shema 18. Mehanizam Gilman-Speeter-ove reakcije

Ciklokondenzacija enolata kiralnog estera i imina učinkovita je metoda za asimetričnu sintezu β -laktama i široko se primjenjuje za pripremu 3-amino- i 3-hidroksi- β -laktama s izvrsnim enantioselektivnostima.^{17,29} Osim cinkovih enolata, koriste se i litijevi, aluminijski, titanovi enolati i drugi enolati.^{18,25}

Ojima i Habuš pripremili su seriju 3-amino- β -laktama ciklokondenzacijom enolata estera *N,N*-bis(silil)glicina **62** s odgovarajućim iminima **64a-g** pomoću litijevog diizopropilamida, Tablica 1.⁵¹ Kao kiralno sredstvo u reakciji koristili su (–)-mentol, (+)-neomentol, (–)-borneol, (–)-*trans*-2-fenil-cikloheksan-1-ol i (+)-*trans*-2-fenil-cikloheksan-1-ol. Ciklokondenzacijom litijevog enolata mentilnog estera glicina **63** s iminima **64a-c** isključivo nastaje *trans*-(3*R*,4*R*)-3-amino- β -laktam **65a-c** s izvrsnim enantioselektivnostima (e.v.>99 %), što znači da su produkti nastali preko (*Z*)-enolata kiralnog estera glicina. Reakcijom s iminima **64d,e** nastaje *trans*-izomer **65d,e** s e.v.>99 %, ali nastaje i mala količina *cis*-izomera (**66d,e**) niske enantioselektivnosti (e.v.=38 %). Reakcijom ciklokondenzacije litijevog enolata mentilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **62a** i *N*-(trimetilsilil)imina **63f** dobiva se enantiomerno čisti *trans*-(3*R*,4*R*)- β -laktam **65f** u niskom iskorištenju (38 %) i s dobrom enantioselektivnošću (e.v.=68 %), dok se u slučaju imina **64g** dobiva isključivo *cis*-(3*S*,4*R*)- β -laktam **66g** u 48 %-tnom iskorištenju i vrlo niskom enantiomernom višku (e.v.=11 %). Isto tako, reakcijom (–)-*trans*-2-fenil-cikloheks-1-ilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **62b** s iminom **64g** nastaje isključivo produkt *cis*-**66i** u dobrom iskorištenju od 46 % i dobre enantioselektivnosti (e.v.=78 %). Međutim,

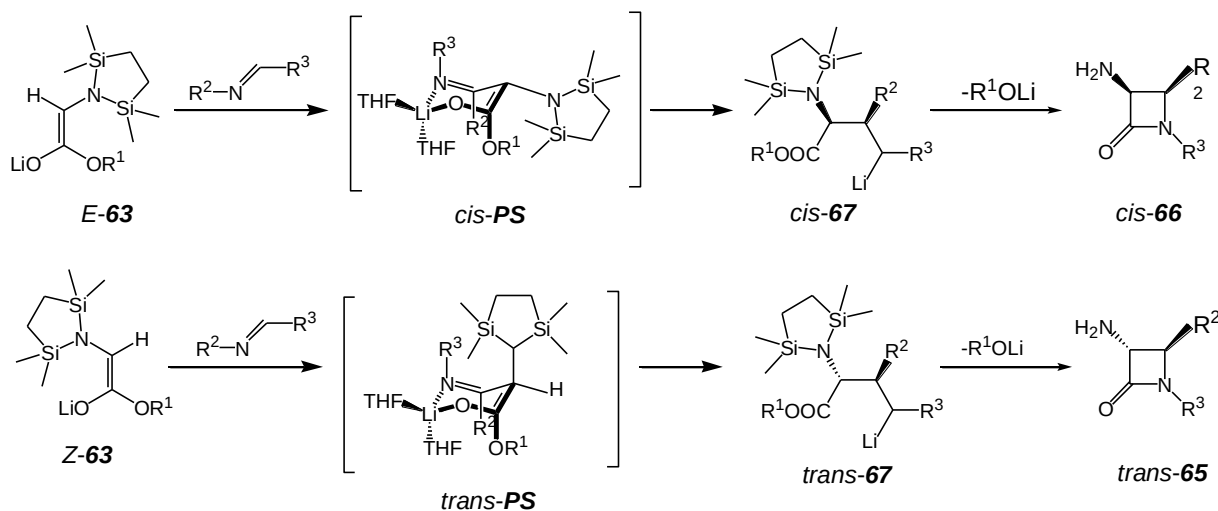
ciklokondenzacijom (+)-neomentilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **62d** s iminom **64a** kao produkt dobiva se smjesa *trans*-**65k** i *cis*-**66k** izomera u omjeru 26:74. Reakcijom (–)-*trans*-2-fenilcikloheks-1-ilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **62b** s iminom **64a** nastaje isključivo *trans*-β-laktam **65h** u dobrom prinosu i odlične enantioselektivnosti, dok reakcijom (+)-*trans*-2-fenilcikloheks-1-ilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **62c** s iminom **64a** nastaje isključivo produkt *cis*-β-laktam **66j** u dobrom iskorištenju i dobre enantioselektivnosti. Kada je korišten (–)-bornilni ester *N,N*-bis(silil)glicina **62e** kao produkt dobivena je smjesa *trans*-**65l** i *cis*-**66l** izomera 3-amino-β-laktama u omjeru 37:63 s vrlo niskom enantioselektivnošću. Pokazano je da su (–)-mentol i (–)- i (+)-*trans*-2-fenil-cikloheksan-1-ol bolja kiralna pomoćna sredstva od (–)-neomentola i (–)-borneola.⁵¹

Tablica 1. Asimetrična sinteza 3-amino-β-laktama metodom ciklokondenzacije kiralnog litijevog enolata **62a-e** i imina **64a-g**



Unos	R ¹	R ²	R ³	65/66	η (%)	% <i>trans</i> -65 (%e.v.)	% <i>cis</i> -66 (%e.v.)
1	(–)-mentil	C ₆ H	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>a</i>	65	100 (> 99)	
2	(–)-mentil	4-F-C ₆ H ₄	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>b</i>	55	100 (> 99)	
3	(–)-mentil	4-CF ₃ -C ₆ H ₄	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>c</i>	59	100 (> 99)	
4	(–)-mentil	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>d</i>	70	89 (> 99)	11 (38)
5	(–)-mentil	3,4-(CH ₃ O) ₂ -	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>e</i>	54	91 (> 99)	9 (38)
6	(–)-mentil	C ₆ H ₅	Si(CH ₃) ₃	<i>f</i>	38	100 (68)	
7	(–)-mentil	C ₆ H ₅ CH=CHCH ₃	Si(CH ₃) ₃	<i>g</i>	48		100 (11)
8	(–)- <i>trans</i> -2-fenil-cikloheks-1-il	C ₆ H ₅	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>h</i>	58	100 (> 99)	
9	(–)- <i>trans</i> -2-fenil-cikloheks-1-il	C ₆ H ₅ CH=CHCH ₃	Si(CH ₃) ₃	<i>i</i>	46		100 (78)
10	(+)- <i>trans</i> -2-fenil-cikloheks-1-il	C ₆ H ₅	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>j</i>	46		100 (78)
11	(+)-neomentil	C ₆ H ₅	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>k</i>	65	26 (54)	74 (21)
12	(–)-bornil	C ₆ H ₅	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	<i>l</i>	53	37 (5)	63 (2)

Ojima i Habuš⁵¹ te Van der Steen i suradnici⁵² predložili su mehanizam za reakciju ciklokondenzacije enolata litijevog kiralnog estera glicina s iminom, Shema 19.



Shema 19. Predloženi mehanizam ciklokondenzacije litijevog kiralnog enolata i imina

Stereoselektivnost reakcije je izravno povezana s mehanizmom same reakcije. Prema mehanizmu reakcijom kiralnog litijevog estera glicina (*Z*)-**63** ili (*E*)-**63** s iminom nastaje prijelazno stanje *cis-PS* i/ili *trans-PS*, koje u konačnici daje *cis*- i/ili *trans*-β-laktame. Kao što je prikazano na Shemi 19, reakcija (*Z*)-enolata **63** prolazi kroz prijelazno stanje *trans-PS* kako bi se dobili *trans*-β-laktami, dok reakcija (*E*)-enolata **63** daje *cis*-β-laktame preko prijelaznog stanja *cis-PS*. Kada se kao kiralna sredstva koriste (–)-mentol, (–)- ili (+)-2-fenil-cikloheksan-1-ol, pretežito ili isključivo nastaju *trans*-β-laktami **65a-f,h**, što sugerira da (*Z*)-enolati reagiraju mnogo brže od (*E*)-enolata i na taj način reakcije prolaze kroz prijelazno stanje *trans-PS* i pri tome nastaje *trans*-litijev amid **67**, a potom zatvaranjem prstena nastaje *trans*-β-laktam **65**. Prijelazno stanje *trans-PS*, s arilnom skupinom (R^3) na N-atomu imina, u odnosu na *cis-PS* posjeduje manje steričke smetnje koje pridonose lakšem nastanku *trans*-β-laktama. Međutim, u reakciji enolata litijevog kiralnog estera glicina **62a** s *N*-trimetilsililnim iminom **64g** isključivo nastaje *cis*-β-laktam **66g**, zbog toga što je prijelazno stanje *cis-PS* energetski povoljnije jer su manje steričke smetnje između *N,N*-bis(silil)amino i stilinske skupine ($-C_6H_5CH=CHCH_3$). Preferirano nastajanje jednog od dva izomera β-laktama ovisi o stereokemiji polaznog enolata.^{29,51,52}

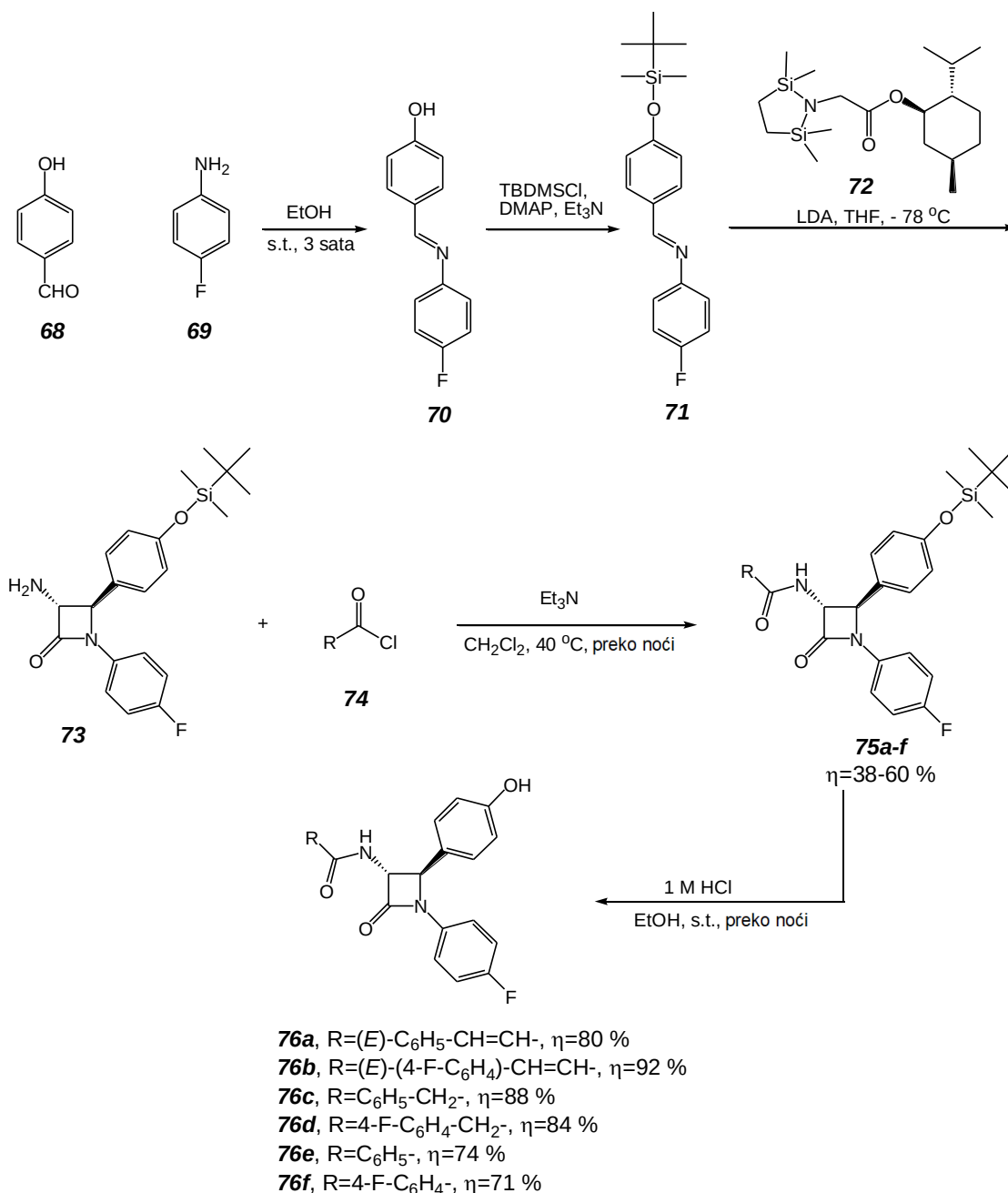
Kasnije su Dražić i suradnici sintetizirali β-laktamske amide **76a-f** s različitim pobočnim skupinama, Shema 20.⁵³ β-Laktam **73** sintetizirali su prema sintetskom putu opisanom od Ojime i Habuša.⁵¹ Imin **70** pripravljen je u 84%-tnom iskorištenju u reakciji 4-hidroksibenzaldehida i

4-fluoranilina u etanolu. Hidroksilna skupina imina **68** zaštićena je pomoću *tert*-butil-dimetilsililklorid (TBDMSCl) u prisustvu dimetilaminopiridina (DMAP) i trietilamina. Zaštićeni amino- β -laktam **73** sintetiziran je ciklokondenzacijom zaštićenog imina **71** i enolata mentilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **72** i pomoću litijevog diizopropilamida, te je dobiven u 43 %-tnom iskorištenju. Kao kiralno sredstvo upotrijebljen je (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentol. Amidi **71a-f** pripremljeni su iz zaštićenog amino- β -laktama **73** i odgovarajućih acil-klorida **74a-f**. Reakcijom *N*-acilacije β -laktama **73** u diklormetanu u prisustvu baze trietilamina pri refluxu otapala dobiveni su zaštićeni amidi **75a-f** u 40–60 %-tnom iskorištenju. Skidanje *tert*-butil-dimetilsililne zaštite provedeno je pomoću 1 mol dm⁻³ klorovodične kiseline u etanolu. Pritom su konačni produkti **76a-f** dobiveni u 70–90 %-tnom iskorištenju.

Dražić i suradnici ispitali su sposobnost inhibicije apsorpcije kolesterola za amide **76a-f** i usporedili ih s referentnim lijekom ezetimibom.⁵³ Nadalje, ispitali su biološku aktivnost ezetimiba i amida **76a-f** na *in vitro* i *in vivo* modelima. Citotoksičnost ovih spojeva određena je primjenom proliferacijskog testa MTT na staničnim linijama MDCKIIwt (engl. *Madin-Darby Canine Kidney II Wide Type*), hNPC1L1/MDCKII (MDCKII stanice s eksprimiranim transporterom NPC1L1) i Hep G2 (engl. *Hepatocellular Carcinoma*). Rezultati MTT testa pokazali su da spojevi **76c** i **76d** ne pokazuju toksični učinak na ispitivane stanične linije, dok spojevi **76a**, **76b**, **76e** i **76f** pokazuju nisku toksičnost, koja je usporediva s ezetimibom. Inhibicija apsorpcije kolesterola za ezetimib i *trans*-amino- β -laktamske amide **76a-f** ispitana je *in vitro* u hNPC1L1/MDCKII stanicama u koncentracijskom rasponu od 0-200 μ mol dm⁻³. Rezultati dobiveni testiranjem pokazali su da su amidi **76a-f** snažni inhibitori apsorpcije kolesterola u *in vitro* uvjetima.

Nadalje, Dražić i suradnici ispitali su *in vivo* sposobnost apsorpcije kolesterola za ezetimib i amide **76b**, **76d** i **76f** s 4-fluorofenilnom skupinom u bočnom lancu na C-3 atomu β -laktamskog prstena na genetski srođenim miševima soja C57BL/6 (engl. *Inbred C57BL/6 Mouse Strain*, samooplodni soj laboratorijskog miša). Miševima je u želudac aplicirano 20 mg/kg/dan spoja i [³H] kolesterola tijekom dva dana, a potom je određena razina radioaktivnog kolesterola u jetri i tankom crijevu koje je podijeljeno na tri dijela (duodenum, jejunum i ileum). Rezultati su pokazali da su amidi snizili razinu kolesterola u jetri (**76b** za 49 %, **76d** za 39 % i **76f** za 37 %) u odnosu na negativnu kontrolu (kukuruzno ulje). Također, amidi **76b**, **76d** i **76f** su snizili razinu kolesterola u svim djelovima tankog crijeva, tj. u duodenumu, jejunumu i ileumu. Amid **76b** pokazuje bolje djelovanje u tankom crijevu u odnosu na spojeve **76d** i **76f**. Međutim, niti jedan od amida nije dosegao aktivnost ezetimiba (duodenum 60 %, jejunum 52 % i ileum 44 %). Amid **76f** je imao najjaču aktivnost u duodenumu (42 %), a amid **76b** je imao

najjaču aktivnost u jejunumu (35 %) i ileumu (37 %). Prema tome, može se zaključiti da amidi **76a-f** mogu biti učinkoviti inhibitori apsorpcije kolesterola.

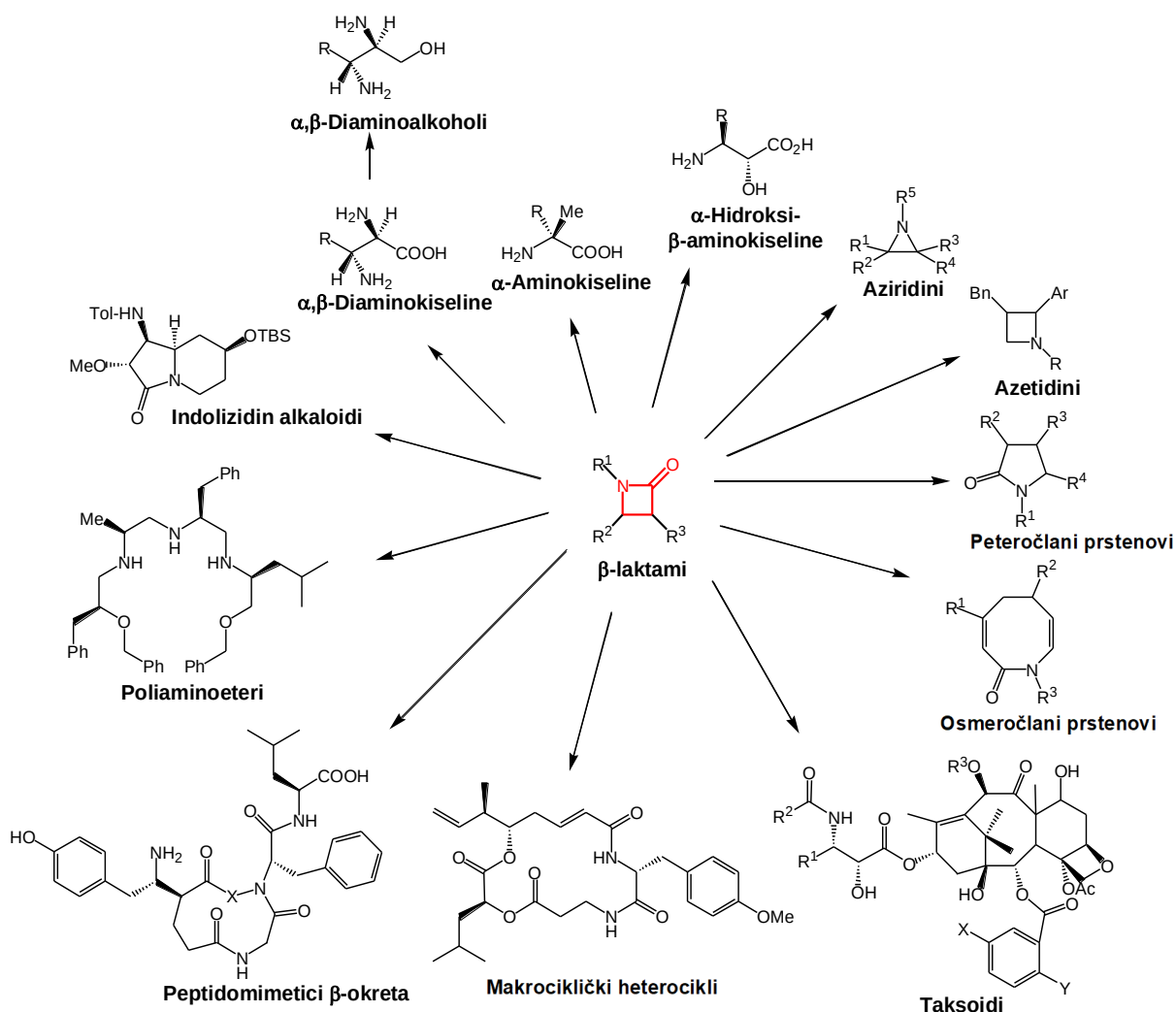


Shema 20. Sinteza β -laktamskih amida **76a-f**

2.1.2. β -Laktami kao građevne jedinice mnogih kemijskih spojeva

β -Laktami su prepoznati kao važne građevne jedinice u sintezi velikog broja različitih biološki aktivnih i prirodnih spojeva, kao što su neprirodne aminokiseline, peptidi, peptidomimetici, antitumorski lijek paklitaksel, antitumorski lijek lankacidin, docetaksel i drugi lijekovi.^{7,8,17,54}

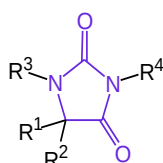
Transformacijom β -laktamskog prstena mogu se prirediti aziridini, hidantoini, pirolidini, šesteročlani prstenovi, osmeročlani prstenovi te raznovrsni makrociklički spojevi, Slika 9.^{7,8}



Slika 9. β -Laktami kao građevni blokovi u sintezi biološki aktivnih i prirodnih spojeva¹³

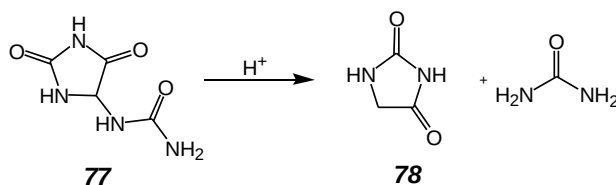
2.2. Hidantoini

Hidantoini, derivati 2,4-imidazolidindiona, su peteročlani heterociklički spojevi⁵⁵ koji sadrže dvije karbonilne skupine i dva atoma dušika⁵⁶ te ih se može pronaći kao strukturni motiv u prirodnim spojevima te biološki aktivnim i farmaceutskim spojevima, Slika 10.¹⁰



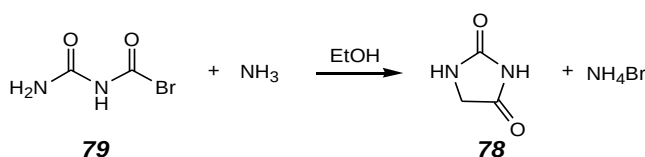
Slika 10. Općenita struktura hidantoina

Nobelovac Baeyer je 1861. godine otkrio najjednostavniji hidantoin **78**, imidazolidin-2,4-dion, kao proizvod hidrogeniranja alantoina **77**, Shema 21.⁵⁷ Alantoin **77** je jedan od nekoliko derivata hidantoina koji se javljaju u prirodi, a međuprodukt je metabolizma purina i nalazi se u urinu većine životinja, ali ne i čovjeka. Alantoin **77** je također glavni metabolički međuprodukt u mnogim drugim organizmima uključujući biljke, bakterije i gljive.⁵⁸



Shema 21. Sinteza hidantoina **78**, hidrogeniranjem alantoina **77**

Baeyer je 1864. godine pripravoio hidantoin **78** iz bromacetiluree **79** u prisustvu amonijaka, Shema 22,⁵⁹ a Strecker je 1870. godine odredio njegovu strukturu te utvrdio da se radi o cikličkom ureidu.⁶⁰

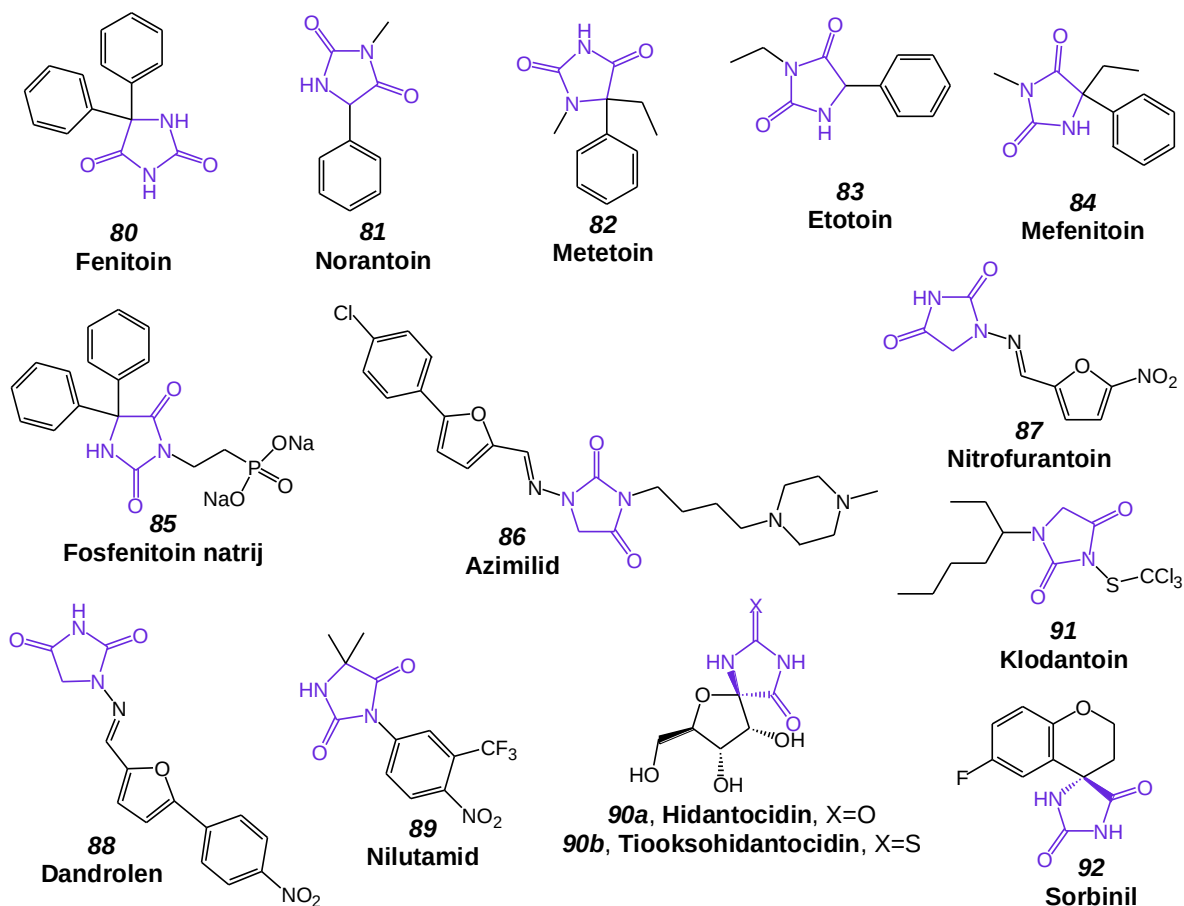


Shema 22. Baeyerova sinteza hidantoina **78** iz bromacetiluree **79**

2.2.1. Biološki aktivni hidantoini

Hidantoini derivati pokazuju različite i zanimljive farmakološke osobine. Fenitoin **80**, norantoin **81**, metetoin **82**, etotoin **83**, mefenitoin **84**, fosfenitoin natrij **85** se koriste u medicini kao antikonvulzivi u liječenju epilepsije, Slika 11. Ostali 5-supstituirani hidantoini kao što su: 5,5-ditienilhidantoin, 5,5-dipiridilhidantoin, spirotiohidantoin, tiohidantoin i ditiohidantoin također posjeduju antikonvulzivno djelovanje.^{13,61} Derivati hidantoina mogu biti i antiaritmici (azimilid **86**), antimikrobni agensi (nitrofurantoin **87**), sredstva za opuštanje mišića (dantrolen **88**) i nesteroidni antiandrogeni (nilutamid **89**).⁶² Nilutamid (5,5-dimetilhidantoin) **89** je prvi put odobren 1996. godine od Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*) za liječenje karcinoma prostate.¹² Alantoin **77** se koristi kao keratolitik, astringent, antacid, antipsorijatik te za liječenje rana.^{13,61} Hidantoini također pokazuju antidepresivna, antiviralna i antitrombocitna svojstva, kao i inhibitorno djelovanje na neke

enzime (humanu aldoza reduktazu i humanu elastazu iz leukocita). Neki herbicidi (hidantocidin **90a**, tiooksohidantocidin **90b**),^{13,63} fungicidi (klodantoin **91**) i insekticidi također imaju hidantoini prsten u svojoj strukturi.^{13,61} Spirohidantoini se smatraju novim inhibitorima aldoza reduktaze (sorbinil **92**) koji mogu pomoći u liječenju dijabetesa.^{13,64}



Slika 11. Biološki aktivni hidantoini

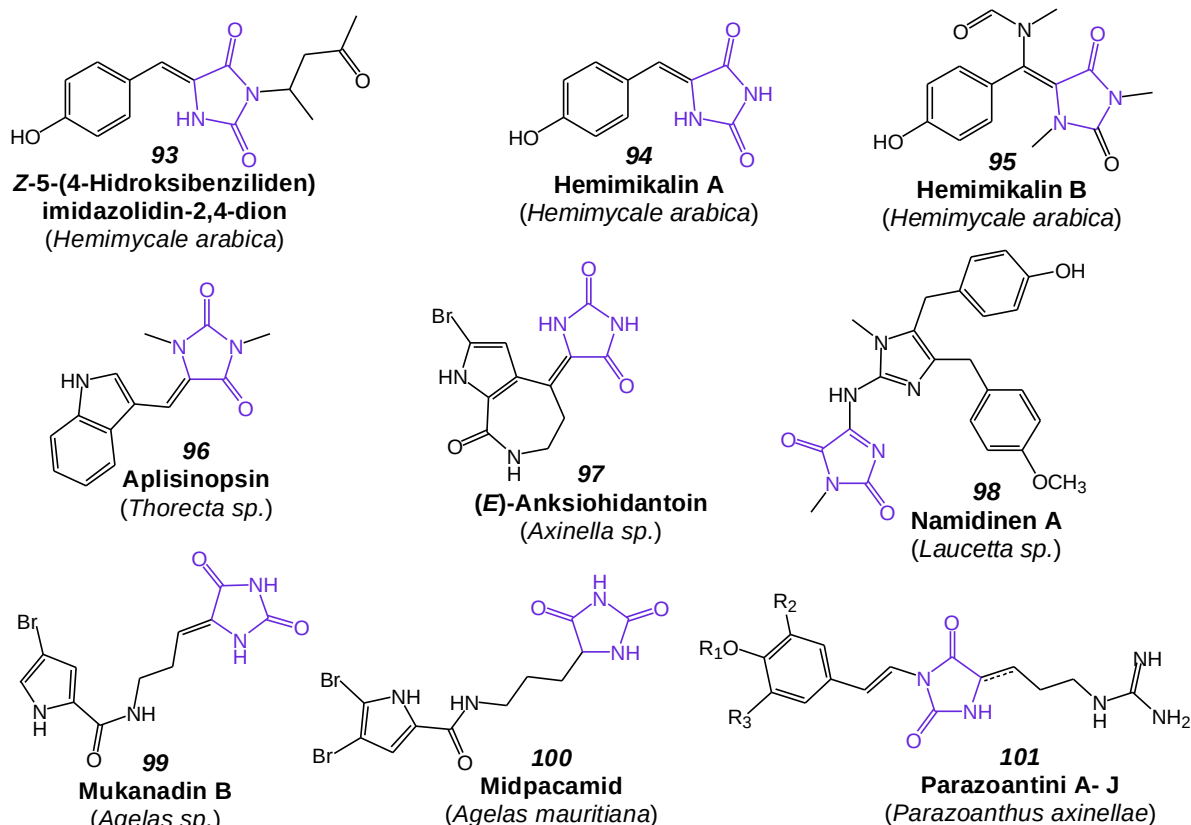
2.2.2. Hidantoini iz morskih organizama

Morski mikro i makro organizmi imaju sposobnost proizvodnje kemijski različitih i jedinstvenih molekula.⁶⁵ Morski organizmi su bogat prirodni izvor biološki aktivnih komponenti, a posjeduju različita farmakološka svojstva kao što su: antitumorska, antiupalna, antiviralna, antialergijska, analgetska i imunomodulatorska svojstva.¹³ Različiti alkaloidni spojevi koji su izolirani iz morskih organizama i bakterija također imaju hidantoini prsten u svojoj strukturi.¹¹

Morske spužve proizvode veliki broj strukturno različitih spojeva koji pokazuju različita farmakološka svojstva.¹³ Morske spužve iz roda *Hemimycale* proizvode biološki aktivne

sekundarne metabolite, kao što su policiklički gvanidinski alkaloidi (npr. ptilomikalin A) i derivati hidantoina,⁶⁶ Z-5-(4-hidroksibenziliden)imidazolidin-2,4-dion **93** i drugi, Slika 12.⁶⁷ Spoj **93** pokazuje značajni inhibitorski učinak na rast i invaziju stanica karcinoma prostate PC-3M u *in vitro* i *in vivo* modelu. Youssef i suradnici su 2015. godine otkrili dva nova hidantoina, hemimikalin A **94** i B **95**, koja su izolirali iz morske spužve *Hemimycale arabica*, Slika 12.¹³ Pored ova dva spoja **94** i **95**, izolirali su i već poznati hidantoin **93**. Autori su ispitali antimikrobna svojstva spojeva **93–95** na bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* te na gljivicu *Candida albicans*. Također, ispitan je i antiproliferacijski učinak na HeLa stanične linije humanog cervikalnog karcinoma. Spoj **93** pokazuje umjerenu antiproliferacijsku aktivnost na HeLa stanične linije ($IC_{50} = 28,3 \mu\text{g mL}^{-1}$). Hemimikalin A **94** i B **95** pokazuju slabu antiproliferacijsku aktivnost, $IC_{50} > 50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sva tri spoja pokazuju slabu antibakterijsku aktivnost na *Escherichia coli* i antifungalnu aktivnost na *Candida albicans*. Međutim, ovi spojevi nemaju nikakav učinak na *Staphylococcus aureus*.

Iz morske spužve *Thorecta* sp. izoliran je hidantoin, aplisinopsin **96**, koji pokazuje citotoksično djelovanje i učinak na neurotransmitere.^{12,68} Morske spužve *Axinella*, *Hymeniacidon* i *Stylotella* proizvode aksinohidantoin **97** koji inhibira protein-kinazu C. Namidinen A **98**, dehidro derivat hidantoina, izoliran je iz morske spužve roda *Leucetta* sp. Mukanadin B **99** izoliran je iz morske spužve vrste *Agelas*. Iz morske bakterije *Streptomyces hygroscopicus* izoliran je spiro nukleozid, hidantocidin **90a**, koji posjeduje herbicidni učinak, kao i inhibitorsko djelovanje na adenil-sukcinat sintetazu.⁶⁸ Midpacamid **100** izoliran je iz morske spužve *Agelas mauritiana*⁶⁹ i pokazuje antihistaminsko djelovanje.⁷⁰ Parazoantini A-J **101** izolirani su iz sredozemne moruzgve *Parazoanthus axinellae*.^{15,16}



Slika 12. Prirodni hidantoini

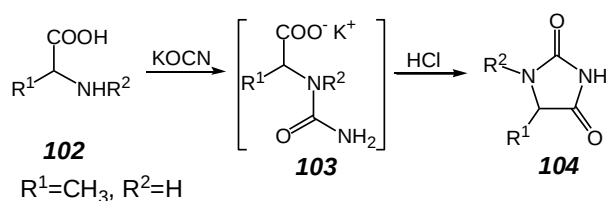
2.2.3. Sinteza hidantoina

Sinteza hidantoina intenzivno se ispituje zbog njihovih farmakoloških svojstava kao što su: antifungalna, antibakterijska, antiupalna, antitumorska, a koriste se i kao lijekovi za liječenje hiperglikemije te kao antidepresivi, antiepileptici i slično.⁷¹ Hidantoini su ključni intermedijeri u sintezi nekih optički čistih prirodnih i neprirodnih aminokiselina.¹¹ Osim u farmakologiji, optički čisti hidantoini koriste se kao kiralna pomoćna sredstva u stereoselektivnoj sintezi⁷² te kao metalni ligandi.⁷³

Hidantoini se mogu pripremiti klasičnim metodama sinteze u otopini⁷⁴⁻⁸⁴ te sintezom na čvrstom nosaču.⁸⁵⁻⁹³ Osim toga, mogu se pripremiti uz pomoć mikrovalnog zračenja u otopini i na čvrstom nosaču.⁹⁴⁻⁹⁶ Isto tako, novije metode opisuju mehanokemijsku sintezu hidantoina u suhim uvjetima ili tekućinom potpomognutim mljevenjem.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Sintezom u otopini hidantoini se mogu pripremiti iz različitih polaznih spojeva, kao na primjer aminokiselina i njihovih derivata,^{61,75,97-99,101-103} hidantoinskih kiselina,⁸⁰ aldehida i ketona,^{78,79} aminonitrila⁷⁷ i drugih spojeva.¹⁰⁴ Mehanokemijskom sintezom mogu se pripremiti iz derivata aminokiselina, dipeptida

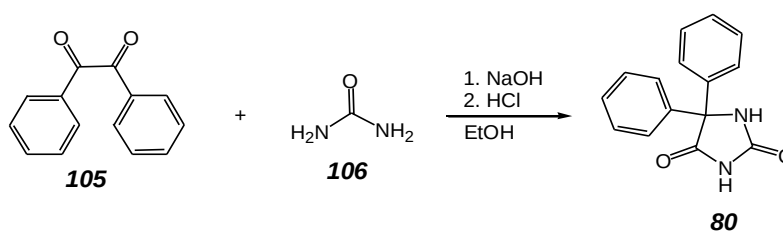
i nepeptidnih spojeva,⁹⁷⁻¹⁰⁰ a mikrovalnom sintezom iz *N*-zaštićenih aminokiselina vezanih na čvrsti nosač.^{85,86,95}

Urich je 1873. godine pripremio 5-metilhidantoin **104**, Shema 23.^{74,75} U samom radu Urech spoj **104** pripravlja reakcijom alanina **102** s kalijevim cijanatom u vodenoj otopini pri čemu nastaje kalijev α -ureido-propionat **103**, koji u kiselim uvjetima ciklizira i nastaje željeni hidantoin **104**. Urechovom reakcijom mogu se pripremiti različiti C-5 supstituirani hidantoini iz različitih α -aminokiselina ($R^2=H$) te *N*-1 supstituirani hidantoini iz *N*-supstituiranih aminokiselina ($R^2=alkil$).



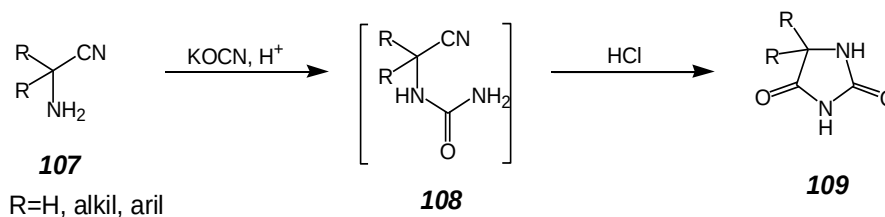
Shema 23. Urechova sinteza hidantoina **104** iz aminokiselina

Biltz je 1908. godine pripremio poznati nesteroidni antiepileptik fenitoin, tj. 5,5-difenilhidantoin **80**, Shema 24.^{74,76} Pripremio ga je reakcijom benzila **105** i uree **106** u prisustvu baze, 30 %-tne vodene otopine natrijeva hidroksida, uz etanol kao otapalo. Ovom se reakcijom mogu pripremiti različiti *N*-3 supstituirani te *N*-1, *N*-3 disupstituirani hidantoini iz *N*-supstituiranih urea ili tiourea.

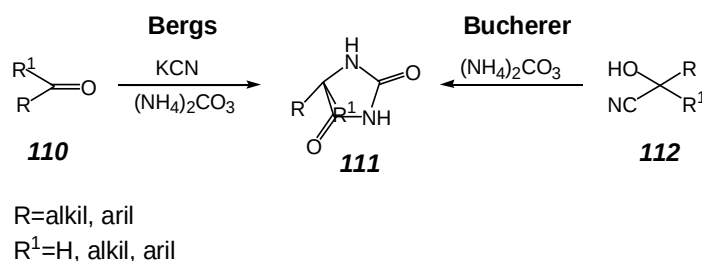


Shema 24. Biltzova sinteza fenitoina **80**

William Thornton Read je 1922. godine prvi put proveo reakciju koja je kasnije po njemu dobila ime – Readova reakcija, Shema 25.⁷⁷ Radi se o reakciji koja nalazi primjenu u sintezi 5,5-disupstituiranih hidantoina. Read pripravlja hidantoin **109** reakcijom α -aminonitrila **107** s kalijevim cijanatom u ledenoj octenoj kiselini, pri čemu nastaje odgovarajući α -ureido nitril **108**. On zagrijavanjem s kloridnom kiselinom ciklizira i nastaje odgovarajući hidantoin **109**.

Shema 25. Readova sinteza hidantoina **109**

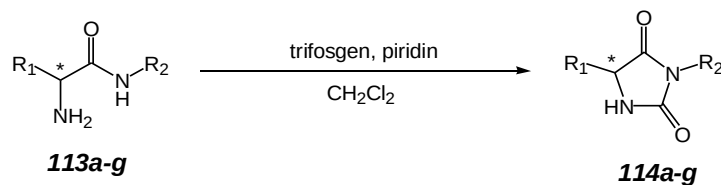
Godine 1929. objavljena je metoda Bergsa za dobivanje 5- i 5,5-supstituiranih hidantoina **111** iz aldehida ili ketona **110** s kalijevim cijanidom, amonijevim karbonatom i CO₂ pod visokim tlakom pri 80 °C, Shema 26.⁷⁸ Njemački znanstvenik Bucherer je 1934. godine modificirano Bergsovu metodu pripreme hidantoina. U modificiranom postupku, hidantoini se dobivaju iz cijanohidrina **112** i amonijevog karbonata u vodenoj otopini ili benzenu na 60–70 °C.⁷⁹ Kasnije su ove reakcije po njima dobile i ime Bucherer-Bergsova reakcija koja se primjenjuje i danas za pripravu 5- i 5,5-supstituiranih hidantoina iz karbonilnih spojeva (aldehida ili ketona) ili cijanohidrina s kalijevim cijanidom i amonijevim karbonatom.¹⁰⁵

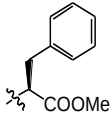
Shema 26. Bucherer-Bergsova sinteza hidantoina **111**

2.2.3.1. Priprava 3,5-disupstituiranih hidantoina

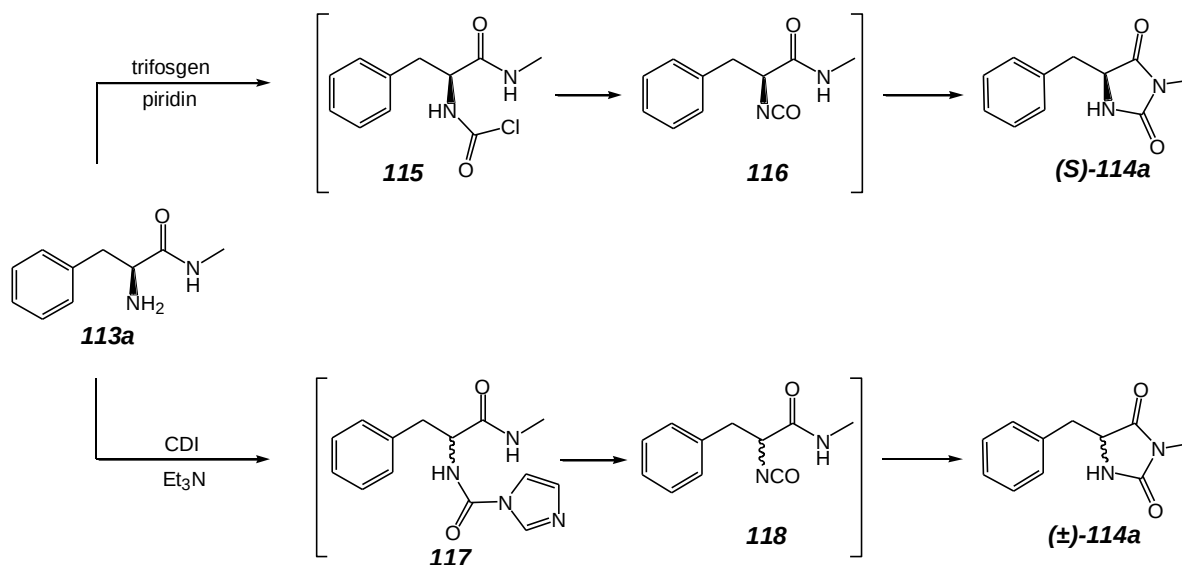
Ovdje će biti prikazane sintetske metode pripreme 3,5-disupstituiranih hidantoina iz aminokiselina i njihovih derivata te dipeptida. 3,5-Disupstituirani hidantoini mogu se pripremiti klasičnim metodama sinteze u otopini,⁷⁴⁻⁸⁴ sintezom na čvrstom nosaču,⁸⁵⁻⁹³ mehanokemijskom sintezom⁹⁸⁻¹⁰⁰ te uz pomoć mikrovalnog zračenja.^{85,86,95}

Zhang i suradnici pripremili su optički čiste hidantoina **114a-g** ciklizacijom amida α-aminokiselina **113a-g** uz upotrebu trifosgena, Tablica 2.¹⁰¹ Svi produkti dobiveni su u dobrom iskorištenju i uz visoku enantioselektivnost (**113a-f**, e.v.>96 %), a u slučaju spoja **114g** i uz visoku diastereoselektivnost (d.v.>96 %).

Tablica 2. Sintaza 3,5-disupstituiranih hidantoina **114a-g** iz amida α -aminokiselina

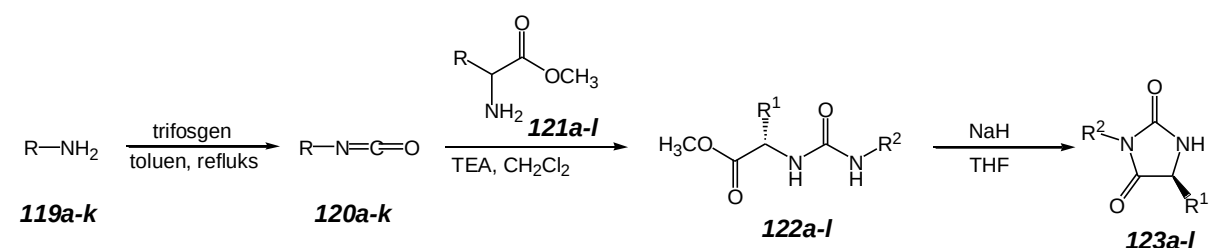
Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)	e.v. (%)
1	PhCH ₂	CH ₂ CH ₃	(S)- 114a	73	>96
2	PhCH ₂	(CH ₂) ₃ CH ₃	(S)- 114b	70	>96
3	PhCH ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	(S)- 114c	58	>96
4	PhCH ₂	(CH ₂) ₂ - <i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₅	(R)- 114d	41	>96
5	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	(S)- 114e	55	>96
6	TBSOCH ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	(R)- 114f	73	>96
7	PhCH ₂		(S,S)- 114g	80	d.v.=96%

Ista grupa znanstvenika upotrijebila je *N,N'*-karbonildiimidazol (CDI) za dobivanje hidantoina **114a** iz spoja **113a** (R¹=PhCH₂, R²=CH₂CH₃). Međutim, u ovom slučaju dobivena je racemična smjesa spoja **115a**, a razlog tome je nastanak racemičnog međuprodukta **117**, Shema 27. Reakcijom spoja **113a** s trifosgenom u prisustvu piridina nastaje samo (S)-enantiomer međuprodukta **115**. Iz ovih međuprodukta nastaju izocijanati, (S)-**115** ili (±)-**117**, koji procesom ciklizacije prelaze u odgovarajući hidantoin, (S)-**114a** ili (±)-**114a**.

**Shema 27.** Sintaza 5-benzil-3-metilhidantoina, (S)-**114a** ili (±)-**114a**, uz trifosgen/piridin i *N,N'*-karbonildiimidazol

Primjerice, rad Chena i suradnika iz 2015. godine prikazuje enantioselektivnu sintezu različitih 3,5-disupstituiranih hidantoina **123a-l** iz ureido derivata aminokiselina (uree α -aminokiselina) **122a-l**, koji su u dva sintetska koraka priređeni iz odgovarajućih amina **119a-k**, Tablica 3.¹⁰² U prvom stupnju sinteze priređeni su odgovarajući izocijanati **120a-k** iz amina **119a-k** uz trifozgen. Iz izocijanata **120a-k** i odgovarajućih estera aminokiselina **121a-l** priređeni su ureido derivati aminokiselina **122a-l** koji zatim ciklizacijom u bazičnom mediju daju optički čiste 3,5-disupstituirane hidantoina **123a-l**. Na ovaj način pripravljeni su hidantoini s aromatskim, alifatskim i heterocikličkim supstutuentima u dobrom iskorištenju (54–86 %) i uz visoku enantioselektivnost (e.v.>90 %).

Tablica 3. Sinteza enantiomerno čistih 3,5-disupstituiranih hidantoina **123a-l** iz urea



Unos	R ¹	R ²	Vrijeme (min)	Produkt	η (%)	e.v. (%)
1	PhCH ₂	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	15	123a	68	98
2	PhCH ₂	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄ CH ₂	15	123b	77	97
3	PhCH ₂	(CH ₂) ₃ CH ₃	60	123c	54	98
4	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ Ph	90	123d	86	97
5	PhCH ₂	CH ₂ Ph	30	123e	68	90
6	PhCH ₂	(CH ₂) ₅ CH ₃	30	123f	74	95
7	PhCH ₂	Ph	30	123g	79	94
8	PhCH ₂	2-metilen-furan	60	123h	56	> 99
9	PhCH ₂	(CH ₂) ₄ Ph	90	123i	81	98
10	PhCH ₂	<i>p</i> -F-Ph	5	123j	66	> 99
11	PhCH ₂	2-metilen-tiofen	15	123k	74	97
12	PhCH ₂	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄ CH ₂ -	60	123l	81	98

Tanwar i suradnici opisali su sintetski put za pripravu 3-, 5- i 3,5-supstituiranih hidantoina u kojemu se hidantoini prsten pripravlja reakcijom *N*-supstituiranih karbamata **124a-l** i metilnih estera α -aminokiselinskih hidroklorida **125a-d**, Tablica 4.¹⁰³ U prvom sintetskom koraku priređeni su ureido derivati aminokiselina uz trietilamin kao bazu u refluksirajućem acetonitrilu. Nastali ureido derivati se cikliziraju u prisustvu natrijevog hidroksida pri čemu

nastaju odgovarajući hidantoini **126a-t**. Na ovaj način priređeni su 3,5-disupstituirani hidantoini s različitim alifatskim i aromatskim supstituentima na N-3 i C-5 položaju hidantoiniskog prstena u dobrom iskorištenju (65–77 %).

Tablica 4. Sintaza 3,5-disupstituiranih hidantoina **126a-t** iz *N*-supstituiranih karbamata i estera aminokiselina

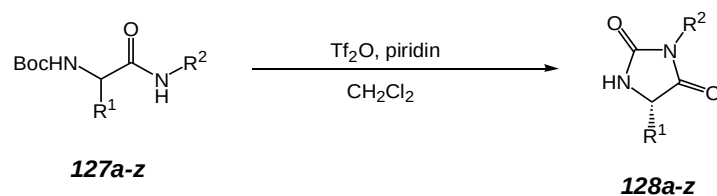


Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)
1	CH ₂ CH ₂ CH ₃	PhCH ₂	126a	75
2	CH ₃	PhCH ₂	126b	76
3	CH ₂ CH ₃	PhCH ₂	126c	74
4	ciklopropil	PhCH ₂	126d	68
5	(CH ₂) ₃ CH ₃	PhCH ₂	126e	73
6	(CH ₂) ₄ CH ₃	PhCH ₂	126f	74
7	(CH ₂) ₅ CH ₃	PhCH ₂	125g	77
8	cikloheksil	PhCH ₂	126h	65
9	(CH ₂) ₇ CH ₃	PhCH ₂	126i	71
10	CH ₂ Ph	PhCH ₂	126j	73
11	CH ₂ CH ₂ Ph	PhCH ₂	126k	74
12	CH ₂ Ph	CH ₃	126l	71
13	CH ₂ CH ₂ Ph	CH ₃	126m	72
14	CH ₂ Ph	<i>i</i> Pr	126n	73
15	CH ₂ CH ₂ Ph	<i>i</i> Pr	126o	70
16	CH ₃	Ph	126p	72
17	CH ₂ CH ₃	Ph	126r	75
18	CH ₂ Ph	Ph	126s	72
19	CH ₂ CH ₂ Ph	Ph	126t	73

Liu i suradnici opisali su sintezu kiralnih 3,5-, 1,3,5- i 3,5,5'-supstituiranih hidantoina, a kao početni materijal upotrijebili su dipeptide, peptide ili nepeptidne supstrate, odnosno *N*-Boc zaštićene amide α-aminokiselina.¹⁰⁶ Reakcijom dipeptida **127a-j** ili *N*-Boc-α-amino amida **127k-z** s anhidridom trifluormetansulfonske kiseline (Tf₂O) u prisustvu piridina kao baze nastaju 3,5-disupstituirani hidantoini **128a-z** u dobrim do odličnim iskorištenjima (58-90 %),

Tablica 5. Prednosti opisane metode su jednostavnost izvođenja, blagi reakcijski uvjeti te dobra do odlična iskorištenja.

Tablica 5. Sintaza 3,5-disupstituiranih hidantoina **128a-z** iz dipeptida (unos 1-10) i nepeptidnih supstrata (unos 11-22)

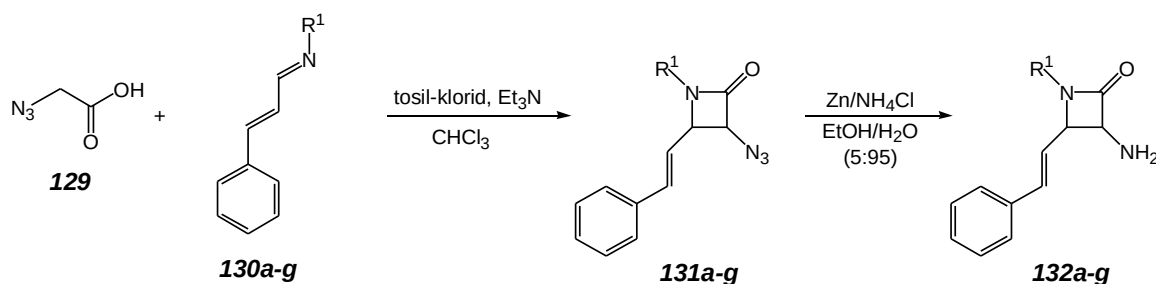


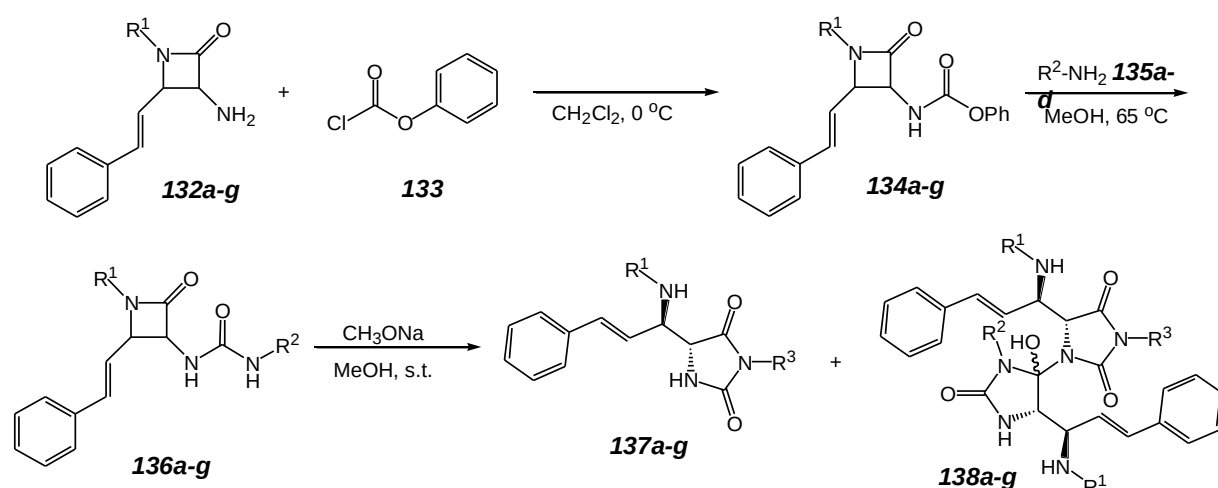
Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)
1	CH ₃	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(S,S)- 128a	86
2	CH ₃	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(R,S)- 128b	81
3	PhCH ₂	CH(CH ₃)COO <i>t</i> -Bu	(S,S)- 128c	82
4	Ph	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(S,S)- 128d	80
5	PhCH ₂	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(S,S)- 128e	93
6	BnOCH ₂	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(S,S)- 128f	82
7	<i>t</i> BuOCH ₂	CH(<i>i</i> Pr)COOMe	(S,S)- 128g	83
8	PhCH ₂	CH(CH ₂ OTBS)CO	(S,S)- 128h	87
9	<i>i</i> Pr	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(S,S)- 128i	90
10	CbzNH(CH ₂) ₄	CH(CH ₂ Ph)COOMe	(S,S)- 128j	58
11	PhCH ₂	(CH ₂) ₃ CH ₃	(S)- 128k	83
12	PhCH ₂	ciklopentil	(S)- 128l	69
13	PhCH ₂	CH(CH ₃)Ph	(S,S)- 128m	86
14	Ph	CH ₃ CH ₂	(S)- 128n	60
15	CH ₃	Ph	(S)- 128o	72
16	CH ₃	<i>p</i> -OPh-Ph	(S)- 128p	88
17	CH ₃	<i>p</i> -Cl-Ph	(S)- 128r	81
18	CH ₃	3-Cl-4-F-Ph	(S)- 128s	71
19	PhCH ₂	Ph	(S)- 128t	78
20	PhCH ₂	CH=CH- <i>p</i> -OMe-Ph	(S)- 128u	81
21	CbzNH(CH ₂) ₃	CH=CH- <i>p</i> -OMe-Ph	(S)- 128v	63
22	PhCH ₂	CH ₃ (CH ₂) ₃	(S)- 128z	83

S druge strane, Mehra i Kumar pripravili su 3,5-disupstituirane hidantoina **136a-g** intramolekulskom transformacijom racemične *cis*-3-amino-β-laktamske uree **136a-g**, Tablica 6. Reakcija transformacije odvija se u metanolu ili tetrahidrofuranu u prisustvu baze.¹⁰⁷ Autori su Staudingerovom reakcijom azidoketena dobivenog iz azidoctene kiseline **129** i različito

supstituiranih 1-azadiena **130** u prisustvu tosil-klorida i trietilamina kao baze pripravili racemičnu smjesu *cis*-3-azido- β -laktama **131a-g**. Azidna skupina β -laktama **131a-g** reducirana je u amino skupinu pomoću Zn/NH₄Cl u smjesi otapala etanol/voda (5:95). Nastali 3-amino- β -laktami **132a-g** prevedeni su u karbamate **134a-g** pomoću fenil-kloroformata **133**. Dalje, adicijom različitih alkilnih i aromatskih amina **135a-d** na karbamate **134a-g** nastaju *cis*-3-amino- β -laktamske uree **136a-g**. Konačne 3,5-disupstituirane hidantoina **137a-g** pripravili su iz racemične smjese *cis*-**136a-g** intramolekulskom transformacijom u prisustvu natrijevog metoksida u metanolu na sobnoj temperaturi. U reakciji osim hidantoina **137a-g** nastaje i njegov dimer **138a-g**. Dušikov atom na N-1 položaju hidantoininskog prstena **137a-g** nukleofilno napada elektrofilni ugljikov atom na C-4 položaju drugog hidantoina, što rezultira nastankom dimera **138a-g**. Kolonskom kromatografijom uspješno su izolirani monomer **137a-g** i dimer **138a-g** u obliku diastereomera. Nadalje, reakcija transformacije provedena je u metanolu u prisustvu natrijevog metoksida na temperaturi od 65 °C u trajanju od 1–1,3 sata, ovisno o supstituentu. Zagrijavanjem reakcijske smjese skraćuje se vrijeme reakcije i povećava se iskorištenje reakcije, Tablica 6. Ista grupa znanstvenika provela je i reakcije u kojima su kao bazu koristili kalijev *tert*-butoksid (tBuOK) i 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU), te su svi spojevi izolirani kao smjesa monomera i dimera. Baze kalijev *tert*-butoksid i 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en dale su lošija iskorištenja u odnosu na natrijev metoksid u refluksirajućem metanolu. Uočeno je da je u opisanim uvjetima za reakcije potrebno koristiti alkilne amine budući da reakcije s arilnim aminom, anilinom **135g**, u prisustvu različitih baza nisu davale željene hidantoinne produkte (unos 26–29, Tablica 6), a razlog tome je slabija nukleofilnost arilnih amina u odnosu na alkilne amine.

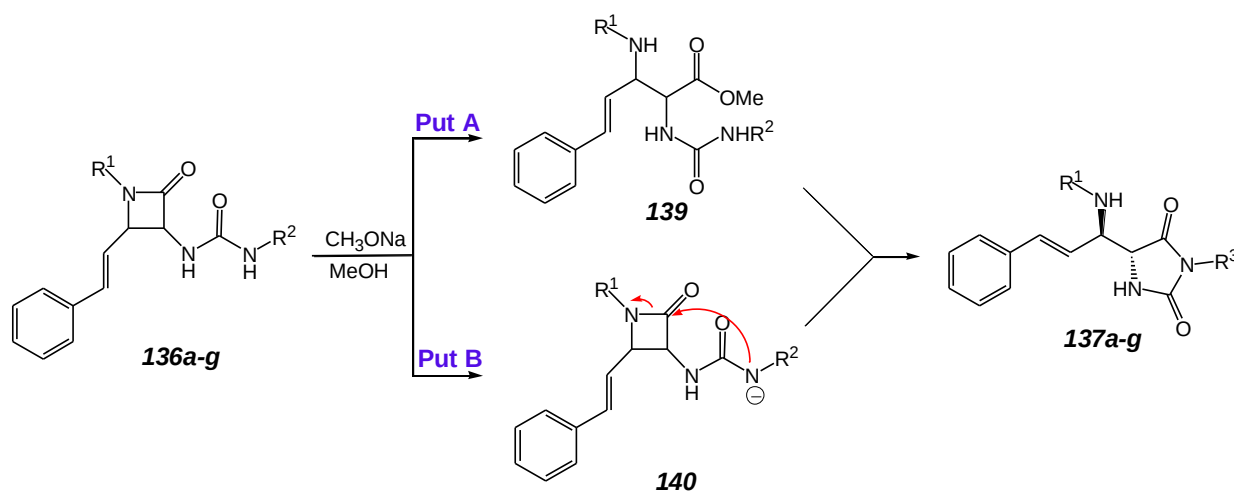
Tablica 6. Sintaza 3,5-disupstituiranih hidantoina **138a-g** iz β -laktamskih urea





Unos	R^1	R^2	Baza	t ($^\circ\text{C}$)	Vrijeme (h)	η (%)	
						137	138
1	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₄ H ₉	NaOMe	65	1	59	32
2	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₄ H ₉	NaOMe	s.t.	8,4	45	22
3	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₄ H ₉	DBU	refluks	1,3	51	30
4	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₄ H ₉	<i>t</i> BuOK	s.t.	1,5	56	30
5	Ph	C ₄ H ₉	NaOMe	65	1,2	56	34
6	Ph	C ₄ H ₉	NaOMe	s.t.	8,3	42	26
7	Ph	C ₄ H ₉	DBU	refluks	1,5	48	28
8	Ph	C ₄ H ₉	<i>t</i> BuOK	s.t.	1,6	49	32
9	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₆ H ₁₁	NaOMe	65	1,1	61	35
10	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₆ H ₁₁	NaOMe	s.t.	8,6	44	24
11	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₆ H ₁₁	DBU	refluks	1,4	50	29
12	<i>p</i> -CH ₃ Ph	C ₆ H ₁₁	<i>t</i> BuOK	s.t.	1,8	54	34
13	Ph	C ₆ H ₁₁	NaOMe	65	1,3	57	31
14	Ph	C ₆ H ₁₁	NaOMe	s.t.	9,0	40	21
15	Ph	C ₆ H ₁₁	DBU	refluks	1,6	49	33
16	Ph	C ₆ H ₁₁	<i>t</i> BuOK	s.t.	1,7	52	31
17	<i>p</i> -CH ₃ Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	NaOMe	65	1,1	62	34
18	<i>p</i> -CH ₃ Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	NaOMe	s.t.	8,3	45	26
19	<i>p</i> -CH ₃ Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	DBU	refluks	1,3	55	32
20	<i>p</i> -CH ₃ Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	<i>t</i> BuOK	s.t.	1,5	56	33
22	Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	NaOMe	65	1,2	58	32
23	Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	NaOMe	s.t.	8,5	41	23
24	Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	DBU	refluks	1,4	44	29
25	Ph	<i>i</i> -C ₄ H ₉	<i>t</i> BuOK	s.t.	1,6	54	31
26	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	Ph	NaOMe	65	-	-	-
27	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	Ph	NaOMe	s.t.	-	-	-
28	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	Ph	DBU	refluks	-	-	-
29	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	Ph	<i>t</i> BuOK	s.t.	-	-	-

Autori su predložili dva moguća mehanizma (put A i B) reakcije *cis*-3-amino- β -laktamske uree **136a-g** s natrijevim metoksidom, Shema 28.^{107,108} Put A uključuje tandemsku reakciju u kojoj se međuprodukt **139**, koji nastaje intramolekulskom amidolizom iz *cis*-3-amino- β -laktamske uree ne izolira iz reakcijske smjese, već intramolekulskom ciklizacijom odmah prelazi u hidantoin **137a-g**. Put B započinje deprotoniranjem amino skupine bočnog lanca pri čemu nastaje međuprodukt **140**. Nastali ureido anion **140** nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom β -laktamskog prstena što dovodi do cijepanja N1-C2 veze (intramolekulska amidoliza) i intramolekulske ciklizacije što rezultira stvaranjem hidantoiniskog prstena.

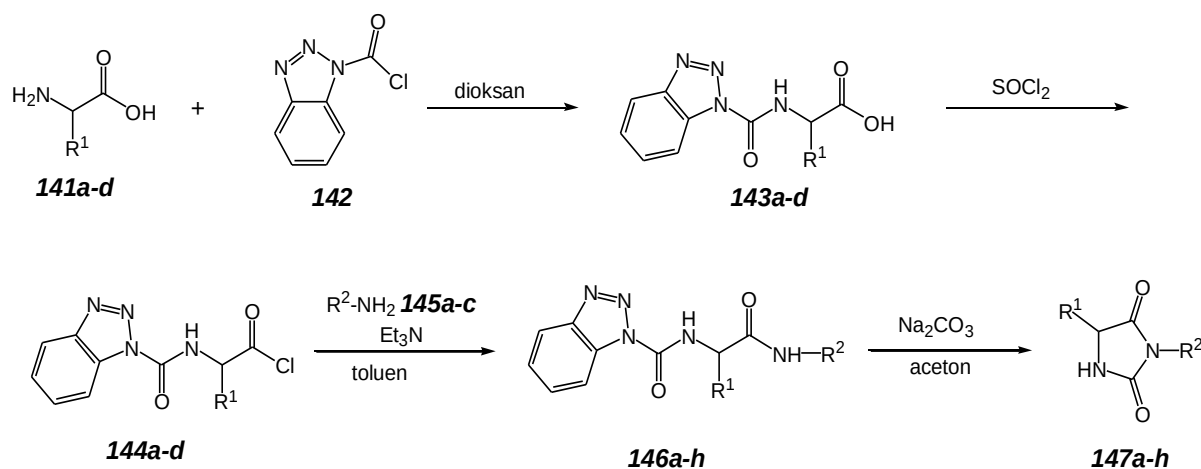


Shema 28. Mehanizam dobivanja hidantoina **137a-g**

Rajić i suradnici su 2006. godine opisali pripremu enantiomerno čistih 3,5-disupstituiranih hidantoina **147a-h** s lipofilnim susptituentima na C-5, N-3 ili na oba atoma intramolekulskom ciklizacijom amida *N*-(1-benzotriazolkarbonil)aminokiseline **146a-h** s ciljem ispitivanja njihove antivirusne i citotoksične aktivnosti, Tablica 7.⁶¹ Prvi korak u sintezi bio je zaštita amino-skupine aminokiseline, D-fenilglicina, L-fenilalanina, L-leucina i L-valina **141a-d**. Kao zaštitna skupina korištena je *N*-1-benzotriazolkarbonilna skupina **142**. Klorid 1-benzotriazolkarboksilne kiseline **142** reagira s amino skupinom aminokiseline **141a-d** u dioksanu pri čemu nastaju *N*-Btc-aminokiseline **143a-d**. Nastala *N*-zaštićena aminokiselina **143a-d** je pomoću tionil-klorida prevedena u odgovarajuće kiselinske kloride **144a-d**, koji zatim u reakciji s aminima **145a-c** u blago bazičnim uvjetima daju *N*-zaštićene amide aminokiseline **146a-h**. Nastali amidi *N*-Btc-aminokiseline u acetonu uz natrijev karbonat kao bazu lako cikliziraju u 3,5-disupstituirane hidantoina **147a-h** uz odvajanje benzotriazola. Ispitano je *in vitro* citotoksično djelovanje na sljedeće maligne stanične linije: leukemija porijeklom iz miša (L1210), zloćudno preobraženi T-limfociti podrijetlom iz čovjeka

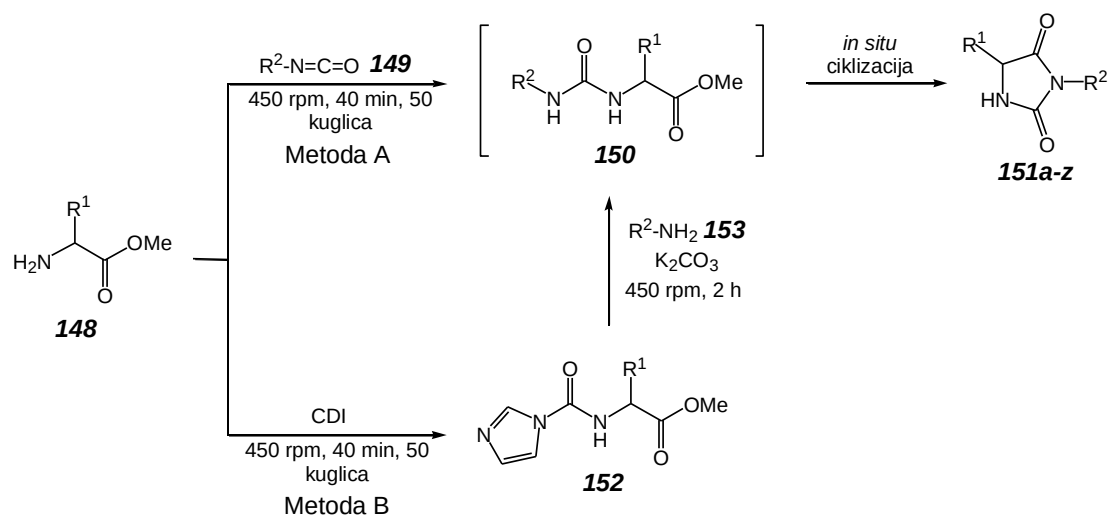
(Molt4/C8 i CEM), karcinom grlića maternice (HeLa), karcinom dojke (MCF-7), karcinom gušterače (MiaPaCa-2), karcinom pluća (H 460), karcinom debelog crijeva (SW620) i na staničnu liniju normalnih fibroblasta porijeklom iz čovjeka (WI 38). Stanična linija MCF-7 pokazala se najosjetljivijom na djelovanje hidantoina **147a-h**. Spoj **147g** pokazao je izraženu inhibitornu aktivnost na stanične linije HeLa i MCF-7, ali i citotoksično djelovanje na fibroblaste WI 38. S druge strane, spoj **147h** pokazao je umjerenu inhibitornu aktivnost na stanične linije HeLa, MCF-7, MiaPaCa-2, H 460 i SW 620, dok na stanične linije fibroblasta WI 38 ne pokazuje inhibitorni učinak. Nadalje, antivirusno djelovanje 3,5-disupstituiranih hidantoina **147a-h** ispitano je na virusima: herpes simpleks tip 1 (HSV-1 (KOS)), herpes simpleks virus tip 1 bez aktivnosti timidin kinaze (HSV-1 TK KOS ACVr), herpes simpleks tip 2 (HSV-2 (G)), vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, Cocksackie virus B4, respiracijski sincicijski virus, parainfluenza-3 virus, reovirus-1, Sindbis virus i Punta Toro virus. Spojevi **147f** i **147h** pokazali su antivirusno djelovanje na Cocksackie virus B4, parainfluenza-3 virus, reovirus-1 i Sindbis virus, dok je spoj **146a** pokazao inhibitorno djelovanje na vaccinia virus.

Tablica 7. Sintaza 3,5-disupstituiranih hidantoina **147a-h** iz aminokiselina



Unos	R ¹	R ²	produkt	η (%)
1	<i>i</i> -Pr	CHPh ₂	147a	86
2	<i>i</i> -Bu	CHPh ₂	147b	88
3	PhCH ₂	ciklopentil	147c	73
4	PhCH ₂	cikloheksil	147d	85
5	PhCH ₂	cikloheksanmetil	147e	80
6	PhCH ₂	CHPh ₂	147f	29
7	Ph	cikloheksil	147g	37
8	Ph	CHPh ₂	147h	24

Godine 2014. objavljena je mehanokemijska metoda Konnert i suradnika za dobivanje 5- i 5,5-supstituiranih hidantoina iz estera aminokiselinskih hidroklorida i kalijevog cijanida.⁹⁷ Dvije godine kasnije⁹⁸ mehanokemijskom sintezom pripravili su seriju 3,5-disupstituiranih hidantoina iz komercijalno dostupnih metilnih estera aminokiselina **148** uz uporebu *N,N'*-karbonildiimidazola ili alkilnih/arilnih izocijanata **149**, Tablica 8. Za pripravu hidantoina korištene su dvije metode, označene s A i B. Metoda A, reakcijom estera α -aminokiselina **148** i odgovarajućih alkilnih izocijanata **149** uz kalijev karbonat nastaju ureido derivati **150** koji *in situ* cikliziraju i nastaju hidantoini **151a-z**. Metoda B, uključuje reakciju estera α -aminokiselina **148** i *N,N'*-karbonildiimidazola pri čemu nastaju odgovarajući *N*-karbonilimidazolni esteri aminokiselina **152**. Nakon toga slijedi, reakcija s različitim aminima **153** uz kalijev karbonat kao bazu, pri čemu nastaju odgovarajući ureido derivati **150**. Konačni hidantoini produkti **151a-z** dobivaju se iz ureido derivata *in situ* ciklizacijom. Hidantoini **151a-r** dobiveni su u dobrim do odličnim iskorištenjima (25–84 %). Za sintezu hidantoina **151a-z** korišteni su planetarni kuglični mlin (engl. *Planetary Ball Mill*, PBM; metoda A – spoj **151j**, metoda B – **151a-r**, **151z**) i vibracijski kuglični mlin (engl. *Vibrational Ball Mill*, VBM; Metoda A - **151a-c**, **151e-j**, **151p**, **151r**, **151t**). Obje metode pogodne su za dobivanje 3,5-dialkilhidantoina, ali nisu pogodne za dobivanje 3-aril-5-alkilhidantoina, kao na primjer etotoina (3-etil-5-fenilhidantoin) **151j** i 3-alil-5,5-difenilhidantoina **151o**. Konner i suradnici su po prvi put opisali sintezu etotoina **151j** iz fenilglicina ili 5-fenilhidantoina uz pomoć mljevenja potpomognutog tekućinom (engl. *Liquid-Assisted Grinding*, LAG), odnosno uz upotrebu polietilenglikola, MeO-PEG2000-OMe te HO-PEG-OH različitih molekulskih masa (400, 2000 i 3400). U slučaju LAG-metode etotoin je dobiven u iskorištenju 45–65 %.

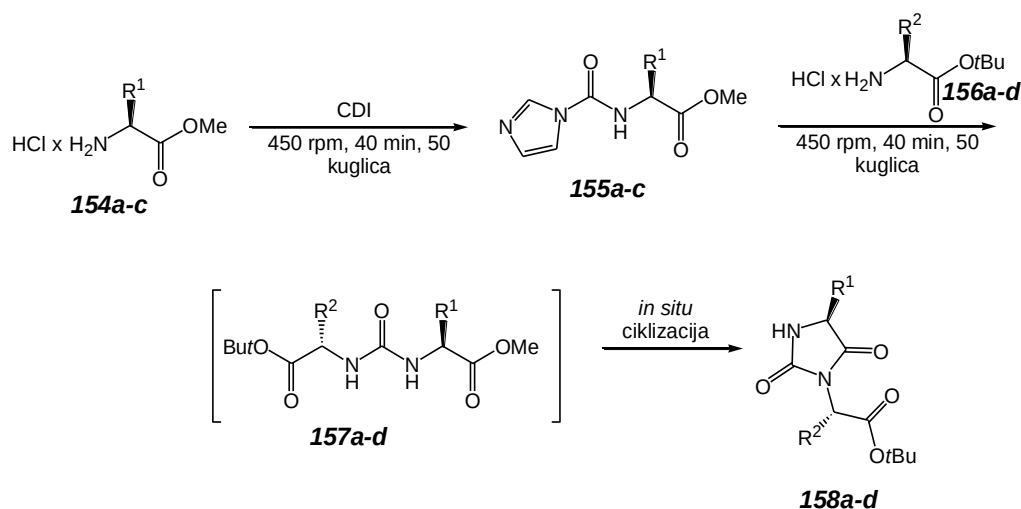
Tablica 8. Mehanokemijska sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina **151a-z** uz izocijanat ili *N,N'*-karbonildiimidazol

Unos	R^1	R^2	Produkt	η (%)	
				Metoda A	Metoda B
1	PhCH ₂	CH ₂ CH ₃	151a	75	84
2	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ CH ₃	151b	83	61
3	<i>p</i> -tBuO-PhCH ₂	CH ₂ CH ₃	151c	82	56
4	CbzNH(CH ₂) ₄	CH ₂ CH ₃	151d	n.p.	31
5	CH ₃ SCH ₂ CH ₂	CH ₂ CH ₃	151e	78	40
6	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)	CH ₂ CH ₃	151f	84	67
7	<i>p</i> -tBuOCH ₂	CH ₂ CH ₃	151g	98	51
8	PhCH ₂ SCH ₂	CH ₂ CH ₃	151h	61	38
9	CH ₃ /CH ₃	CH ₂ CH ₃	151i	79	61
10	Ph	CH ₂ CH ₃	151j	35	34
11	PhCH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	151k	n.p.	75
12	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	151l	n.p.	57
13	<i>t</i> BuOCH(CH ₃)	CH ₂ CH=CH ₂	151m	n.p.	51
14	CH ₃ /CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	151n	n.p.	46
15	Ph/Ph	CH ₂ CH=CH ₂	151o	n.p.	25
16	PhCH ₂	CH ₂ Ph	151p	85	70
17	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ Ph	151r	67	38
18	PhCH ₂	Ph	151s	n.p.	n.p.
19	<i>p</i> -tBuOCH ₂	Ph	151t	30	n.p.
20	PhCH ₂	CH(CH ₃) ₂	151u	0	n.p.
21	<i>p</i> -tBuO-PhCH ₂	CH(CH ₃) ₂	151v	n.p.	n.p.
22	<i>p</i> -tBuO-PhCH ₂	cikloheksil	151z	n.p.	n.p.

n.p. – nije provedena reakcija

Konnert i suradnici su 2016. godine objavili mehanokemijsku sintezu 3,5-disupstituiranih hidantoina **158a-d** na dva načina; iz nesimetričnih urea **157a-d**, Tablica 9, i dipeptida **159a-f**, Tablica 10).⁹⁹ Reakcijom estera aminokiseline **154a-c** s *N,N'*-karbonildiimidazolom, nastaju odgovarajući 1*H*-imidazol-karboksi međuprodukti **155a-c**, Tablica 9. Spojevi **155a-g** zatim reagiraju s *tert*-butilnim esterom α - ili β -aminokiseline **156a-d** uz kalijev karbonat kao bazu, pri čemu nastaju nesimetrične uree **157a-d**, koje u bazičnim uvjetima *in situ* cikliziraju i nastaju 3,5-disupstituirani hidantoini **158a-d**. Za sintezu hidantoina **158a-d** korišten je planetarni kuglični mlin. Produkti **158a-c** su dobiveni u dobrom iskorištenju od 43 do 63 %, dok spoj **158d** nije uopće nastao. Međutim, primjenom istih reakcijskih uvjeta u vibracijskom kugličnom mlinu, spoj **158d** izoliran je u iskorištenju od 58 %.

Tablica 9. Mehanokemijska sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina **158a-d** iz nesimetričnih urea



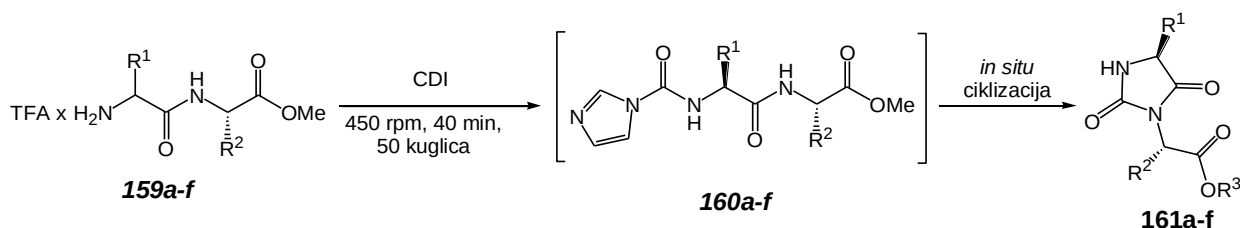
Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)
1	PhCH ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	(<i>S,S</i>)- 158a	63
2	(CH ₃) ₂ CH	CH ₃	(<i>S,S</i>)- 158b	43
3	(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₂ SCH ₃	(<i>S</i>)- 158c	60
4	PhCH ₂	CH ₂ Ph	(<i>S,S</i>)- 158d	- (58)*

*VBM

Reakcijom dipeptida **159a-f** i *N,N'*-karbonildiimidazola u jednom koraku nastaju 3,5-disupstituirani hidantoini **161a-f**, Tablica 10. Nukleofilnim napadom amino skupine dipeptida **159a-f** na karbonilnu skupinu *N,N'*-karbonildiimidazola nastaju međuprodukti **160a-f**. Konačno, intramolekulskim nukleofilnim napadom peptidne NH skupine na karbonilnu

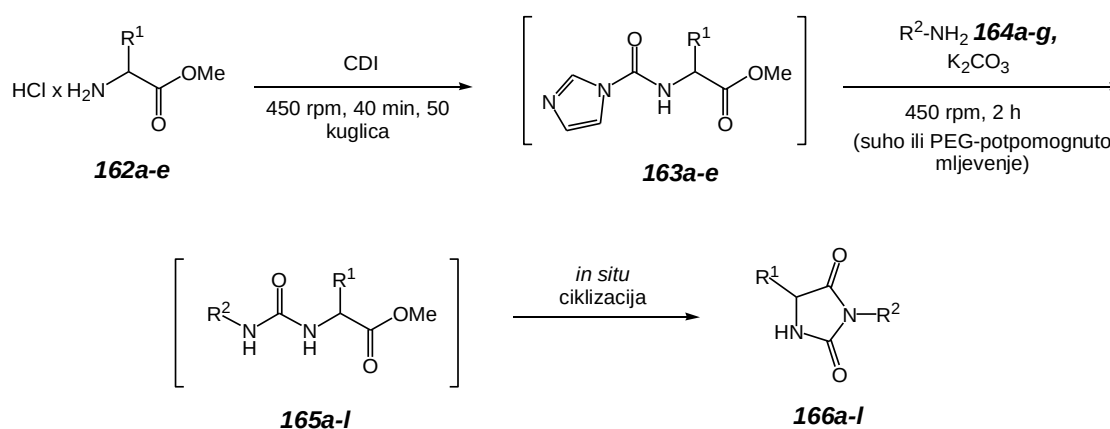
skupinu nastalog C-aktiviranog imidazolil karboksiamida dolazi do zatvaranja hidantoinskog prstena. Reakcijom dipeptida **159a-f** i *N,N'*-karbonildiimidazola dobiveni su 3,5-disupstituirani hidantoini **161a-f** u dobrim do odličnim iskorištenjima (29–82%).

Tablica 10. Mehanokemijska sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina **161a-f** iz dipeptida



Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)
1	PhCH ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	(S,S)- 161a	82
2	PhCH ₂	CH(CH ₃) ₂	(R,S)- 161b	70
3	PhCH ₂	CH ₃	(S,S)- 161c	57
4	BzlOOCCH ₂	CH ₂ CH ₂ SCH ₃	(S,S)- 161d	76
5	(CH ₃) ₂ CH	CH ₃	(S,S)- 161e	78
6	PhCH ₂	CH ₃	(S,S)- 161f	29

Grupa znanstvenika predvođena Colacinom provela je mehanokemijsku sintezu 3,5-disupstituiranih hidantoina **166a-l** u suhim uvjetima i tekućinom potpomognutim mljevenjem uz polietilenglikol, odnosno uz MeO-PEG-2000-OMe ili HO-PEG-3400-OH, Tablica 11.¹⁰⁰ U prvom koraku, reakcijom metilnih estera α -aminokiselina **162a-e** s *N,N'*-karbonildiimidazolom u planetarnom kugličnom mlinu nastaje međuprodukt **163a-e**, koji u drugom koraku s odgovarajućim aminima **164a-g** bez ili uz dodatak male količine polietilenglikola daju uree **165a-l**. One *in situ* cikliziraju i nastaju 3,5-disupstituirani hidantoini **166a-l**. Uočava se da je primjena LAG-metode pokazala veće iskorištenje reakcije nastajanja hidantoina **166a-c**, **166h** i **166l**, dok spojevi **166e** i **166f** nisu uopće nastali uz dodatak polietilenglikola.

Tablica 11. Suha ili tekućinom potpomognuta mehanokemijska sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina **166a-l**

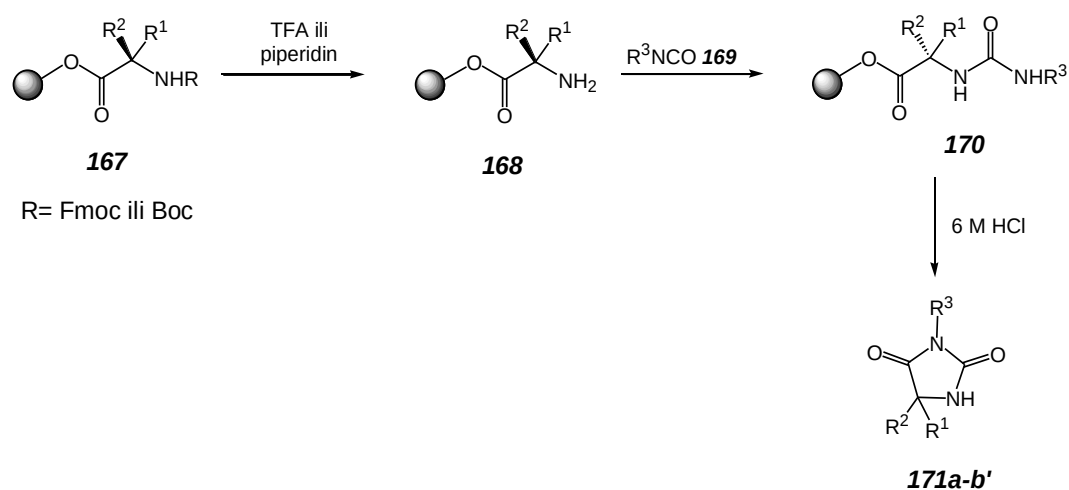
Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)		
				A	B	C
1	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ CH ₃	(S)- 166a	61	70	73
2	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	(S)- 166b	57	69	66
3	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₂ Ph	(S)- 166c	38	n.p.	48
4	PhCH ₂	CH ₂ CH ₃	(S)- 166d	84	70	60
5	PhCH ₂	4'-(4-CH ₃ -1 <i>H</i> -pirazol-1-il)-PhCH ₂	(S)- 166e	30	n.d.	n.d.
6	PhCH ₂	furan-2-il-metil	(S)- 166f	70	n.d.	n.d.
7	<i>t</i> -BuOCH ₂	CH ₂ CH ₃	(S)- 166g	51	70	70
8	Z-NH(CH ₂) ₄	CH ₂ CH ₃	(S)- 166h	31	47	50
9	Z-NH(CH ₂) ₄	4'-(4-CH ₃ -1 <i>H</i> -pirazol-1-il)-PhCH ₂	(S)- 166i	62	n.p.	37
10	Z-NH(CH ₂) ₄	furan-2-il-metil	(S)- 166j	37	n.p.	n.p.
11	Z-NH(CH ₂) ₄	1'-CH ₃ -1 <i>H</i> -pirazol-3'-CH ₃	(S)- 166k	47	n.p.	n.p.
12	(CH ₃) ₂	CH ₂ CH=CH ₂	(S)- 166l	46	62	62

A – suho mljevenje, B – MeO-PEG-2000-OMe, C – HO-PEG-3400-OH, n.p. – nije provedeno, n.d. – nije detekirano.

Sintezu 5-, 3,5- 3,5,5'-supstituiranih hidantoina na čvrstom nosaču prvi put su opisali Hobbs DeWitt i suradnici 1993. godine.^{85,86} Za sintezu su korištene komercijalno dostupne smole, Wang i Merrified, koje su esterskom vezom povezane s *N*-Fmoc- (*N*-9-fluorenilmetiloksikarbonil) ili *N*-Boc- (*tert*-butiloksikarbonil) zaštićenim aminokiselinama. Prvi korak u sintezi hidantoina je *N*-deprotekcija (Fmoc ili Boc zaštitne skupine) aminokiselinskog ostatka na polimernoj smoli, nakon čega slijedi reakcija s odgovarajućim

izocijanatom **169** pri čemu nastaju uree **170a-b'** vezane na polimerni nosač. One zagrijavanjem s 6 mol dm^{-3} otopinom klorovodične kiseline kroz 2 sata N-cikliziraju i nastaju hidantoini produkti **171a-b'** koji se u ovakvim uvjetima skidaju s nosača. U Tablici 12 prikazana je sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina na čvrstom nosaču. Produkti su dobiveni u 4–81 %-tnom iskorištenju.

Tablica 12. Sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina **171a-b'** na čvrstom nosaču iz Fmoc- ili Boc- zaštićenih aminokiselina

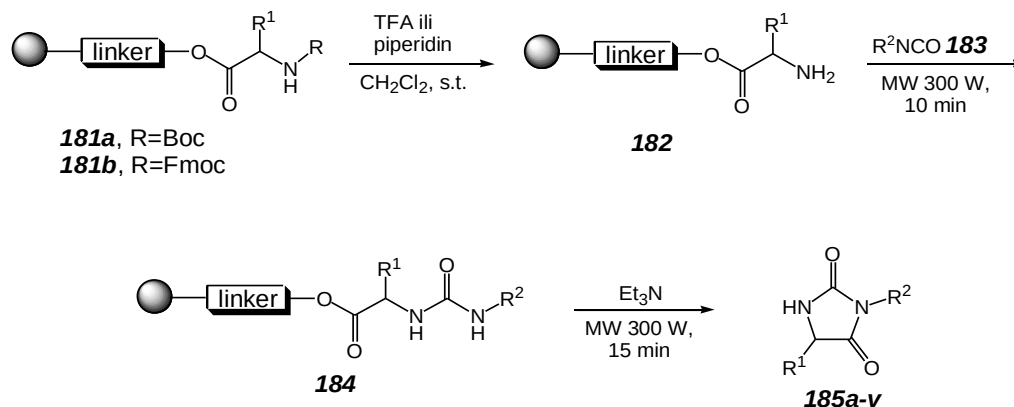


Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)
1	CH ₃	Bu	171a	17
2	PhCH ₂	Bu	171b	47
3	<i>sec</i> -Bu	Bu	171c	48
4	<i>i</i> -Bu	Bu	171d	7
5	<i>i</i> -Pr	Bu	171e	8
6	2-metilindolil	Bu	171f	5
7	CH ₃	alil	171g	4
8	PhCH ₂	alil	171h	29
9	<i>sec</i> -Bu	alil	171i	36
10	<i>i</i> -Bu	alil	171j	54
11	<i>i</i> -Pr	alil	171k	14
12	2-metilindolil	alil	171l	11
13	CH ₃	<i>o</i> -CF ₃ Ph	171m	23
14	PhCH ₂	<i>o</i> -CF ₃ Ph	171n	23
15	<i>sec</i> -Bu	<i>o</i> -CF ₃ Ph	171o	46
16	<i>i</i> -Bu	<i>o</i> -CF ₃ Ph	171p	37
17	<i>i</i> -Pr	<i>o</i> -CF ₃ Ph	171r	33
18	2-metilindolil	<i>o</i> -CF ₃ Ph	171s	15

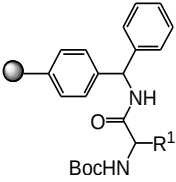
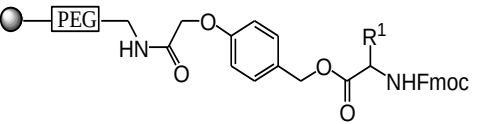
19	CH ₃	<i>p</i> -OCH ₃ Ph	171t	22
Unos	R ¹	R ²	Produkt	η (%)
20	PhCH ₂	<i>p</i> -OCH ₃ Ph	171u	32
21	<i>sec</i> -Bu	<i>p</i> -OCH ₃ Ph	171v	81
22	<i>i</i> -Bu	<i>p</i> -OCH ₃ Ph	171z	21
23	<i>i</i> -Pr	<i>p</i> -OCH ₃ Ph	171a'	24
24	2-metilindolil	<i>p</i> -OCH ₃ Ph	171b'	22

Godine 2007. objavljena je metoda Colacino i suradnika za dobivanje 3,5- i 1,3,5-supstituiranih hidantoina na čvrstom nosaču uz upotrebom mikrovalnog zračenja.⁹⁴ Za sintezu hidantoina koristili su komercijalno dostupne smole **181** koje su esterskom ili amidnom vezom povezane s *N*-zaštićenim aminokiselinama (Boc ili Fmoc, unos 1, 2, 4–6, Tablica 13) ili koje su esterskom vezom povezane s nezaštićenim aminokiselinama (unos 3, Tablica 13). Prvi korak u sintezi je *N*-deprotekcija aminokiselinskog ostatka na polimernoj smoli pri sobnoj temperaturi, osim u slučaju Pro- ili Glu(*Ot*-Bu)-2-ClTrt smola (unos 3, Tablica 13). Deprotekcija Fmoc zaštitne skupine provodi se 20 %-tnom otopinom piperidina u diklormetanu, dok se deprotekcija Boc zaštitne skupine provodi 50 %-tnom otopinom TFA u diklormetanu, a sljedeća su dva koraka provedena uz upotrebu mikrovalnog zračenja. Reakcijom slobodne amino skupine aminokiselina **182** vezanih na smolu s različitim izocijanatima **183** u tetrahidrofuranu nastaju odgovarajuće uree **184**. Konačno, u blago bazičnim uvjetima, uz trietilamin kao bazu, dolazi do ciklizacije i istodobnog skidanja hidantoina s čvrstog nosača. Produkti **185a–t** dobiveni su u dobrim do odličnim iskorištenjima (60–100 %), a produkti **185u** i **185v** u niskim iskorištenjima. Iz Tablice 13 vidljivo je da su za ovu transformaciju prikladnije smole koje su esterskom vezom povezane s aminokiselinom. Autori su iste reakcije proveli i na konvencionalni način te je utvrđeno da provođenje reakcije uz upotrebu mikrovalnog zračenja skraćuje vrijeme reakcije s 22 sata na 25 minuta.

Tablica 13. Sinteza 3,5- i 1,3,5-supstituiranih hidantoina **185a-v** na čvrstom nosaču uz mikrovalno zračenje

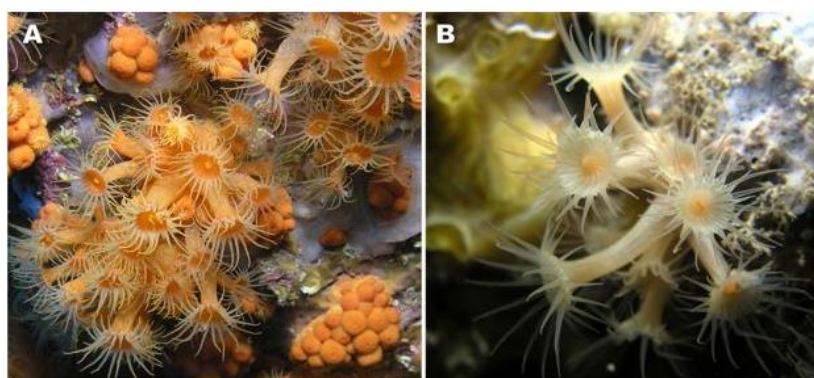


Unos	Smola	ak (R ¹)	R ²	Produkt	η (%)
1		Phe	Ph	185a	95
		Phe	H	185b	90
		Ala	Ph	185c	90
		Val	Ph	185d	75
		Glu(OBz)	Ph	185e	85
		Ile	Ph	185f	80
2		Gly	Ph	185g	70
		Phe	Ph	185h	100
		Phe	H	185i	90
		Ile	Ph	185j	85
		Val	Ph	185k	80
		Leu	Ph	185l	75
		Ala	Ph	185m	75
		Pro	Ph	185n	90
		Glu(Ot-Bu)	Ph	185o	95
		Glu(Ot-Bu)	H	185p	90
3		Pro	Ph	185r	90
		Glu(Ot-Bu)	Ph	185s	75
4		Ala	Ph	185t	60

Unos	Smola	ak (R ¹)	R ²	Produkt	η (%)
5		Ala	Ph	185u	10
6		Glu(Ot-Bu)	Ph	185v	40

2.3. Parazoantini

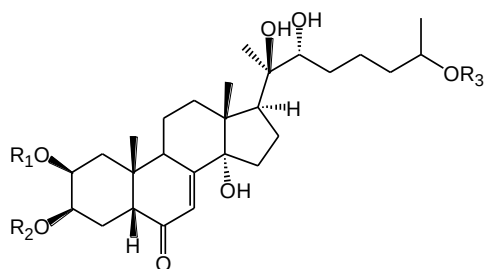
Parazoantini su skupina jedinstvenih prirodnih 3,5-disupstituiranih hidantoina koja je izolirana iz sredozemne moruzgve *Parazoanthus axinellae*, Slika 13.¹⁴⁻¹⁶



Slika13. *Parazoanthus axinellae*, a) morfotip koji raste u gustoj populaciji, izravno na stijeni; b) morfotip koji raste na spužvi *Cymbaxinella damicornis* (preuzeto iz Cachet i sur., 2015.)¹⁵

Parazoanthus axinellae je kolonijalna moruzgva varijabilnog oblika¹⁰⁹ čije su kolonije mekane, zlatnožute do narančaste, rijetko bjelkaste boje, a polipi su gusto raspoređeni i uglavnom se dodiruju, visoki su do 4 cm, s 24-36 ticala poredanih u dva kruga. Obično se nalazi u zasjenjenim i poluzasjenjenim područjima bez sedimentnih čestica, često na zidovima, prevjesima i polušpiljama. Nalazimo je na spužvama, algama i stijenama, uglavnom na dubini od 6 do 100 m, ali je nađena i na dubinama od preko 200 m. Rasprostranjena je u Mediteranu, istočnom dijelu Atlanskog oceana,¹¹⁰ duž jugozapadne i zapadne obale Britanskog otočja.¹¹¹ Iz *Parazoanthus axinellae* ukupno je izolirano 16 metabolita, koji su podjeljeni u tri skupine:

ekdisteroide **186a-d**, zoantoksantin alkaloide **187a-d**, Slika 14,¹⁵ i parazoantine **101a-j**, Slika 15.¹⁶

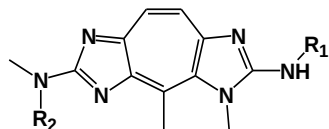


20-Hidroksiekdison (186a), $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$

20-Hidroksiekdison 2-acetat (186b), $R^1=CH_3CO$, $R^2=H$, $R^3=H$

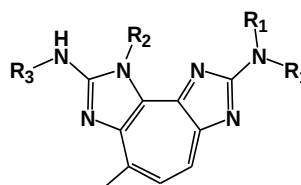
20-Hidroksiekdison 2-acetat (186c), $R^1=H$, $R^2=CH_3CO$, $R^3=H$

Viticosteron E (186d), $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=CH_3CO$



Parazoantoksantin C (187a), $R^1=CH_3$, $R^2=H$

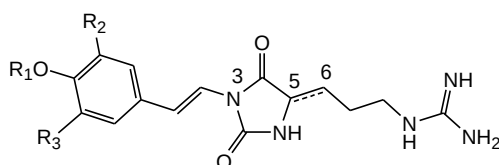
Parazoantoksantin D (187b), $R^1=CH_3CO$, $R^2=CH_3$



Norpseudozoantoksantin (187c), $R^1=H$, $R^2=CH_3$, $R^3=H$

Paragracin (187d), $R^1=CH_3$, $R^2=H$, $R^3=CH_3$

Slika 14. Strukture ekdisteroide **186a-d** i zoantoksantina **187a-d**



Parazoantin A (101a): $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$

Parazoantin B (101b): $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$, $\Delta^{5,6}$

Parazoantin C (101c): $R^1=CH_3$, $R^2=H$, $R^3=H$, $\Delta^{5,6}$

Parazoantin D (101d): $R^1=CH_3$, $R^2=Br$, $R^3=H$

Parazoantin E (101e): $R^1=CH_3$, $R^2=Br$, $R^3=H$, $\Delta^{5,6}$

Parazoantin F (101f): $R^1=CH_3$, $R^2=H$, $R^3=H$

Parazoantin G (101g): $R^1=H$, $R^2=Br$, $R^3=H$

Parazoantin H (101h): $R^1=H$, $R^2=Br$, $R^3=H$, $\Delta^{5,6}$

Parazoantin I (101i): $R^1=CH_3$, $R^2=Br$, $R^3=Br$

Parazoantin J (101j): $R^1=CH_3$, $R^2=Br$, $R^3=Br$, $\Delta^{5,6}$

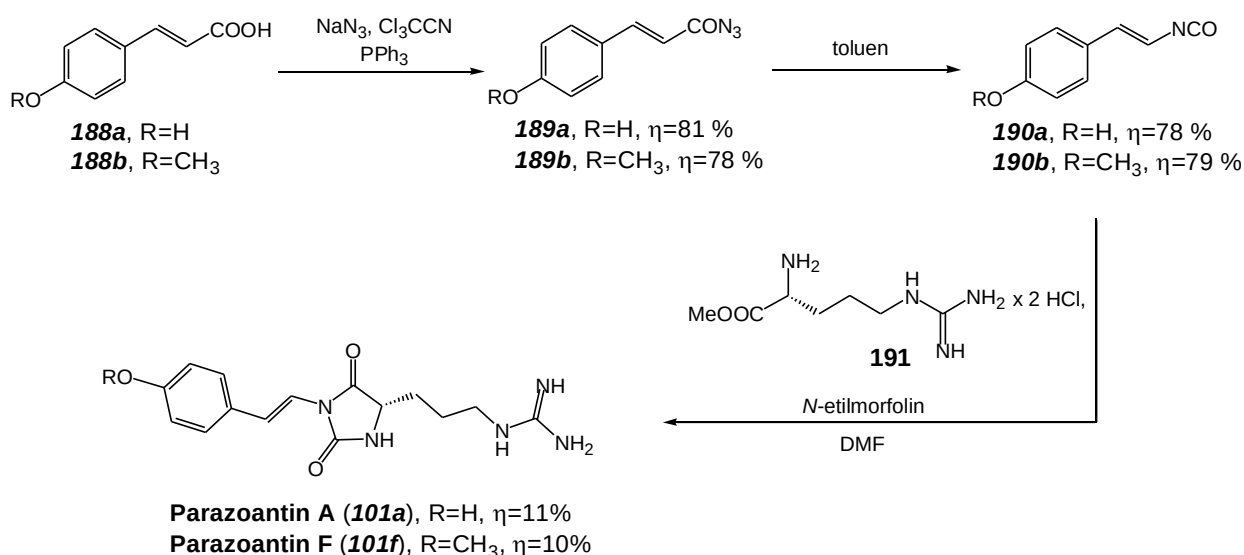
Slika 15. Strukture parazoantina A-J (**101a-j**)

Na N-3 atomu hidantoinskog prstena parazoantina A-J **101a-j** vezan je stilni supstituent izveden iz tirozina,¹¹² a na C-5 atom vezan je lanac koji se sastoji od tročlanog ugljikovog alifatskog ravnog lanca koji završava u gvanidinskoj skupini.^{14,112} Svi prirodni optički aktivni

parazoantini A, D, F, G i I (**101a**, **101d**, **101f**, **101g** i **101i**) su (S)-konfiguracije, a parazoantini B, C, E, H i J (**101b**, **101c**, **101e**, **101h** i **101j**) su akiralni jer imaju egzocikličku dvostruku vezu ($\Delta^{5,6}$) Z-konfiguracije između C-5 i C-6 atoma, Slika 15.^{16,113} Dosad je ispitano antitumorsko i antimalarijsko djelovanje te ekotoksičnost parazoantina A-G.¹⁴ Antitumorska aktivnost ispitana je na tri stanične linije humanih karcinoma (adenokarcinoma debelog crijeva HT-29, karcinoma dojke MDA-MB-231 i pluća A-549) te antimalarijska aktivnost na *Plasmodium falciparum* FcB1. Ekotoksičnost je ispitana na bakteriji *Vibrio fischeri*. Utvrđeno je da ovi spojevi ne pokazuje značajnu aktivnost na gore navedene testirane bakterije i testirane stanične linije. Najveću toksičnost među njima pokazuje parazoantin C ($EC_{50} = 1,64 \mu\text{mol L}^{-1}$).

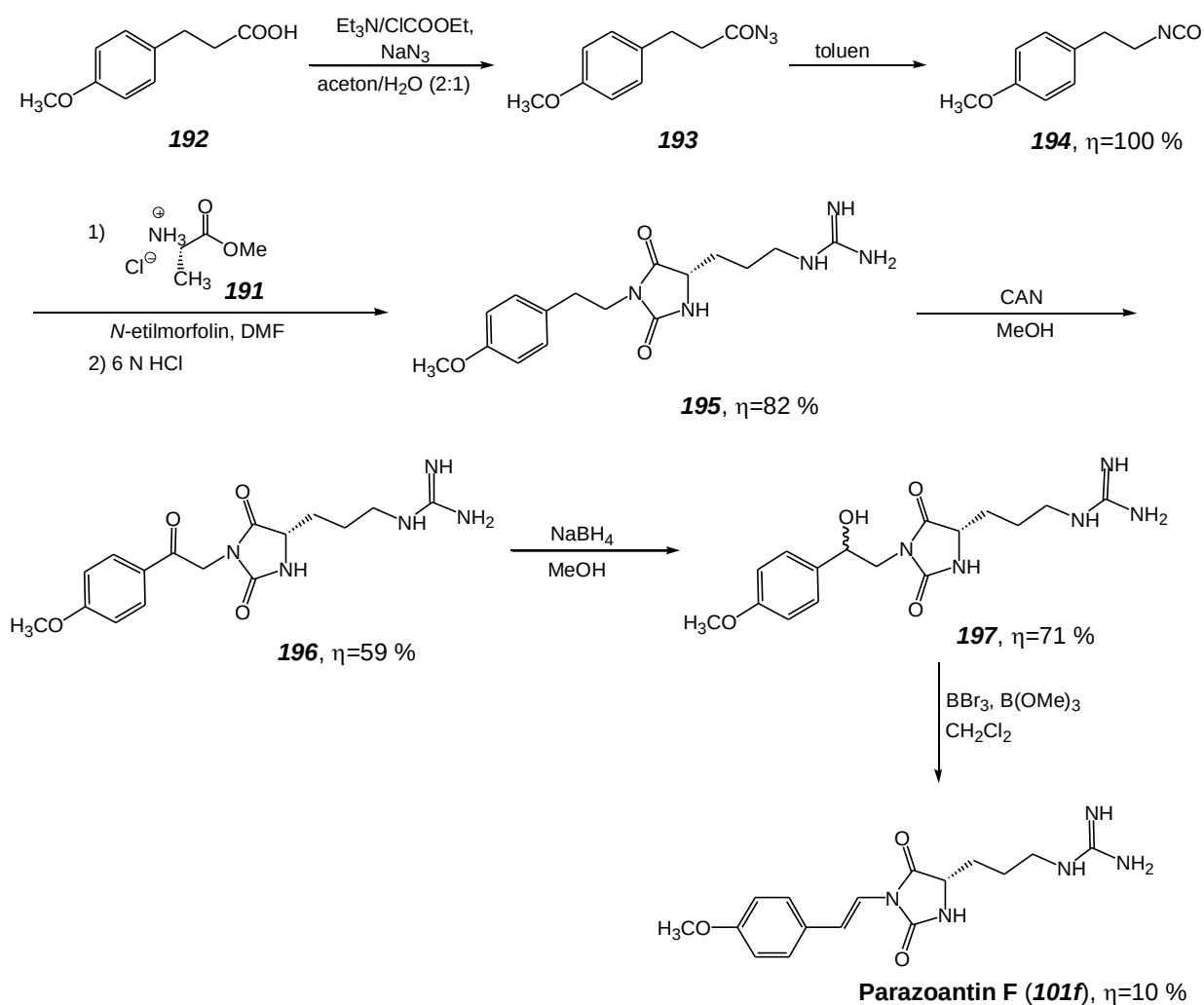
2.3.1. Sinteza parazoantina A i F

Manzo i suradnici prvi su 2012. godine pripravili parazoantine A **101a** i F **101f**.^{110,113} Pripravili su ih jednostavnom biomimetičkom sintezom koja se temelji na reakciji povezivanja metilnog estera *L*-arginin hidroklorida **191** s izocijanatom *p*-kumarinske kiseline **188a** ili 4-metoksicimetne kiseline **188b**. Izocijanat **190a,b** pripremljen je u dva sintetska koraka prema Shemi 28. Reakcijom karboksilnih kiselina **188a,b** s natrijevim azidom, trifenilfosfinom i trikloroacetonitrilom kao katalizatorom u acetonitrilu pri sobnoj temperaturi pripremljen je odgovarajući acil-azid **189a,b** u dobrom iskorištenju, 81 %-tnom i 78 %-tnom.¹¹³ Acil-azidi važni su intermedijeri u organskoj sintezi za dobivanje izocijanata, urea, amina, ketenimina i karbodiimida.¹¹⁴ Acil-azidi **189a,b** potom su podvrgnuti Curtisovoj pregradnji u toluenu na 68 °C pri čemu nastaju izocijanati **190a,b**.¹¹³ Curtiusova pregradnja je organska reakcija koja se koristi za pretvorbu acil-azida do izocijanata uz zagrijavanje. Curtisovom pregradnjom dolazi do pomaka R skupine s karbonilnog ugljika do najbližeg dušikovog atoma uz otpuštanje plinovitog dušika. Otpuštanje dušika pomiče kemijsku reakciju u desno i rezultira formiranjem izocijanatnog produkta u dobrom prinosu, ukoliko nije prisutna voda da ga hidrolizira do amina.¹¹⁵ Izocijanati su vrlo reaktivne vrste te daljnjom reakcijom s nukleofilima poput vode, alkohola ili amina mogu dati karbamate, amine ili derivate uree kao produkte.¹¹⁶ Nakon toga slijedi adicija metilnog estera *L*-arginin hidroklorida **191** na izocijanat **190a,b** uz *N*-etilmorfolin u *N,N*-dimetilformamidu, pri čemu nastaju parazoantini A **101a** i F **101f** u niskom iskorištenju od 11 % odnosno 10 %, Shema 29.¹¹³



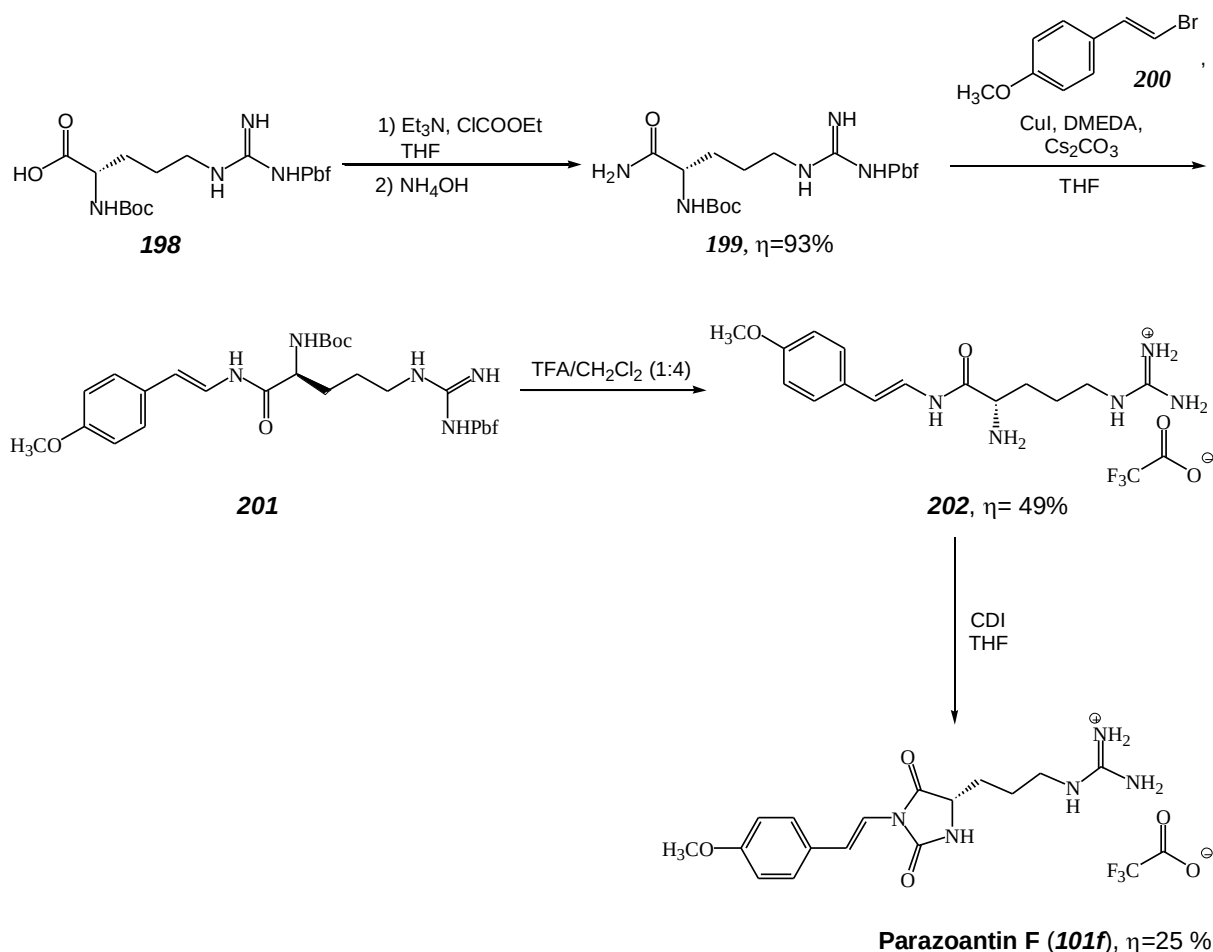
Shema 29. Sinteza parazoantina A **101a** i parazoantina F **101f**

Kasnije su Lindel i Wefer opisali dva nova sintetska puta priprave parazoantina F **101f**.¹¹² Prema metodi A, parazoantin F **101f** pripravljen je u šest koraka polazeći od izocijanata **194**, Shema 30. Početni izocijanat **194** dobiva se u dva sintetska koraka polazeći iz *p*-metoksidihidrocimetine kiseline **192**. Djelovanjem smjese reagensa trietilamina, ClCOOEt i natrijeva azida na kiselinu pripravljen je acil-azid **193**. Curtisovom pregradnjom azida **193** zagrijavanjem u toluenu dobiven je izocijanat **194**. Reakcijom izocijanata **194** s metilnim esterom *L*-arginina **191** uz *N*-etilmorfolin u *N,N*-dimetilformamidu dobiven je hidantoin **195**. Reakcijom hidantoina **195** s cerijevim(IV) amonijevim nitratom (CAN) u metanolu nastaje keton **196**, koji je izoliran uz iskorištenje od 59 %. Redukcijom spoja **196** uz NaBH₄ u metanolu pri sobnoj temperaturi priređena je diastereoizomerna smjesa sekundarnog alkohol **197** u omjeru 1:1, uz iskorištenje od 71 %. Reakcijom alkohola **197** s *in situ* generiranim dimetilbromoboratom iz smjese BBr₃ i B(OMe)₃ u omjeru 1:2 priređen je parazoantin F **101f** u iskorištenju od 10 %.



Shema 30. Priprava parazoantina F **101f** prema metodi A

Prvi korak u sintetskoj metodi B je priprava amida **199**, Boc-Arg(Pbf)-NH₂, koji je priređen reakcijom Boc-Arg(Pbf)-OH **198** sa smjesom Et₃N/CICOOEt u tetrahidrofuranu u iskorištenju od 93 %, Shema 31.¹¹² Reakcijom amida **199** i *p*-metoksibromstirena **200** uz 1,2-dimetiletilendiamin (DMEDA), cezijev karbonat kao bazu i bakrov jodid kao katalizator u tetrahidrofuranu pri 75 °C nastaje spoj **201**. Raksija je potpomognuta mikrovalnim zračenjem. Spoj **202** dobiven je reakcijom spoja **201** sa smjesom otapala trifluorocetna kiselina/diklormetan u omjeru 1:4. Ova smjesa otapala dovodi do skidanja zaštitinih skupina, Boc i Pbf. Karboniliranjem spoja **202** uz *N,N'*-karbonildiimidazol u tetrahidrofuranu pri sobnoj temperaturi u trajanju od 30 h priređena je TFA sol parazoantina F **101f** u iskorištenju od 25%.



Shema 31. Priprava parazoantina F **101f** prema metodi B

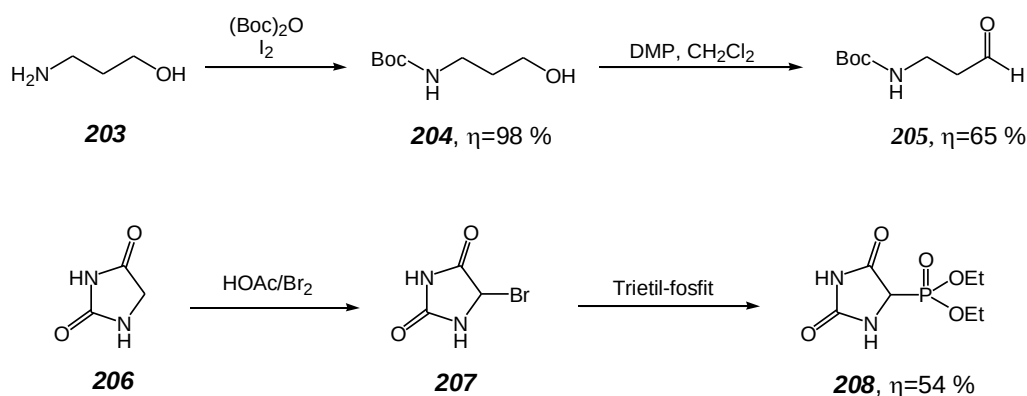
2.3.2. Sinteza parazoantina B i C

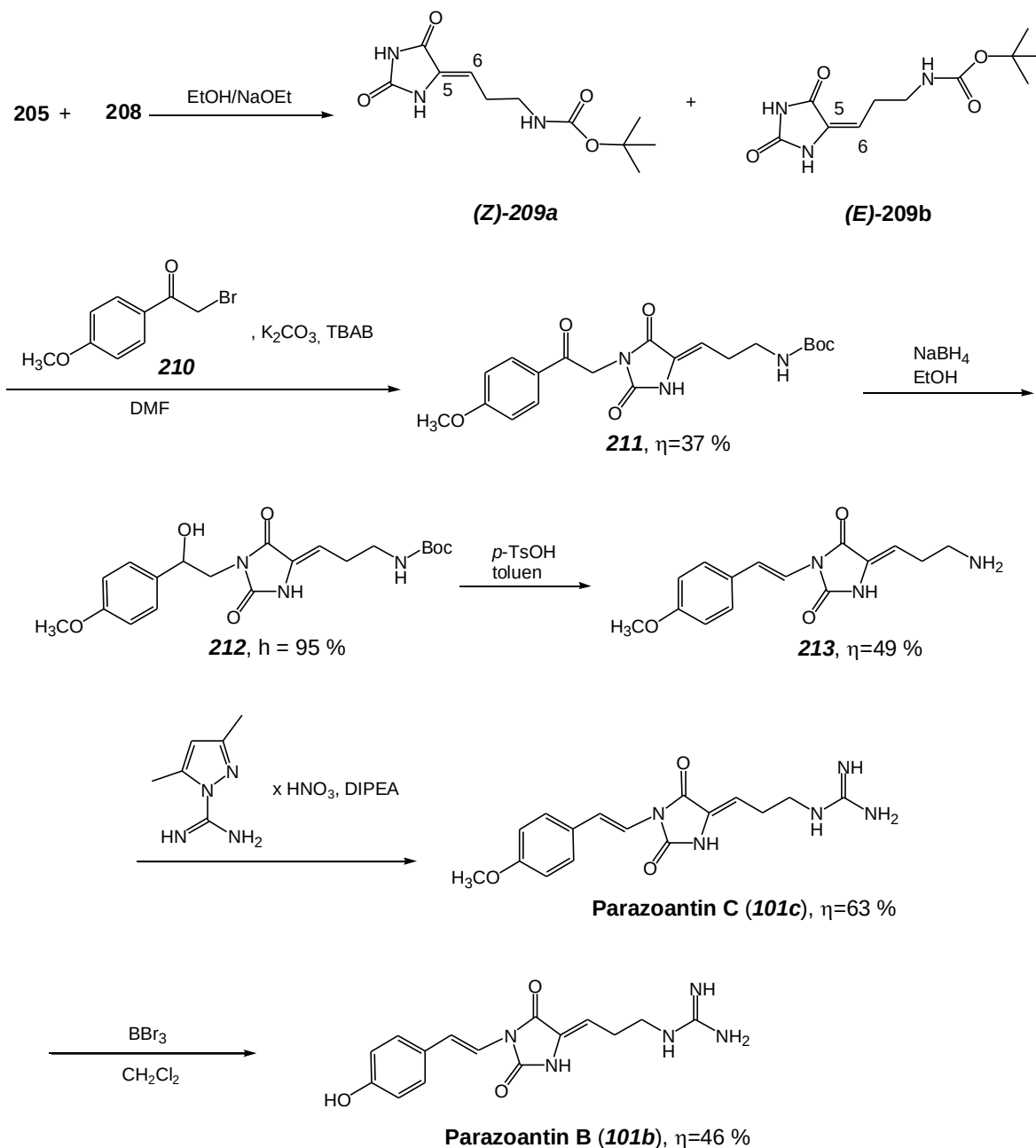
Manzo i suradnici su osim parazoantina A **101a** i F **101f**, pripravili i parazoantine s egzocikličkom dvostrukom vezom *Z*-konfiguracije između C-5 i C-6 atoma, odnosno parazoantine B **101b** i C **101c** te neprirodni analog parazoantina B. Ključni korak u pripravi parazoantina B **101b** je reakcija između hidantoiniskog prekursora **209a/209b** (*Z/E* smjesa stereoizomera) i α -brom-4'-metoksi acetofenona **210**, Shema 32.^{110,117}

Hidantoiniski prekursor (**209a/209b**) potreban za pripravu parazoantina B **101b** i C **101c**, priređen je Horner-Wodsworth-Emmons-ovom reakcijom aldehida *N*-Boc-aminopropanala **205** s dietil-2,4-dioksoimidazolidin-5-il-5-fosfonatom **208**, Shema 32. Aldehid **205** priređen je u dva reakcijska koraka polazeći od 3-aminopropanola **203**. U prvom koraku reakcijom 3-aminopropanola **203** s di-*tert*-butil-dikarbonatom i jodom priređen je *N*-Boc-3-aminopropanol **204** u 98 %-tnom iskorištenju. *N*-Boc-alkohol **204** je selektivno oksidiran u aldehyd **205** pomoću Dess-Martin perjodinana (DMP) u iskorištenju od 65 %.¹¹⁷ DMP je oksidirajući reagens, jedan od najkorisnijih reagensa koji se koristi za oksidaciju primarnih alkohola do aldehida i

sekundarnih alkohola do ketona. Oksidacija se provodi u diklormetanu ili kloroformu pri sobnoj temperaturi. Reakcija se za razliku od drugih metoda izvodi uz blaže uvjete - sobna temperatura, neutralni pH te se produkti dobivaju u vrlo visokim prinosima.¹¹⁸

Dietil-2,4-dioksoimidazolidin-5-il-5-fosfonat **207** pripravljen je u dva sintetska koraka prema Shemi 32.¹¹⁷ Prvi korak sinteze bila je reakcija bromiranja komercijalnog hidantoina **206**. Reakcija je provedena uz octenu kiselinu i Br₂ pri 85 °C pri čemu nastaje 5-bromhidantoin **207**. Spoj **207** potom reagira s trietil-fosfitom (POEt₃) i nastaje dietil 2,4-dioksoimidazolidin-5-il-5-fosfonat **208**. Spoj **208** zatim reagira s aldehidom **205** uz natrijev etoksid kao bazu u etanolu, pri čemu nastaje diastereoizomerna smjesa (*E*)-**209a** i (*Z*)-**209b** u omjeru 1,5:1. Reakcijom hidantoina **209a/209b** i 2-brom-1-(4'-metoksifenil)-etanona **210** uz bazu kalijev karbonat i katalizator faznog prijelaza tetrabutilamonijev bromid (TBAB) u bezvodnom *N,N*-dimetilformamidu pri 50 °C nastaje spoj **211**. Prekursor **210** pripravljen je reakcijom *O*-metiliranja i bromiranja 4-hidroksiacetofenona. Spoj **211** je 3,5-alkil disupstituiran hidantoin sa *Z*-dvostrukom vezom između C-5 i C-6 koja je karakteristična za parazoantin B. *E*-izomer dobiven je samo u tragovima zbog termičke *cis/trans*-izomerizacije prekursora **209a/209b**. Redukcijom spoja **211** s natrijevim borhidridom u etanolu pri sobnoj temperaturi nastaje sekundarni alkohol **212** koji je izoliran u iskorištenju od 95 %. U sljedećem koraku sekundarni alkohol **212** preveden je u spoj **213** dehidratacijom i skidanjem Boc skupine uz 2 ekvivalenta *p*-toluensulfonske kiseline u toluenu pri 110 °C. Produkt **213** je izoliran uz iskorištenje od 49%. Gvaniliranjem spoja **213** uz 3,5-dimetil-1-pirazolilformamidijev nitrat i *N,N*-diizopropiletilamin u bezvodnom *N,N*-dimetilformamidu pri sobnoj temperaturi priređen je parazoantin C **101c**. Demetiliranjem parazoantina C **101c** s BBr₃ u diklormetanu pri 40 °C u trajanju od 1 sata nastaje parazoantin B **101b** u 46 %-tnom iskorištenju.



Shema 32. Sintaza parazoantina B **101b** i C **101c**

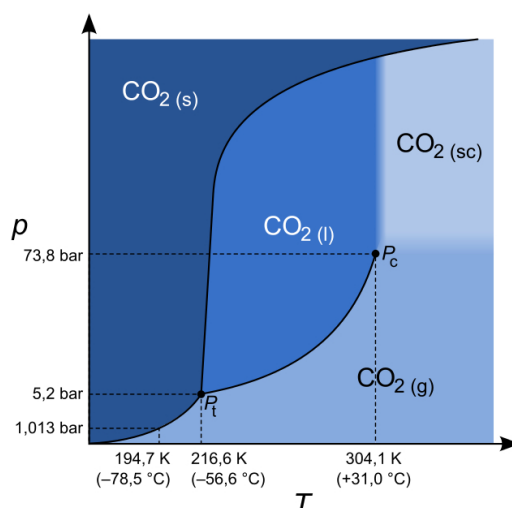
2.4. Superkrična fluidna kromatografija

Superkrična fluidna kromatografija (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) je hibridna tehnika plinske kromatografije (engl. *Gas Chromatography*, GC) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). SFC kao pokretnu fazu koristi fluid temperature i tlaka iznad svoje kritične točke. Međutim, kada je pokretna faza ispod kritične temperature i iznad kritičnog tlaka, ona djeluje kao tekućina (HPLC), a kada je pokretna faza iznad kritične temperature i ispod kritičnog tlaka,

djeluje kao plin (GC), stoga se SFC tehnika smatra hibridom GC-a i HPLC-a.¹¹⁹ SFC tehnika slična je HPLC tehnici normalnih faza.¹²⁰ Spojevi koji se određuju superkričnom fluidnom kromatografijom su ili nehlapljivi ili su osjetljivi na povišenu temperaturu tako da se ne mogu odrediti plinskom kromatografijom ili nemaju funkcionalnih grupa koje je moguće odrediti tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.¹¹⁹ Budući da je SFC kromatografska tehnika koja povezuje HPLC i GC tehnike, mogu se koristiti jednako detektori za plinsku i tekućinsku kromatografiju. Najčešće korišteni detektori su: UV detektor, fluorescencijski detektor, plamenoionizacijski detektor (FID), dušik-fosfor detektor (NPD), detektor zahvata elektrona (ECD), IR spektrometar i spektrometar masa.¹²¹

SFC se u farmaceutskoj industriji primjenjuje za analizu i pročišćavanje lijekova,¹²² te u praćenju razvoja lijeka gdje se analiziraju onečišćenja i razgradni produkti. SFC je osobito raširena tehnika za određivanje enantiomerne čistoće kiralnih spojeva,¹²³ ali i za odjeljivanje enantiomera u preparativnom mjerilu.^{124,125} Superkrična fluidna kromatografija korisna je u analizi pesticida i ostalih kontaminanata u uzorcima tla, vode, otpadnih voda, a koristi se i u petrokemijskoj industriji za analizu goriva, biodizela i biomase. Upotrebljava se za analizu prirodnih spojeva, kao što su lipidi, vitamini, acilgliceroli, steroli, alkaloidi, kumarini, saponini, flavanoidi, karotenoidi, antrakinoni i dr. U prehrambenoj industriji, SFC tehnika korisna je u analizi pesticida i kontaminanata koji mogu proizlaziti iz ambalaže, u kozmetičkoj industriji za analizu voskova koji sadrže estere s dugim ugljikovodičnim lancima. Također, primjenjuje se u bioanalizi, forenzici i analizi eksploziva.¹²⁶

Veliki je broj komponenti koje se mogu koristiti kao fluidi u SFC-u, ali do sada je najkorišteniji ugljikov(IV) oksid jer je netoksičan, jeftin,¹¹⁹ inertan, lako dostupan, ekološki prihvatljiv,¹²⁷ nezapaljiv, nekorozičan¹²⁸ i miješa se s velikim brojem organskih otapala.^{127,128} Njegova kritična temperatura i tlak su relativno niski ($T_c = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_c = 73,8\text{ bar}$).¹¹⁹ Ugljikov(IV) oksid ima nisku viskoznost, dielektričnu konstantu i površinsku napetost¹²⁹ te slabu UV apsorpciju pri niskim valnim duljinama (195, 205 i 210 nm kada se miješa s acetonitrilom, metanolom i etanolom).¹²⁸ Na Slici 16 prikazan je fazni dijagram p - T ugljikovog(IV) oksida.



Slika 16. Fazni dijagram p - T ugljikovog(IV) oksida. (preuzeto iz Nowak i Winter, 2017.)¹³⁰

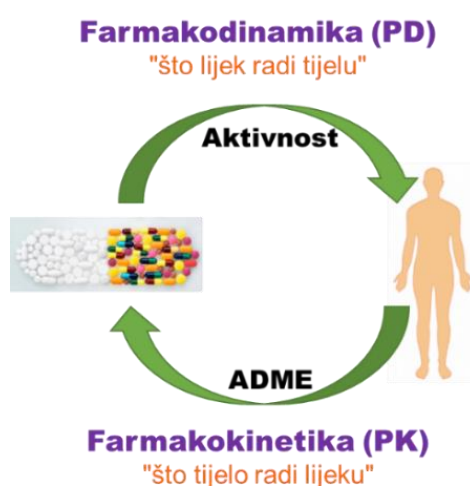
Kao što je vidljivo iz faznog p - T dijagrama, ovisno o vrijednostima tlaka i temperature, ugljikov(IV) oksid može postojati u tri agregatna stanja. Trojna točka i kritična točka, kao i krivulje sublimacije, isparavanja i taljenja, definiraju granične uvjete prijelaza između agregatnih stanja. Granica faza kruto-tekuće ima pozitivan nagib koji je specifičan za većinu tvari. Nagib ukazuje da se talište ugljikovog(IV) oksida povećava s povećanjem tlaka. Trojna točka ugljikovog(IV) oksida definirana je vrijednostima tlaka i temperature od 5,2 bar i -56,5 °C. Kod nižih vrijednosti tlaka i kod temperatura manjih od navedenih -56,5 °C, ugljikov(IV) oksid se nalazi u krutom stanju te ga se naziva suhim ledom. Kritična točka ugljikovog(IV) oksida definirana je vrijednostima tlaka i temperature od 73,8 bar i 31 °C. Između temperatura koje određuju trojnu i kritičnu točku, postoji granična linija koja se naziva linija zasićenja. Ona definira granične vrijednosti tlaka kod kojih će, između navedenih temperatura, doći do prijelaza iz tekućeg u plinovito agregatno stanje, i obrnuto. Iznad vrijednosti tlaka i temperature kojima je definirana kritična točka, ugljikov(IV) oksid će poprimiti svojstva superkritičnog fluida. Pri tome će se njegova viskoznost smanjiti na razinu karakterističnu za plinsku fazu, a gustoća povećati na razinu karakterističnu za tekuću fazu.¹³¹

Polarnost ugljikovog(IV) oksida slična je heksanu i heptanu i time ga čini pogodnim za korištenje kao pokretne faze kod eluiranja nepolarnih spojeva, blago polarnih spojeva i spojeva male molekulske mase.¹³² Iako nije dobar za otapanje polarnih spojeva i spojeva velike molekulske mase, dodatak polarnog organskog otapala, nazvanog modifikator ili kootapalo, može riješiti taj problem.¹³³ U pokretnu fazu dodaje se modifikator u rasponu koncentracija od 2 % do 40 %.^{127,133} Modifikator se natječe s analitom za interakcijska mjesta na nepokretnoj fazi i s povećanjem volumnog udjela modifikatora u pokretnoj fazi skraćuje se vrijeme

zadržavanja analita u kontaktu s nepokretnom fazom, odnosno vrijednosti faktora zadržavanja su niže.¹³³ Najčešće korišteni modifikatori su alkoholi metanol, etanol i propan-2-ol. Osim alkoholnih modifikatora, koriste se još acetonitril,¹¹⁹ kloroform, tetrahidrofuran i etil-acetat.^{118,134} Međutim, dodatak organskog modifikatora u pokretnu fazu ponekad nije dovoljan za eluiranje jako polarnih i bazičnih smjesa pa se u pokretnu fazu dodaje aditiv.¹³⁴ Aditivi se dodaju u rasponu koncentracije od 0,1 % do 1 % za organske modifikatore¹²⁴ i od 1 % do 5 % za vodu.^{121,127} U superkritičnoj fluidnoj kromatografiji se pri analizi bazičnih analita u pokretnu fazu dodaje amin, najčešće izopropilamin, dietilamin ili trimetilamin,¹²⁷ a pri analizi kiselih analita trifluoroctena kiselina, mravlja kiselina, octena kiselina, etansulfonska ili limunska kiselina.¹³⁴ SFC može se koristiti sa svim nepokretnim fazama, polarnim i nepolarnim, odnosno može se koristiti u kromatografiji normalnih ili obrnutih faza.¹³⁵

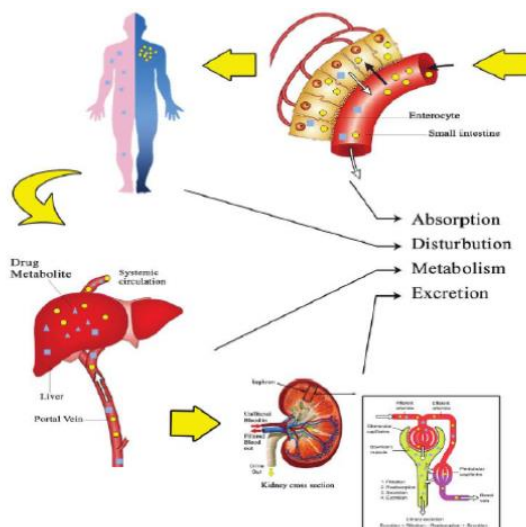
2.5. *In silico* modeliranje

Farmakologija (grč. farmakos = lijek, otrov, sredstvo i logos = nauka) je znanost koja proučava djelovanje lijekova na živi organizam.¹³⁶ Zapravo, proučava porijeklo, fizičke i kemijske osobine, sastav i djelovanje lijekova, njihovu sudbinu u organizmu i eliminaciju, kao i njihovu terapijsku upotrebu.¹³⁷ Farmakologija obuhvaća farmakodinamiku i farmakokinetiku. Farmakodinamika proučava djelovanje lijeka na organizam, a farmakokinetika proučava djelovanje zdravog ili bolesnog organizma na lijek, Slika 17.^{138,139}



Slika 17. Dvije osnovne vrste interakcija između lijeka i tijela - farmakodinamika (engl. *Pharmacodynamic*, skraćenica PD) i farmakokinetika (engl. *Pharmacokinetic*, skraćenica PK) (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.aegislabs.com/pharmacogenetics1>)¹³⁹

Farmakodinamika koja se bavi s onim „što lijek radi tijelu”, proučava vezanje lijeka/spojeva za receptore, uključujući njihovu osjetljivost, postreceptorske učinke i kemijska međudjelovanja.¹⁴⁰ Receptori su biološke makromolekule koje mogu biti dio stanica ili organa, te se lijekovi u organizmu vežu za njih. Afinitet receptora prema lijeku određuje kakav će zapravo učinak imati lijek.¹⁴¹ Jednostavnije se može kazati da farmakodinamika proučava mehanizme djelovanja, biološke i terapijske učinke (glavne i sporedne/nus) lijekova na zdrav ili bolestan organizam.^{136,139} Farmakokinetika dio je farmakologije koji prati što tijelo radi nekoj tvari, primjerice lijeku, otrovu ili nutrijentu.¹⁴² Ona zapravo, proučava proces koji ima utjecaj na kretanje lijeka u organizmu. Nakon unosa lijeka u organizam moguća su četiri osnovna načina njegovog kretanja kroz organizam: apsorpcija, distribucija (raspodjela), metabolizam (biotransformacija) i ekskrecija (eliminacija, izlučivanje). Farmakokinetika proučava ove procese i svojstva spojeva i organizma koji utječu na te procese, a zajednički naziv za njih je ADME (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*).¹³⁸ Farmakokinetiku lijekova je najjednostavnije opisati kao proučavanje puta lijeka kroz organizam, od njegovog unošenja, preko apsorpcije, distribucije, metabolizma do krajnjeg izlučivanja iz organizma, Slika 18.^{138,143}



Slika 18. Put lijeka koji se uzima per os kroz organizam - od njegovog unošenja do izlučivanja iz organizma određen je ADME svojstvima (preuzeto iz Hamidi i sur., 2013.)¹⁴³

Kod razvoja svakog lijeka bitno je zbog bioraspoloživosti na mjestu djelovanja dobro proučiti njegov farmakokinetički ili ADME profil. Također, bitno je istražiti i njegov toksikološki profil,

na primjer genotoksičnost, ekotoksičnost, kardiotoksičnost, hepatotoksičnost, toksičnost na glodavcima, itd.¹⁴⁴

Otkrivanje novih lijekova danas je nezamislivo bez primjene molekulskog modeliranja, tzv. *in silico* metoda.¹⁴⁵ Da bi se skratio put i cijena otkrivanja i razvoja novih lijekova koristi se *in silico* modeliranje kojim se mogu predvidjeti različiti ADME parametri, kao što su topljivost u vodi, permeabilnost, lipofilnost, prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, vezanje za proteine plazme, metabolizam te toksičnost.¹⁴⁶ Za ADME karakterizaciju spojeva *in silico* koriste se različiti računalni programi, kao na primjer ADMET Predictor,¹⁴⁷ SwissADME,¹⁴⁸ preADME,¹⁴⁹ DataWarrior,¹⁵⁰ admetSAR,^{151,152} pkCSM¹⁵³ i dr.

In silico modeliranje ADMET svojstava molekula provodi se s ciljem procjene njihovih bioloških vrijednosti, što je iznimno važno za donošenje odluka u postupku dizajniranja novih lijekova.¹⁴⁵ Lijek kandidat za oralnu primjenu mora posjedovati određene fizikalno-kemijske karakteristike. Pri eliminaciji spojeva u ranoj fazi istraživanja, iz procesa istraživanja se uklanjaju spojevi koji ne zadovoljavaju Lipinskijevo pravilo pet (engl. *Lipinski's Rule Of Five*).^{154,155}

In silico modeliranje doprinosi boljem razumijevanju fizikalno-kemijskih pozadina važnih ADMET svojstava molekula i omogućava procjenu njihovih vrijednosti kako za sintetizirane spojeve, tako i za nesintetizirane spojeve. *In silico* metode omogućavaju brzu procjenu željenih parametara i odabir spojeva koji će se sintetizirati. Isto tako, smanjuju potrebe za velikim brojem *in vitro* i/ili *in vivo* eksperimenata čime se znatno smanjuju i troškovi i vrijeme potrebni za razvoj novih ljekovitih tvari. Međutim, ove metode sa sobom nose i određeni stupanj rizika, u pogledu točnosti, preciznosti i pouzdanosti.¹⁵⁶

3. METODIKA

3.1. Materijali i metode

Komercijalno dostupni reagensi dobavljeni su od sljedećih proizvođača kemikalija: Sigma Aldrich, TCI, Alfa Aesar, Acros Organics, Merck ili VWR Chemicals te su korišteni bez daljnjeg pročišćavanja. Otapala su dobavljena od Kemika, Sigma Aldrich, Fischer, Carlo Erba ili Honeywell. Za potrebe provođenja reakcija pri suhim uvjetima, otapala su osušena korištenjem standardnih metoda.¹⁵⁷

Spektri nuklearne magnetske rezonancije, ^1H i ^{13}C NMR, snimljeni su na Bruker AV 300 ili Bruker AV 600. Kao otapala korišteni su CDCl_3 , CD_3CN ili $\text{DMSO}-d_6$ pri sobnoj temperaturi. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) kao unutrašnjem standardu. Konstante sprege (J) izražene su u hercima (Hz). ^1H spektri prikazani su kako slijedi: ^1H NMR (frekvencija spektrometra, otapalo): δ kemijski pomak / ppm (asignacija, multiplicitet, konstante sprege, broj protona). ^{13}C spektri prikazani su kako slijedi: ^{13}C NMR (frekvencija spektrometra, otapalo): δ kemijski pomak / ppm (asignacija). Pikovi multipliciteta označeni su kao: s (singlet), d (dublet), dd (dublet dublet), t (triplet), dt (dublet tripleta), q (kvartet), p (pentet) i m (multiplet). Spojevi **13a** i **14a** asignirani su na temelju jednodimenzionalnih ^1H i APT (engl. *Attached Proton Test*) i dvodimenzionalnih NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Spectroscopy*), COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*), HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) i HMQC (engl. *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) eksperimenata.

IR spektri spojeva **1a**, **1b**, **3**, **4**, **5**, **6a**, **6b**, **7a**, **7b**, **8a**, **8b** snimljeni su na spektrometru Perkin Elmer Spectrum RX I FT-IR Systemu u KBr pastilama. FTIR spektri spojeva *cis*-**9**, *trans*-**10**, **3e**, **12a-v**, **13a-i**, **14a-i**, **29** i **30** snimljeni su na PerkinElmer UATR Two spektrometru. Svi uzorci snimljeni su u ATR modu u rasponu od 450 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} , uz razlučivost od 4 cm^{-1} i 8 skenova po spektru.

Temperature taljenja sintetiziranih spojeva određene su polarizacijskim optičkim mikroskopom Olympus System Microscope (model BX51TF) opremljenog s grijaćim stolićem Linkman THMS 600 i sustavom za kontrolu temperature TMS 93 te digitalnom kamerom Olympus C 5050 ZOOM. Ciklusi grijanja uzorka provedeni su brzinom $5\text{ }^\circ\text{C/min}$.

Tijek reakcija prećen je tankoslojnom kromatografijom ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (kromatografijom obrnutih faza). Tankoslojna kromatografija (TLC) izvedena je na komercijalno dostupnim aluminijskim pločicama silikagela DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) te na pločicama aluminijevog oksida DC-Alufolien Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ neutral (Merck). Spojevi su detektirani pomoću UV lampe pri 254 nm, parama joda ili su bojani ninhidrinom, fosfomolibdatnim reagensom ili kalijevim permaganatom. Kromatografsko čišćenje produkata provedeno je kromatografijom na kolonama punjenim silikagelom, Silica gel 60 (promjer čestica 0,040–0,063 mm ili promjer čestica 0,063–0,200 mm), Merck. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija rađena je na Hewlett-Packard 1050 Series instrumentu uz UV/VIS detektor tvrtke Knauer K-2301 na koloni Nucleosil C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m. Vrijeme analize je bilo 27 min, valne duljine detekcije su bile 210, 238, 254 i 280 nm, a protok pokretne faze iznosio je 1,0 mL min⁻¹. Korišten je gradijent otapala A (voda uz dodatak 0,5% fosforne kiseline) i B (metanol). Za eluiranje uzoraka korištena je sljedeća metoda:

<i>t</i> /min	0	20	25	25,01	27
B/%	30	70	70	30	30

Određivanje diastereomernih omjera produkata **3** i **4** provedeno je na instrumentu Shimadzu LC-2010HTC s Photodiode Array detektorom. Analiza je provedena na koloni Hypersil BDS C18, Thermo Scientific, 5 μ m, 150 mm x 4,6 mm. Valna duljina detekcije je bila 254 nm, temperatura kolone 30 °C, protok otapala iznosio je 1,0 mL min⁻¹, a volumen injektiranja 30 μ L. Korišten je gradijent otapala A (voda uz dodatak 0,1% trifluoroctene kiseline) i B (acetonitril). Za eluiranje spojeva **3** i **4** korištena je sljedeća metoda:

<i>t</i> /min	0	5	30	35	35,01	37
B/%	0	0	100	100	0	0

HPLC analiza 3-ftalimido- β -latama **9** i **10** provedena je na instrumentu za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Shimadzu LC-2010HTC. Analiza je provedena na koloni LiChrospher 10 CN, Merck, 5 μ m, 250 x 4,6 mm. Valna duljina detekcije je bila 254 nm, temperatura kolone 30 °C, a protok otapala iznosio je 1,0 mL min⁻¹, a volumen injektiranja 30 μ L. Korišten je gradijent otapala A (voda) i B (acetonitril). Za eluiranje spojeva **12a-v** korištena je sljedeća metoda:

<i>t</i> /min	0	15	17	17,01	21
B/%	30	70	70	30	30

HPLC analiza *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** provedena je na instrumentu za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Shimadzu LC-2010HTC. Analiza 3-ftalimido- β -latama **9** i **10** provedena je na koloni LiChrospher 10 CN, Merck, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, a analiza *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Synergi Polar-RP, Phenomenex, 4 μ m, 150 mm x 4,6 mm. Valna duljina detekcije je bila 254 nm, temperatura kolone 30 °C, a protok otapala iznosio je 1,0 mL min⁻¹, a volumen injektiranja 30 μ L. Korišten je gradijent otapala A (voda) i B (acetonitril). Za eluiranje spojeva **12a-v** korištena je sljedeća metoda:

<i>t</i> /min	0	20	25	25,01	27
B/%	30	70	70	30	30

HPLC analiza smjese diastereomernih 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i/14a-i** provedena je na instrumentu za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Shimadzu LC-2010HTC. Analiza je provedena na koloni Zorbax Extend-C18, Agilent Technologies, 5 μ m, 250 x 4,6 mm. Valna duljina detekcije je bila 254 nm, temperatura kolone 25 °C, a protok otapala iznosio je 0,8 mL min⁻¹. Za odjeljivanje diastereomera korišten je gradijent otapala A (voda uz dodatak 0,2 % trifluoroctene kiseline) i B (acetonitril uz dodatak 0,1 % trifluoroctene kiseline). Za eluiranje smjese **13a-i/14a-i** korištene su sljedeće metode:

Spoj	Metoda	<i>t</i> /min	0	60	63	63,01	67
13a/14a, 13d/14d, 13e/14e	A	B/%	35	48	48	35	35
13c/14c, 13h/14h, 13i/14i	B	B/%	35	60	60	35	35
13b/14b, 13f/14f, 13g/14g	C	B/%	45	58	58	45	45

Za odjeljivanje diastereomera pripremljenih 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i/14a-i** korišten je instrument za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti 1260 Infinity II prepHPLC, proizvod tvrtke Agilent Technologies, Germany, sastavljen od sljedećih dijelova: binarna gradijentna preparativna pumpa G7161A, ručni dodavač uzorka G1328C, VWD detektor G7114A i kolektor frakcija G1364E. Podaci dobiveni kromatografijom obrađeni su računalom uz program OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.01.08[210], proizvod tvrtke Agilent Technologies, Germany. Za preparativnu HPLC-kromatografiju korištena je preparativna Zorbax Extend C-18 PrepHT kolona, Agilent Technologies, 150 mm x 21,2 mm,

5 μm . Vrijeme analize je bilo 40,18 min, valna duljina detekcije je bila 254 nm, a protok pokretne faze je iznosio 17 mL min⁻¹. Za odjeljivanje diastereomera korišten je gradijent otapala A (voda) i B (acetonitril):

Spoj	Metoda	t/min	0	35,98	37,78	37,79	40,18
13a/14a, 13d/14d, 13e/14e	D	B/%	35	48	48	35	35
13c/14c, 13h/14h, 13i/14i	E	B/%	35	60	60	35	35
13b/14b, 13f/14f, 13g/14g	F	B/%	45	58	58	45	45

Provjera čistoće odvojenih diastereomera provedena je na instrumentu Shimadzu LC-2010HTC s analitičkom kolonom Zorbax Extend-C18, Agilent Technologies, 5 μm , 250 x 4,6 mm. Valna duljina detekcije je bila 254 nm, temperatura kolone 25 °C, a protok otapala iznosio je 0,8 mL min⁻¹. Korišten je gradijent otapala A–C.

Odjeljivanje enantiomera spojeva *cis*-3-amino- β -laktama **3** i **4** u kromatografiji normalnih faza izvedeno je na Knauer sustavu (pumpa Knauer 64, degazer 4-Port Knauer Degasser, sučelje Interface Knauer, UV detektor Knauer Variable Wavelength Monitor i CD detektor Jasco CD-2095). Korištena je izokratna metoda uz metanol/voda (7:3, v/v) kao pokretnu fazu, protok od 1 mL min⁻¹ pri UV detekciji 254 nm, a volumen injektiranja je bio 20 μL . Korištene su kolone Chirallica PST-1, Institut Ruđer Bošković, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm i Chirallica PST-2, Institut Ruđer Bošković, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm.

Pri enantioselektivnoj analizi pripremljenih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** korišteni su sljedeći instrumenti:

- Instrument za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti Agilent 1200 Systems, proizvod tvrtke Agilent Technologies, Germany, sastavljen od sljedećih dijelova: vakuumski membranski degaser G1322A, kvaterna gradijentna pumpa G1311A, automatski uzorkivač G1329A, grijač odjeljka za kolonu G1330B, MW detektor G1365D. Podaci dobiveni kromatografijom prije su ispisa obrađeni računalom uz program EZChrom Elite, proizvode tvrtke Agilent Technologies, Germany.
- Instrument za superkritičnu fluidnu kromatografiju 1260 Infinity II SFC/UHPLC Hybrid, proizvod tvrtke Agilent Technologies, Germany, sastavljen od sljedećih dijelova: kvaterna gradijentna pumpa G7111B, binarna gradijentna pumpa G4782A, automatski sustav za uzorkovanje G4767A, grijač odjeljka za kolonu G7116A, skenirajući UV/VIS detektor G7115A, RI detektor G7162A, SFC modul G4301A. Podaci dobiveni kromatografijom

prije su ispisa obrađeni računalom uz program OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.01.08[210], proizvod tvrtke Agilent Technologies, Germany.

Enantioselektivna analiza pripremljenih 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** provedena je na 1260 Infinity II SFC/UHPLC Hybrid (Agilent Technologies, Germany) uz heksan/propan-2-ol (9:1, v/v) kao pokretnu fazu.

Identifikacijski maseni spektri (ESI-MS) spojeva snimljeni su na uređaju Agilent 6410 Triple Quad® tvrtke Agilent Technologies uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI, engl. *Electron Spray Ionisation*). Ionizacija uzoraka vršila se elektroraspršenjem (ESI) s radom u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) modu uz napon izvora od 135 V.

Spektri masa visokog razlučivanja snimljeni su hibridnim spektrometrom masa s kvadrupolom i analizatorom vremena leta (Q-TOF-MS) Agilent 6550 Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer G6550A s Dual AJS ESI sustavom za elektrosprej ionizaciju. Analiti su ionizirani u pozitivnom načinu rada.

UV/VIS spektri 3-amino- β -laktama **4a-d** i **5a,b** snimljeni su na JASCO V-650 spektrofotometru. Snimanje ECD spektra provedeno je na spektropolarimetru JASCO J-715 (JASCO, Tokyo, Japan), koristeći kvarcnu kivetu optičkog puta 0,01 cm (za spojeve **4c** i **4d**) ili 0,05 cm (za spojeve **4a**, **4b** i **5a**). 3-Amino- β -laktami **4a-d** i **5a,b** otopljeni su u acetonitrilu ($c = 1,88 \text{ mmol L}^{-1}$).

UV/VIS i ECD spektri 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-ent1**, **13a-ent2**, **14a-ent1** i **14a-ent2** snimljeni su na JASCO J-815 (JASCO, Tokyo, Japan) spektropolarimetru u rasponu valnih duljina od 185 nm do 350 nm pri temperaturi od 25 °C. Brzina snimanja iznosila je 100 nm/min rezolucijom 2 nm i odzivom od 1 sekunde. Duljina optičkog puta bila je 1 cm. 3,5-Disupstituirani hidantoini **13a-ent1**, **13a-ent2**, **14a-ent1** i **14a-ent2** otopljeni su u acetonitrilu ($c = 1,456 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). dobiveni rezultati su analizirani u programu Origin 7.5.

3.2. *In silico* karakterizacija ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea, kiralnih 3,5-disupstituiranih hidantoina, parazoantina A-J i fenilamino-derivata parazoantina A i F

In silico karakterizacija *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituiranih hidantoina **3a-v** i **4a-v**, prirodnih parazoantina **5a-j** te fenilamino-derivata parazoantina A **5k** i F **5l** provedena je pomoću računalnih programa ADMET Predictor¹⁴⁷ i DataWarrior¹⁵⁰ te internetskog poslužitelja admetSAR [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>].

Strukture svih spojeva nacrtane su u računalnom programu ChemDraw Ultra 7.0¹⁵⁸ i sačuvane u formatu SMILES (engl. *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*, pojednostavljena specifikacija linijskog unosa podataka o strukturi molekula) koji je upotrebljen kao ulaz za programe.¹⁵⁹ Zapis molekula SMILES jednodimenzionalni je kodirani zapis ASCII koji prihvaća gotovo sav kemijski softver. Primjer takvog zapisa za molekulu β -laktamske uree **1a** je C(=O)(NC1C(=O)N(c2ccc(F)cc2)C1c3ccc(OC)cc3)NCC=C.

Uz svaki parametar je navedena „mek“ granica, a u zagradama je naveden tip modela – klasifikacijski ili kontinuirani model. Klasifikacijski modeli kvalitativno predviđaju ima li ili nema spoj određeno svojstvo, dok su kontinuirani modeli kvantitativni i predviđaju vrijednost modeliranog parametra. Za kontinuirani model u tablicama prikazane su četiri vrijednosti: $\bar{x}$ – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min. – minimalna i Max. – maksimalna vrijednost u svrhu usporedbe pet grupa spojeva i lijeka ezetimiba.

Kvantilni dijagrami sa statističkim parametrima napravljeni su pomoću funkcije ggbetweenstats paketa ggstatsplot u programu R [https://indrajeetpatil.github.io/ggstatsplot/articles/web_only/ggbetweenstats.html]. Statistički parametri za usporedbu grupa izračunati su pomoću jednosmjere analize varijanci (ANOVA) (n – broj spojeva po klasi, n_{obs} – ukupan broj spojeva, μ – prosječna vrijednost parametra po klasi, F parametar, ω^2 i njegov interval pouzdanosti (ako CI ne sadrži nulu, uočena razlika/učinak je različit od 0; visoka vrijednost F znači da je varijabilnost između grupa veća od one unutar grupa).

3.2.1. Predviđanja primjenom programa ADMET Predictor

Primjenom računalnog programa ADMET Predictor verzija 9.5¹⁴⁷ (Simulations Plus Inc.) predviđena su različita molekulska svojstva, kao što su molekulski deskriptori broj donora vodikovih vaza (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) i akceptora vodikovih veza (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) i topološka ukupna polarna površina (engl. *Topological Polar Surface Area*, TPSA), te eksperimentalno odredljivi parametri topljivost u vodi ($S+S_w$), lipofilnost ($S+\log P$), permeabilnost ($S+P_{\text{eff}}$), vjerojatnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (BBB), udio spoja nevezanog za protein plazme i slobodnog u plazmi (hum_fup), omjer koncentracije lijeka u krvi i plazmi (RBP), vjerojatnost inhibicije P-glikoproteina (P-gp), akutna toksičnost (Rat_Acute), kronična toksičnost (Rat_TD50), parametri hepatotoksičnosti ($Ser_AlkPhos$, Ser_ALT , Ser_AST , Ser_GGT i Ser_LDH). Pomoću ovog programa procijenjeni

su rizici za svaki spoj od niskog prolaza kroz stijenku crijeva i ulaska u krv (*Absn_Risk*) pa do broja potencijalnih problema koje s toksičnošću može imati ispitivani spoj (*Tox_Risk*).

ADMET Predictor je napredni računalni program koji omogućuje znanstvenicima da brzo procjene ADMET svojstava novih kemijskih spojeva, odnosno potencijalnih lijekova, iz njihove kemijske strukture.¹⁶⁰ Njegovi prediktivni modeli grupirani su u:

- fizikalno-kemijski i biofarmaceutski modul (engl. *Physicochemical And Biopharmaceutical Module*, skraćenica PhysChem)
- modul metabolizma (engl. *Metabolism Module*, skraćenica Met)
- i modul toksičnosti (engl. *Toxicity Module*, skraćenica Tox).

Modul PhysChem – sadrži prediktivne modele koji predviđaju ionizaciju (pK_a), lipofilnost, topljivost, permeabilnost, transportere, farmakokinetičke parametre i antivirusnu inhibiciju (HIVI-TC i HIVI-ST) spojeva.

Modul Met sadrži modele koji predviđaju mjesto metabolizma, inhibitore aktivnosti i kinetičke parametre. Također, sadrži modul koji klasificira molekulu kao supstrat/ne-supstrat za ljudske UDP-glukoronozil-transferaze (UGT).

Modul Tox sadrži modele koji predviđaju genotoksičnost, razne vrste ekotoksičnosti, toksičnost specifičnu za glodavce te toksičnost specifičnu za ljude (kardiotoksičnost, hepatotoksičnost, fosfolipidozu i maksimalnu preporučenu terapijsku dozu).

3.2.2. Predviđanje primjenom programa DataWarrior

Primjenom računalnog programa DataWarrior¹⁵⁰ predviđena je ukupna površina (engl. *Total Surface Area*, TSA), relativna polarna površina (engl. *Relative Polar Surface Area*, RelPSA), indeks molekulskog oblika (ShapeIndex) i molekulska fleksibilnost (Flexibility).

3.2.3. Predviđanje primjenom internetskog poslužitelja admetSAR

Primjenom internetskog poslužitelja admetSAR [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>] procijenjeno je jesu li spojevi supstrati ili inhibitori jetrenih CYP izoenzima (citokrom P450) i inhibiraju li važne farmakokinetičke transportere BCRP (engl. *Breast Cancer Resistance Protein* – protein rezistencije raka dojke), BSEP (engl. *Bile Salt Export Pump* – eksportna pumpa za žučne soli), OATP (engl. *Organic Anion-Transporting Polypeptide* – organski anionski transportni polipeptid) (1B1, 1B3 i 2B1) i OCT 1 i 2 (engl. *Organic Cation*

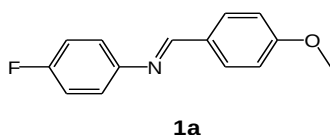
Transporter – organski kationski transporter). Inhibicija važnih transportnih proteina mogu utjecati na pojavu tzv. interakcija između lijekova koje pacijent uzima.

3.3. Priprava 3-amino- β -laktama

3.3.1. Priprava imina

Otopini odgovarajućeg aldehida (1 ekv.) u bezvodnom diklormetanu dodan je 4-fluoranilin (1 ekv.) uz snažno miješanje reakcijske smjese. Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi tijekom 20 sati, nakon čega je otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveni sirovi produkt prekrizaliziran je iz smjese heksana i etil-acetata.

3.3.1.1. *N*-(4-Fluorfenil)-1-(4-metoksifenil)metanimin **1a**



Prema općem postupku, iz 4-metoksibenzaldehida (6 mL, 49,313 mmol) i 4-fluoranilina (4,67 mL, 49,313 mmol) u bezvodnom diklormetanu (30 mL), priređen je imin **1a**. Sirovi produkt pročišćen je prekrizalizacijom iz smjese heksana i etil-acetata nakon čega je dobiveno 8,1 g (72,6 %) čistog produkta **1a** u obliku bijelih kristalića.

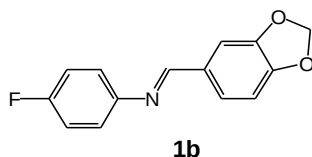
$$t_t = 68-70\text{ }^{\circ}\text{C}$$

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3445, 2974, 2943, 2847, 1626, 1605, 1593, 1512, 1460, 1441, 1308, 1254, 1209, 1180, 1160, 1108, 1097, 1022, 974, 885, 841, 748.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 6,98 (d, $J = 8,8$, 2H, Ar-H); 7,06 (t, $J = 8,7$, 2H, Ar-H); 7,14–7,20 (m, 2H, Ar-H); 7,83 (d, $J = 8,7$, 2H, Ar-H); 8,36 (s, 1 H, $\text{CH}=\text{N}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,57 (OCH_3); 114,36 ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 115,90 (d, $J = 22,5$ Hz, $4\text{-FC}_6\text{H}_4$); 122,35 (d, $J = 8,0$ Hz, $4\text{-FC}_6\text{H}_4$); 129,29 ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 130,62 ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 148,50 (d, $J = 2,7$ Hz, $4\text{-FC}_6\text{H}_4$); 159,63 ($\text{CH}=\text{N}$); 161,19 (d, $J = 244,1$ Hz, $4\text{-FC}_6\text{H}_4$); 162,76 ($4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$).

HR-MS za $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FNO}$ ($M_r = 229,24958$): izračunato m/z 232.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nađeno m/z 230,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.3.1.2. 1-(2H-1,3-benzodioskol-5-il)-N-(4-fluorfenil)metanimin **1b**

Prema općem postupku, iz piperonala (3 g, 19,983 mmol) i 4-fluoranilina (1,9 mL, 19,983 mmol) u bezvodnom diklormetanu (30 mL), priređen je imin **1b**. Sirovi produkt pročišćen je prekrizalizacijom iz smjese heksana i etil-acetata nakon čega je dobiveno 3,47 g (71,4 %) čistog produkta **1a** u obliku bijelih kristalića.

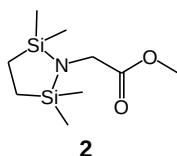
$$t_f = 60\text{--}61\text{ }^{\circ}\text{C}$$

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3445, 2974, 2943, 2847, 1626, 1605, 1593, 1512, 1460, 1441, 1308, 1254, 1209, 1180, 1160, 1108, 1097, 1022, 974, 885, 841, 748.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 6,00 (s, 2H, CH_2 , benzodioskol); 6,86 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H, benzodioskol); 7,05 (t, $J_{1,2} = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H, 4- FC_6H_4); 7,16–7,21 (m, 2H, Ar-H, 4- FC_6H_4); 7,25 (dd, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, 1H, Ar-H, benzodioskol); 7,49 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, Ar-H, benzodioskol); 8,30 (s, 1 H, $\text{CH}=\text{N}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 101,76 (CH_2 , benzodioskol); 107,27 (Ph, benzodioskol); 108,41 (benzodioskol); 115,95 (d, $J = 22,1$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 122,38 (d, $J = 8,4$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 125,67 (benzodioskol); 131,58 (benzodioskol); 148,46 (d, $J = 2,9$ Hz, C1 4- FC_6H_4); 149,83 (benzodioskol); 150,83 (benzodioskol); 159,3 (d, $J = 1,4$ Hz, $\text{CH}=\text{N}$); 161,20 (d, $J = 244,3$ Hz, C4, 4- FC_6H_4).

HR-MS za $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FNO}_2$ ($M_r = 243,23310$): izračunato m/z 244,0769 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nađeno m/z 244,0767 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.3.2. Priprava diastereomerne smjese cis/trans-3-amino- β -laktama3.3.2.1. Priprava metil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata **2**

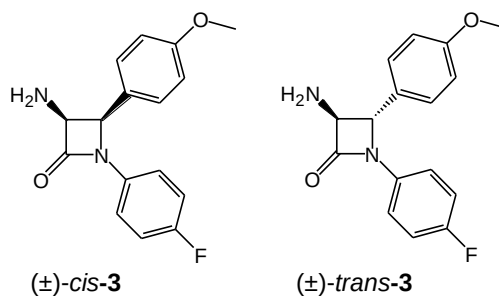
Otopini metilnog estera glicin hidroklorida (1,5 g, 11,947 mmol) u bezvodnom diklormetanu dodan je bezvodni trietilamin (5,7 mL, 40,620 mmol) uz snažno miješanje reakcijske smjese.

Nastala smjesa miješana je 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim je polagano dodana otopina 2,5-diklor-2,5-dimetil-2,5-disilaheksana (2,98 g, 13,859 mmol) u bezvodnom diklormetanu. Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Nakon 20 sati miješanja, reakcija je prekinuta ulijevanjem reakcijske smijese u zasićenu otopinu natrijevog karbonata (50 mL). Dobivena smjesa ekstrahirana je diklormetanom (2 x 50 mL), a spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 2,75 g (99,3 %) produkta **2** u obliku smeđeg ulja, koji je sadržavao oko 10 % početnog metilnog estera glicin hidroklorida. Smjesa je izravno korištena u sljedećem reakcijskom koraku.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,05 (s, 12H, CH_3), 0,73 (s, 4H, CH_2), 3,52 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{COOCH}_3$), 3,67 (s, 3H, COOCH_3).

3.3.2.2. Priprava *cis/trans*-3-amino- β -laktama **3** i **4**

Otopini diizopropilamina (1,1 ekv.) u bezvodnom tetrahidrofuranu dokapana je 2,5 M otopina *n*-butilitija u heksanu (1,1 ekv.) pri 0 °C. Reakcijska smjesa miješana je 30 min na 0 °C, a zatim je ohlađena na -78 °C u aceton/suhi led kupelji. Ohlađenoj smjesi polako je dokapan metilni ester *N,N*-bis(silil)glicina (1,0 ekv.) u bezvodnom tetrahidrofuranu. Dobivena smjesa miješala se 30 minuta nakon čega je polako dokapana otopina odgovarajućeg imina (1,0 ekv.) u bezvodnom tetrahidrofuranu. Reakcija se odvijala 2 sata pri -78 °C, a zatim je temperatura polako podignuta do sobne temperature i reakcija je ostavljena preko noći uz miješanje. Reakcijska smjesa je nakon završetka reakcije izlivena u vodu i led te ekstrahirana s etil-acetatom (3 x 40 mL). Spojeni organski slojevi ekstrahirani su s 0,1 M vodenom otopinom klorovodične kiseline (3 x 50 mL). Dobiveni vodeni slojevi zalučeni su do pH = 11 s 2 mol dm^{-3} otopinom natrijevog hidroksida i potom ekstrahirani s etil-acetatom. Spojeni organski slojevi su osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi produkt očišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens.

3.3.2.2.1. *cis/trans*-3-Amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on **3**

Prema općem postupku, iz metil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata **2** (1,49 g, 6,438 mmol) i imina **1a** (1,48 g, 6,438 mmol) uz *in situ* generiran litijev diizopropilamin, priređen je β-laktam **3**. Za pripravu litijevog diizopropilamina korišten je diizopropilamin (996 μL, 7,106 mmol) i 2,5 mol L⁻¹ otopina *n*-butillitija u heksanu (2,8 mL, 7,106 mmol). Sirovi reakcijski produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens. Dobiveno je 1,12 g (60,9 %) smjese *cis*- i *trans*-izomera **3** u obliku svjetlo žutih kristalića. ¹H i ¹³C NMR analiza provedena je na *cis/trans*-smjesi. Da bi se odredila apsolutna konfiguracija *cis*-izomera, mala količina spoja **3** je odjeljena HPLC-om na koloni Chirallica PST-2 uz metanol/voda (7:3, v/v). Dobiveno je 2 mg enantiomera *cis*-**3a** i 2 mg enantiomera *cis*-**3b**.

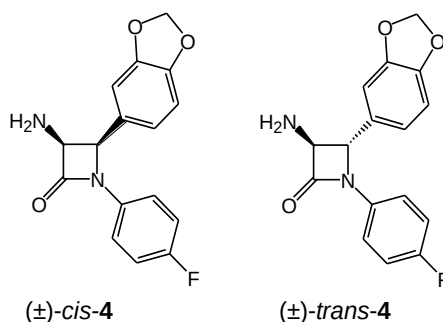
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3384, 3341, 3177, 2933, 2840, 1732, 1611, 1510, 1483, 1380, 1246, 1229, 1154, 1115, 1029, 965, 832, 793, 717.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 1,28 (bs, 2H, NH₂, *cis* + *trans*); 3,81 (s, 3H, OCH₃, *cis* + *trans*); 4,05 (d, J = 1,9 Hz, 1H, C3, β-laktam, *trans*), 4,58 (d, J = 5,5 Hz, 1H, C3, β-laktam, *cis* + C4, β-laktam, *trans*); 5,20 (d, J = 5,5 Hz, 1H, C4, β-laktam, *cis*); 6,89 – 6,99 (m, 4H, Ar-H, *cis* + *trans*); 7,17 (d, J = 8,6 Hz, 2H, *cis*); 7,23–7,27 (m, 4H, Ar-H, *trans*); 7,30–7,34 (m, 2H, Ar-H, *cis*).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 55,45 (OCH₃); 62,00 (C3, β-laktam); 64,00 (C4, β-laktam); 114,8 (4-CH₃OC₆H₄); 116,0 (d, J = 22,8 Hz, 4-FC₆H₄); 118,9 (d, J = 8,2 Hz, 4-FC₆H₄); 125,7 (4-CH₃OC₆H₄); 128,3 (4-CH₃OC₆H₄); 133,8 (d, J = 2,2 Hz, 4-FC₆H₄); 159,2 (d, J = 243,9 Hz, 4-FC₆H₄); 160,00 (4-FC₆H₄); 167,9 (C=O, β-laktam).

HR-MS za C₁₆H₁₅FN₂O₂ (M_r = 286,30090): izračunato m/z 287,1191 [M+H]⁺, nađeno m/z 287,1183 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Hypersil BDS, $t_{R(cis-3)}$ = 22,2 min, $t_{R(trans-3)}$ = 23,5 min.

3.3.2.2.2. *cis/trans*-3-Amino-4-(2*H*-1,3-benzodioksol-5-il)-1-(4-fluorfenil)azetidin-2-on **4**

Prema općem postupku, iz metil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata **2** (1,48 g, 6,395 mmol) i imina **1b** (1,56 g, 6,395 mmol) uz *in situ* generiran litijev diizopropilamin, priređen je β-laktam **4**. Za pripravu litijevog diizopropilamina korišten je diizopropilamin (998 μL, 7,051 mmol) i 2,5 mol L⁻¹ otopina *n*-butillitija u heksanu (2,8 mL, 7,051 mmol). Sirovi reakcijski produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens. Dobiveno je 1,34 g (69,8 %) smjese *cis*- i *trans*-izomera **4** u obliku bijelih kristalića. ¹H i ¹³C NMR analiza provedena je na *cis/trans*-smjesi. Da bi se odredila apsolutna konfiguracija *cis*-izomera, mala količina spoja **4** je odijeljena HPLC-om na koloni Chirallica PST-2 uz MeOH/H₂O (7:3, v/v). Dobiveno je 2 mg enantiomera *cis*-**4a** i 2 mg enantiomera *cis*-**4b**.

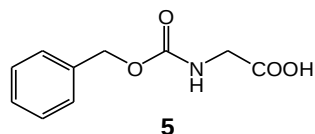
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3384, 3341, 3177, 2933, 2840, 1732, 1611, 1510, 1483, 1380, 1246, 1229, 1154, 1115, 1029, 965, 832, 793, 717.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 1,38 (s, 2H, NH₂, *cis* + *trans*); 4,03 (d, J = 2,2 Hz, 1 H, C3, β-laktam, *trans*); 4,58 (d, J = 5,5 Hz, 1 H, C3, β-laktam, *cis* + C4, β-laktam, *trans*); 5,15 (d, J = 5,5 Hz, 1 H, C4, β-laktam, *cis*); 5,96–5,99 (m, 2 H, CH₂, benzodioksol); 6,71–6,85 (m, 3 H, Ar-*H*, *cis* + *trans*); 6,96 (t, $J_{1,2}$ = 8.6 Hz, 2 H, Ar-*H*, *cis* + *trans*); 7,24–7,27 (m, 2 H, Ar-*H*, *trans*); 7,30–7,34 (m, 2 H, Ar-*H*, *cis*).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 62,3 (C3, β-laktam); 64,1 (C4, β-laktam); 101,6 (CH₂, benzodioksol); 107,2 (benzodioksol); 109,1 (benzodioksol); 116,0 (d, J = 22,7 Hz, 4-FC₆H₄); 118,9 (d, J = 7,9 Hz, 4-FC₆H₄), 119,9 (benzodioksol); 127,8 (benzodioksol); 133,6 (d, J = 2,8 Hz, 4-FC₆H₄); 148,2 (benzodioksol); 148,7 (benzodioksol); 159,3 (d, J = 244,3 Hz, 4-FC₆H₄); 167,8 (C=O, β-laktam).

HR-MS za C₁₆H₁₃FN₂O₃ (M_r = 300,28442): izračunato m/z 301,0983 [M+H]⁺, nađeno m/z 301,0977 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Hypersil BDS, $t_R(\text{cis-4})$ = 21,7 min, $t_R(\text{trans-4})$ = 22,9 min.

3.3.3. Stereoselektivna sinteza *trans*-3-amino- β -laktama3.3.3.1. Priprava *N*-benzoksikarbonilglicina **5**

Otopini glicina (5 g, 66,617 mmol) u 2 mol L⁻¹ otopini natrijevog hidroksida (100 mL) ohlađenoj na 0 °C dokapavan je benzoksikarbonil-klorid (10,3 mL, 73,268 mmol) tijekom 30 minuta. Reakcijska smjesa miješana je preko noći na 0 °C. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je ekstrahirana diklormetanom (3 x 40 mL) kako bi se uklonio neizreagirani dio reaktanta. Organski slojevi su odbačeni, a vodeni sloj je zakiseljen s 6 mol L⁻¹ otopinom HCl do pH = 1 i zatim ekstrahiran etil-acetatom (3 x 50 mL). Spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 9,7 g (70 %) produkta **5** u obliku bijelog praha.

$$t_f = 122\text{--}124\text{ }^{\circ}\text{C}$$

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3332, 3075, 3039, 2973, 2939, 1720, 1682, 1538.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 3,67 (d, 2H, $J = 6,14$ Hz, CH₂COOH); 5,04 (s, 2H, CH₂O); 7,29–7,37 (m, 5H, Ar-H); 7,57 (t, 1H, $J_1 = J_2 = 5,98$ Hz, CONH), 12,61 (m, 1H, COOH).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 43,22 (CH₂COOH); 67,84 (CH₂O); 128,94 (C₄, C₆H₅); 129,12 (C₂ i C₆, C₆H₅); 129,57 (C₃ i C₅, C₆H₅); 138,22 (C₁, C₆H₅); 159,21 (CONH), 173,74 (COOH).

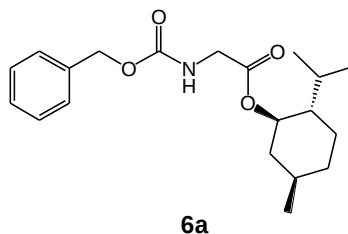
HR-MS za C₁₀H₁₁NO₄: ($M_r = 209,19864$): izračunato m/z 232,1 [M+Na]⁺, nađeno m/z 232,2 [M+Na]⁺.

3.3.3.2. Priprava mentilnih estera *N*-benzoksikarbonilglicina **6a,b**

Otopini *N*-benzoksikarbonilglicina **5** (1,0 ekv.) u suhom toluenu u atmosferi argona (60 mL) dodan je odgovarajući mentol (1,1 ekv.) i *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, 0,1 ekv.) u katalitičkoj količini. Reakcijska smjesa refluksirana je u Dean-Starkovim uvjetima tijekom 20 sati. Nakon hlađenja reakcijska smjesa je isprana s 5 %-tnom vodenom otopinom natrijevog karbonata (2 x 30 mL). Spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim natrijevim sulfatom,

profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat u omjeru 7:1.

3.3.3.2.1. (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-Mentilni ester *N*-benzoksikarbonilglicina **6a**



Prema općem postupku, iz *N*-benzoksikarbonilglicina **5** (4 g, 19,120 mmol), (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentola (3,29 g, 21,032 mmol) i monohidrata *p*-toluensulfonske kiseline (0,364 g, 1,912 mmol) u toluenu (60 mL), priređen je (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentilni ester *N*-benzoksikarbonilglicina **6a**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat (7:1). Dobiveno je 5,68 g (85,5 %) produkta **6a** u obliku svijetložutog ulja.

$R_f = 0,3$ (heksan/etil-acetat = 7:1).

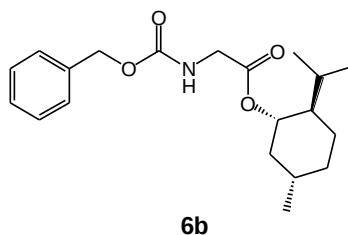
$[\alpha]_D = -46,21$ ($\gamma = 1,017 \text{ mg cm}^{-3}$, diklormetan)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3355, 3067, 3035, 2955, 2871, 1716, 1520.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,75 (d, 3H, $J = 6,90 \text{ Hz}$, CH_3); 0,89, 0,90 (2 x d, 6H, $J_1 = J_2 = 6,99 \text{ Hz}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0,96–1,10 (m, 3H, 2H, cikloheksil i 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 1,36–1,40 (m, 1H, cikloheksil); 1,44–1,52 (m, 1H, cikloheksil); 1,65–1,70 (m, 2H, cikloheksil); 1,79–1,85 (m, 1H, cikloheksil); 1,96–2,02 (m, 1H, cikloheksil); 3,96 (d, 2H, $J = 5,33 \text{ Hz}$, CH_2COO); 4,75 (td, 1H, $J_1 = J_2 = 4,34 \text{ Hz}$, $J_3 = 10,88 \text{ Hz}$, cikloheksil); 5,12 (s, 2H, CH_2O); 5,32 (bs, 1H, CONH); 7,35–7,40 (m, 5H, Ph).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 16,17 (CH_3); 20,51 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 21,77 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 23,42 (C3, cikloheksil); 26,12 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 31,20 (C5, cikloheksil); 33,95 (C6, cikloheksil); 40,59 (C4, cikloheksil); 42,78 (NHCH_2); 46,76 (C2, cikloheksil); 66,83 (CH_2O); 75,49 (C1, cikloheksil); 127,91 (C4, Ph); 127,97 (C2 i C6, Ph); 128,34 (C3 i C5, Ph); 136,16 (C1, Ph); 156,03 (COO); 169,35 (CONH).

HR-MS za $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ ($M_r = 347,44856$): izračunato m/z 370,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 370.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.3.3.2.2. (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-Mentilni ester *N*-benzoksikarbonilglicina **6b**

Prema općem postupku, iz *N*-benzoksikarbonilglicina **5** (4 g, 19,120 mmol), (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentola (3,29 g, 21,032 mmol) i monohidrata *p*-toluensulfonske kiseline (0,364 g, 1,91 mmol) u toluenu (60 mL), priređen je (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentilni ester *N*-benzoksikarbonilglicina **6b**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat (7:1). Dobiveno je 5,79 g (87,2 %) produkta **6b** u obliku svijetložutog ulja.

$R_f = 0,3$ (heksan/etil-acetat = 7:1).

$[\alpha]_D = +43,78$ ($\gamma = 1,000 \text{ mg cm}^{-3}$, metanol)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3348, 2954, 2870, 1728, 1523, 1456, 1388, 1370, 1205, 1053, 984.

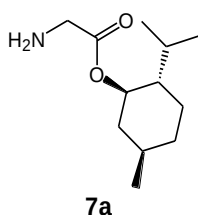
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,75 (d, 3H, $J = 6,92 \text{ Hz}$, CH_3); 0,89, 0,90 (2 x d, 6H, $J_1 = 6,90 \text{ Hz}$, $J_2 = 7,19 \text{ Hz}$ (CH_3) $_2\text{CH}$); 0,96–1,10 (m, 3H, 2H, cikloheksil i 1H, (CH_3) $_2\text{CH}$); 1,36–1,40 (m, 1H, cikloheksil); 1,44–1,52 (m, 1H, cikloheksil); 1,65–1,70 (m, 2H, cikloheksil); 1,79–1,85 (m, 1H, cikloheksil); 1,96–2,02 (m, 1H, cikloheksil); 3,96 (d, 2H, $J = 5,31 \text{ Hz}$, CH_2COO); 4,75 (td, 1H, $J_1 = J_2 = 4,38 \text{ Hz}$, $J_3 = 10,89 \text{ Hz}$, cikloheksil); 5,12 (s, 2H, CH_2O); 5,32 (bs, 1H, CONH); 7,35–7,40 (m, 5H, Ph).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 16,31 (CH_3); 20,65 (CH_3) $_2\text{CH}$; 21,91 (CH_3) $_2\text{CH}$; 23,42 (C3, cikloheksil); 26,27 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 31,35 (C5, cikloheksil); 34,09 (C6, cikloheksil); 40,74 (C4, cikloheksil); 42,93 (NHCH_2); 46,90 (C2, cikloheksil); 67,00 (CH_2O); 75,68 (C1, cikloheksil); 128,06 (C4, Ph); 128,13 (C2 i C6, Ph); 128,49 (C3 i C5, Ph); 136,28 (C1, Ph); 156,14 (COO); 169,47 (CONH).

HR-MS za $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ ($M_r = 347,44856$): izračunato m/z 370,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 370,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.3.3.3. Priprava mentilnih estera glicina **7a,b**

Otopini odgovarajućeg estera *N*-benzoksikarbonilglicina (1,0 ekv.) u metanolu dodan je 10 %-tni Pd/C (10 % mase reaktanta). Reakcijska smjesa miješana je 24 sata pri sobnoj temperaturi u atmosferi vodika, potom je katalizator odfiltriran, a filtrat uparen na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/trietilamin u omjeru 50:1.

3.3.3.3.1. (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-Mentilni ester glicina **7a**

Prema općem postupku, iz (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentilnog estera *N*-benzoksikarbonilglicina **6a** (5,59 g, 16,089 mmol) u prisustvu 10 % Pd/C (55,9 mg) kao katalizatora u metanolu (100 mL) u atmosferi vodika, priređen je (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentilni ester glicina **7a**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/trietilamin u omjeru 50:1. Dobiveno je 2,77 g (80,8 %) produkta **7a** u obliku svijetložutog ulja.

$R_f = 0,33$ (etil-acetat)

$[\alpha]_D = -76,75$ ($\gamma = 1,007 \text{ mg cm}^{-3}$, diklormetan)

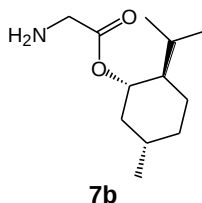
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3388, 2955, 2869, 1733, 1456, 1112, 983.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,76 (d, 3H, $J = 6,96 \text{ Hz}$, CH_3); 0,90; 0,93 (2 x d, 6H, $J_1 = 4,18 \text{ Hz}$, $J_2 = 4,59 \text{ Hz}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 0,94–1,12 (m, 3H, 2H, cikloheksil i 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,34–1,50 (m, 2H, cikloheksil); 1,64–1,72 (m, 2H, cikloheksil); 1,80–1,84 (m, 1H, cikloheksil); 1,86 (s, 2H, H_2NCH_2); 1,96–2,02 (m, 1H, cikloheksil); 3,41 (s, 2H, H_2NCH_2); 4,74 (td, $J_1 = J_2 = 4,35 \text{ Hz}$, $J_3 = 10,88 \text{ Hz}$, cikloheksil).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 16.40 (CH_3); 20.77; 22.03 (2C, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 23.48 (C3, cikloheksil); 26.34 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 31.44 (C5, cikloheksil); 34.18 (C6, cikloheksil); 40.83 (C4, cikloheksil); 43.01 (H_2NCH_2); 46.98 (C2, cikloheksil); 74.78 (C1, cikloheksil); 173,77 (COO).

HR-MS za $C_{12}H_{23}NO_2$ ($M_r = 213,31652$): izračunato m/z 236,2 $[M+Na]^+$, nađeno m/z 236,4 $[M+Na]^+$.

3.3.3.3.2. (1S,2R,5S)-(+)-Mentilni ester glicina **7b**



Prema općem postupku, iz (1S,2R,5S)-(+)-mentilnog estera *N*-benzoksikarbonilglicina **6b** (5,76 g, 16,578 mmol) u prisustvu 10 % Pd/C (57,6 mg) kao katalizatora u metanolu (100 mL) u atmosferi vodika, priređen je (1S,2R,5S)-(+)-mentilni ester glicina **7b**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala etil-acetat/trietilamin u omjeru 50:1. Dobiveno je 3,00 g (84,7 %) produkta **7b** u obliku svijetložutog ulja.

$R_f = 0,33$ (etil-acetat)

$[\alpha]_D = +77,81$ ($\gamma = 1,000 \text{ mg cm}^{-3}$, metanol)

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3388, 2955, 2869, 1733, 1456, 1112, 983.

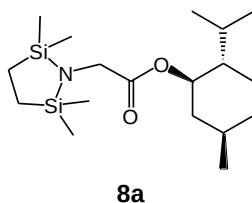
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,76 (d, 3H, $J = 6,96 \text{ Hz}$, CH_3); 0,89; 0,91 (2 x d, 6H, $J_1 = 4,18 \text{ Hz}$, $J_2 = 4,59 \text{ Hz}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 0,94–1,14 (m, 3H, 2H, cikloheksil i 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,30–1,55 (m, 2H, cikloheksil); 1,61 (bs, 2H, H_2NCH_2); 1,64–1,74 (m, 2H, cikloheksil); 1,76–1,90 (m, 1H, cikloheksil); 1,94–2,05 (m, 1H, cikloheksil); 3,41 (s, 2H, H_2NCH_2); 4,71 (td, $J_1 = J_2 = 4,33 \text{ Hz}$, $J_3 = 10,89 \text{ Hz}$, cikloheksil).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 16.40 (CH_3); 20.77; 22.03 (2C, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 23.48 (C3, cikloheksil); 26.34 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 31.44 (C5, cikloheksil); 34.18 (C6, cikloheksil); 40.83 (C4, cikloheksil); 43.01 (H_2NCH_2); 46.98 (C2, cikloheksil); 74.78 (C1, cikloheksil); 173,77 (COO).

HR-MS za $C_{12}H_{23}NO_2$ ($M_r = 213,31652$): izračunato m/z 236,2 $[M+Na]^+$, nađeno m/z 236,4 $[M+Na]^+$.

3.3.3.4. Priprava mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata **8a,b**

Otopini odgovarajućeg estera glicina (1,0 ekv.) u diklormetanu dodan je bezvodni trietilamin (3,4 ekv.) uz snažno miješanje reakcijske smjese. Nastala smjesa miješana je 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim je polagano dodana otopina 2,5-diklor-2,5-dimetil-2,5-disilaheksana (1,16 ekv.) u bezvodnom diklormetanu (20 mL). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Nakon 20 sati miješanja, reakcija je prekinuta ulijevanjem reakcijske smjese u zasićenu otopinu natrijevog karbonata (50 mL). Dobivena smjesa ekstrahirana je diklormetanom (2 x 50 mL), a spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi reakcijski produkt izravno je korišten u sljedećem reakcijskom koraku.

3.3.3.4.1. (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-Mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetat **8a**

Prema općem postupku, iz (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentilnog estera glicina **7a** (555 mg, 2,602 mmol), 2,5-diklor-2,5-dimetil-2,5-disilaheksana (649,7 mg, 3,018 mmol) i trietilamina (1,23 mL, 8,847 mmol) u bezvodnom diklormetanu, priređen je (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetat **8a**. Dobiveno je 899 mg (97,1 %) produkta **8a** u obliku žutog ulja.

$$[\alpha]_D = -42,27 \ (\gamma = 0,9952 \text{ mg cm}^{-3}, \text{ diklormetan})$$

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3370, 2958, 1737, 1458, 1406, 1371, 1252, 1133, 1047, 786.

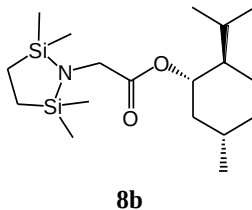
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,00 (s, 12H, 4 x CH_3Si); 0,68 (s, 4H, 2 x CH_2Si); 0,70 (d, 3H, $J = 6,96$ Hz, CH_3 , cikloheksil); 0,83; 0,86 (2 x d, 6H, $J_1 = J_2 = 2,03$ Hz, CH_3) $_2\text{CH}$); 0,89–1,02 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,27–1,44 (m, 2H, cikloheksil); 1,58–1,64 (m, 2H, cikloheksil); 1,79–1,84 (m, 1H, cikloheksil); 1,88–1,94 (m, 1H, cikloheksil); 3,43 (s, 2H, CH_2COO); 4,64 (td, 1H, $J_1 = 4,37$ Hz, $J_2 = 5,46$ Hz, $J_3 = 10,87$ Hz, cikloheksil).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : –0,82; –0,80 (4C, 4 x (CH_3Si)); 7,84 (2C, 2 x CH_2Si); 16,11 (CH_3); 20,62; 21,89 (2C, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 23,22 (C3, cikloheksil); 26,00 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 31,26

(C5, cikloheksil); 34,13 (C6, cikloheksil); 40,77 (C4, cikloheksil); 44,32 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COO}$), 46,94 (C2, cikloheksil); 73,94 (C1, cikloheksil); 173,94 (COO).

HR-MS za $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_2\text{Si}_2$ ($M_r = 355,66288$): izračunato m/z 356,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 356,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.3.3.4.2. (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-Mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetat **8b**



Prema općem postupku, iz (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentilnog estera glicina **7b** (555 mg, 2,602 mmol), 2,5-diklor-2,5-dimetil-2,5-disilaheksana (649,7 mg, 3,018 mmol) i trietilamina (1,23 mL, 8,847 mmol) u bezvodnom diklormetanu, priređen je (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentil-2-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetat **8b**. Dobiveno je 893 mg (96,5 %) produkta **8b** u obliku žutog ulja.

$[\alpha]_D = +43,87$ ($\gamma = 1,000 \text{ mg cm}^{-3}$; diklormetan)

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3370, 2958, 1737, 1458, 1406, 1371, 1252, 1133, 1047, 786.

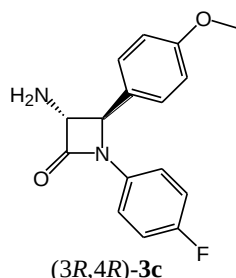
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,00 (s, 12H, 4 x CH_3Si); 0,71 (s, 4H, 2 x CH_2Si); 0,73 (d, 3H, $J = 3,48 \text{ Hz}$, CH_3 , cikloheksil); 0,86; 0,88 (2 x d, 6H, $J_1 = J_2 = 2,14 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 0,90–1,08 (m, 1H, ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$); 1,29–1,46 (m, 2H, cikloheksil); 1,61–1,67 (m, 2H, cikloheksil); 1,81–1,86 (m, 1H, cikloheksil); 1,92–1,96 (m, 1H, cikloheksil); 3,46 (s, 2H, CH_2COO); 4,65 (td, 1H, $J_1 = 4,28 \text{ Hz}$, $J_2 = 5,46 \text{ Hz}$, $J_3 = 10,84 \text{ Hz}$, cikloheksil).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : –0,82; –0,80 (4C, 4 x (CH_3Si); 7,84 (2C, 2 x CH_2Si); 16,11 (CH_3); 20,62; 21,89 (2C, ($\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{CH}$); 23,22 (C3, cikloheksil), 26,00 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$); 31,26 (C5, cikloheksil); 34,13 (C6, cikloheksil); 40,77 (C4, cikloheksil); 44,32 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COO}$), 46,94 (C2, cikloheksil); 73,94 (C1, cikloheksil); 173,22 (COO).

HR-MS za $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_2\text{Si}_2$ ($M_r = 355,66288$): izračunato m/z 356,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 356,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.3.3.5. Priprava *trans*-3-amino- β -laktama **3c,d**

Otopini diizopropilamina (8,25 mmol) u bezvodnom tetrahidrofuranu dokapana je 2,5 M otopina *n*-butilitija u heksanu (8,25 mmol) pri 0 °C. Reakcijska smjesa miješana je 30 min na 0 °C, a zatim je ohlađena na –78 °C u aceton/suhi led kupelji. Ohlađenoj smjesi polako je dokapan odgovarajući mentilni ester *N,N*-bis(silil)glicina u bezvodnom tetrahidrofuranu. Dobivena smjesa miješala se 30 minuta nakon čega je polako dokapana otopina odgovarajućeg imina u bezvodnom tetrahidrofuranu. Reakcija se odvijala 2 sata pri –78 °C, a zatim je temperatura polako podignuta do sobne temperature i reakcija je ostavljena preko noći uz miješanje. Reakcijska smjesa je nakon završetka reakcije izlivena u vodu i led te ekstrahirana s etil-acetatom (3 x 40 mL). Spojeni organski slojevi ekstrahirani su s 0,1 mol dm⁻³ vodenom otopinom HCl (3 x 50 mL). Dobiveni vodeni slojevi zaluženi su do pH = 11 s 2 mol dm⁻³ vodenom otopinom natrijevog hidroksida i potom ekstrahirani s etil-acetatom. Spojeni organski slojevi su osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi produkt očišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens.

3.3.3.5.1. (3*R*,4*R*)-3-Amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on **3c**

Prema općem postupku, iz (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentil-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata **8a** (2,56 g, 7,197 mmol) i imina **1a** (1,65 g, 7,197 mmol) uz *in situ* generiran litijev diizopropilamin, priređen je β -laktam **3c**. Za pripravu litijevog diizopropilamina korišten je diizopropilamin (1,1 mL, 7,917 mmol) i 2,5 mol dm⁻³ otopina *n*-butilitija u heksanu (3,2 mL, 7,917 mmol). Sirovi reakcijski produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens. Nakon uparavanja sakupljenih frakcija dobiveno je 1,09 g (52,9 %) produkta **3c** u obliku bijelih kristalića.

$$t_t = 78\text{--}79\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$[\alpha]_D^{20} = -20$ ($\gamma = 10 \text{ mol dm}^{-3}$; etil-acetat)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2959, 2930, 1734, 1609, 1508, 1388, 1246, 1027, 835.

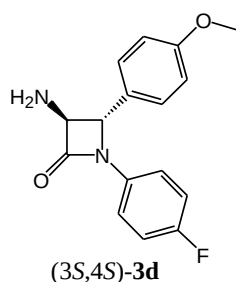
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,28 (bs, 2H, NH_2); 3,81 (s, 3H, OCH_3); 4,05 (d, $J = 1,9 \text{ Hz}$, 1H, C3, β -laktam); 4,58 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, C4, β -laktam); 6,89–6,99 (m, 4H, Ar-H), 7,23–7,27 (m, 4H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,45 (OCH_3); 62,00 (C3, β -laktam); 64,00 (C4, β -laktam); 114,8 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,0 (d, $J = 22,8 \text{ Hz}$, 4- FC_6H_4); 118,9 (d, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 4- FC_6H_4); 125,7 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,3 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,8 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 4- FC_6H_4); 159,2 (d, $J = 243,9 \text{ Hz}$, 4- FC_6H_4); 160,04 (4- FC_6H_4); 167,9 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2$ ($M_r = 286,30090$): izračunato m/z 287,1190 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 287,1199 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Hypersil BDS, $t_{\text{R}}(\text{trans-3c}) = 23,5 \text{ min}$.

3.3.3.5.2. (3*S*,4*S*)-3-Amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on **3d**



Prema općem postupku, iz (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentil-(2,2,5,5-tetrametil-1-aza-2,5-disilolidin-1-il)acetata **8b** (2,56 g, 7,197 mmol) i imina **1a** (1,65 g, 7,197 mmol) uz *in situ* generiran litijev diizopropilamin, priređen je β -laktam **3d**. Za pripravu litijevog diizopropilamina korišten je diizopropilamin (1,1 mL, 7,917 mmol) i 2,5 otopina *n*-butilitija u heksanu (3,2 mL, 7,197 mmol). Sirovi reakcijski produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens. Nakon uparavanja sakupljenih frakcija dobiveno je 1,26 g (61,2 %) produkta **3d** u obliku bijelih kristalića.

$t_f = 78\text{--}79 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = +20$ ($\gamma = 10 \text{ mg cm}^{-3}$; etil-acetat)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2959, 2930, 1734, 1609, 1508, 1388, 1246, 1027, 835.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,28 (bs, 2H, NH_2); 3,81 (s, 3H, OCH_3); 4,05 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, C3, β -laktam); 4,58 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, C4, β -laktam); 6,89–6,99 (m, 4H, Ar-H), 7,23–7,27 (m, 4H, Ar-H).

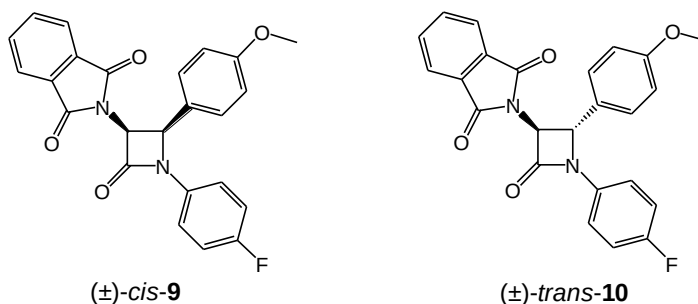
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,45 (OCH_3); 62,00 (C3, β -laktam); 64,00 (C4, β -laktam); 114,8 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,0 (d, $J = 22,8$ Hz, 4- FC_6H_4); 118,9 (d, $J = 8,2$ Hz, 4- FC_6H_4); 125,7 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,3 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,8 (d, $J = 2,2$ Hz, 4- FC_6H_4); 159,2 (d, $J = 243,9$ Hz, 4- FC_6H_4); 160,04 (4- FC_6H_4); 167,9 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2$ ($M_r = 286,30090$): izračunato m/z 287,1190 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 287,1199 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Hypersil BDS, Thermo Scientific, 5 μm , 250 x 4,6 mm; $t_{\text{R}}(\text{trans-3d}) = 23,5$ min.

3.3.4. Priprava ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama **3e**

3.3.4.1. Priprava ($\pm$)-*cis*/*trans*-2-[1-(4-fluorfenil)-2-(4-metoksifenil)-4-oksoazetidin-3-il]-2,3-dihidro-1*H*-izoindol-1,3-diona **9** i **10**



U suspenziju *N*-ftalimidioctene kiseline (4,03 g, 19,629 mmol) u bezvodnom diklormetanu (150 mL), ohlađenoj na 0 °C, dodan je 2-klor-1-metilpiridinijev jodid (6,69 g, 39,258 mmol), a potom trietilamin (10,9 mL, 78,516 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 2 sata na 0 °C, nakon čega je dokapana otopina imina (3 g, 13,086 mmol) u bezvodnom diklormetanu (25 mL). Smjesa je miješana 5 min na 0 °C, a potom je miješanje nastavljeno 2 sata na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je potom refluksirana 20 sati. Tijek reakcije praćen je TLC-om i HPLC-om. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa ekstrahirana je zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata (150 mL), zasićenom otopinom natrijeva klorida (150 mL) i zatim deioniziranom vodom (150 mL). Organski sloj osušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. ^1H i ^{13}C NMR analiza provedena je na *cis*/*trans*-smjesi. U sirovoj smjesi omjer *cis*- i *trans*-izomera je 1:4. Sirova smjesa pročišćena je na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/diklormetan/etil-

acetat u omjeru 7:1:1. Dobiveno je 4,1 g (75,2 %) *trans*-izomera **10** i 600 mg (11,0 %) *cis*-izomera **9**. $R_f(\textit{cis-9}) = 0,59$; $R_f(\textit{trans-10}) = 0,71$ (heksan/diklormetan/etilacetat = 7:1:1)

(±)-*cis* **9**

$t_t = 194,1\text{--}198,8\text{ }^\circ\text{C}$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2895, 1781, 1756, 1721, 1611, 1510, 1467, 1442, 1385, 1254, 1175, 1115, 1053, 956, 832, 814, 750, 716.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,66 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 5,42 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, C3 β -laktam); 5,65 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, C4 β -laktam); 6,72 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,02 (t, $J = 8,7$ Hz, 2H, 4- FC_6H_4); 7,17 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 7,38–7,48 (m, 2H, 4- FC_6H_4); 7,61–7,77 (m, 4H, ftalimido).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,28 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 59,26 (C3 β -laktam); 60,96 (C4 β -laktam); 114,16 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,14 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 118,98 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 123,39 (ftalimido); 127,38 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,66 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 131,33 (ftalimido); 133,79 (d, $J = 2,6$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 134,43 (ftalimido); 159,52 (d, $J = 244,2$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 159,75 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 161,15 (2 x C=O, ftalimido); 166,84 (C=O, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_4$ ($M_r = 416,1172$): izračunato m/z 417,1251 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 417,1255 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: LiChrospher 10 CN, $t_{R(9)} = 10,787$ min, *Površina* = 98,67 %.

(±)-*trans* **10**

$t_t = 197,3\text{--}198,8\text{ }^\circ\text{C}$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3007, 2932, 2836, 1778, 1754, 1713, 1612, 1507, 1467, 1369, 1311, 1253, 1229, 1180, 1148, 1120, 1105, 1034, 970, 941, 833, 717, 530.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,81 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 5,28 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, C3 β -laktam); 5,31 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, C4 β -laktam); 6,88–7,01 (m, 4H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,27–7,36 (m, 4H, 4- FC_6H_4); 7,73–7,80 (m, 2H, ftalimido); 7,84–7,91 (m, 2H, ftalimido).

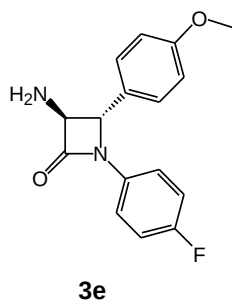
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,49 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 61,32 (C3 β -laktam); 63,12 (C4 β -laktam); 115,01 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,05 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,31 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 123,96 (ftalimido); 127,44 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,70 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 131,82 (ftalimido); 133,55 (d, $J = 2,8$ Hz, C1,

4-FC₆H₄); 134,73 (ftalimido); 159,54 (d, $J = 244,1$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 161,16 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 162,12 (2 x C=O, ftalimido); 166,95 (C=O, β -laktam).

HR-MS za C₂₄H₁₇FN₂O₄ ($M_r = 416,1172$): izračunato m/z 417,1251 [M+H]⁺, nađeno m/z 417,1248 [M+H]⁺.

RP-HPLC: LiChrospher 10 CN, $t_{R(10)} = 11,613$ min, *Površina* = 99,40 %.

3.3.4.2. Priprava ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e**



U suspenziju *trans*-3-ftalimido- β -laktama **10** (3,78 g, 9,078 mmol) u bezvodnom etanolu (100 mL) dodan je etilendiamin (1,21 mL, 18,156 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 1 sat na 65 °C. Tijek reakcije praćen je TLC-om i HPLC-om. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa uparena je do suha na rotacijskom vakuurom uparivaču. Ostatak nakon uparavanja, otopljen je u etil-acetatu (200 mL), ispran zasićenom otopinom natrijeva klorida (100 mL), a potom vodom (100 mL). Organski sloj osušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen do suha na rotacijskom vakuurom uparivaču. Sirova smjesa pročišćena je na stupcu silikagela uz etil-acetat kao eluens. Dobiveno je 1,73 g (66,5 %) produkta **3e** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,39$ (etil-acetat)

$$t_f = 98,7\text{--}101,2\text{ }^\circ\text{C}$$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3384, 3341, 3177, 2933, 2840, 1732, 1611, 1510, 1483, 1380, 1246, 1229, 1154, 1115, 1029, 965, 832, 793, 717.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 1,82 (bs, 2H, NH₂); 3,80 (s, 3H, OCH₃, 4-CH₃OC₆H₄); 4,04 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, C3 β -laktam), 4,60 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, C4 β -laktam); 6,85–6,98 (m, 4H, 4-CH₃OC₆H₄), 7,20–7,32 (m, 4H, 4-FC₆H₄).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 55,45 (OCH₃, 4-CH₃OC₆H₄); 66,58 (C3 β -laktam); 70,21 (C4 β -laktam); 114,73 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,97 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 118,96 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 127,33 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 128,55

(C1, 4-CH₃OC₆H₄); 133,77 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 159,23 (d, $J = 244,1$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 160,03 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 168,01 (C=O, β -laktam).

HR-MS za C₁₆H₁₅FN₂O₂ ($M_r = 286,30090$); izračunato m/z 287,1191 [M+H]⁺, nađeno m/z 287,1183 [M+H]⁺.

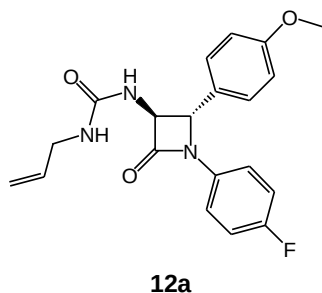
RP-HPLC: LiChrospher CN, $t_{R(3e)} = 6,727$ min, *Površina* = 100 %.

NP-HPLC: Chiralpak AD-3, $t_{R1} = 5,484$ min, $t_{R2} = 7,801$ min.

3.4. Priprava ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

Otopini ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama **3e** (1,0 ekv.) u acetonitrilu (5 mL) dodan je odgovarajući izocijanat **11a-v** (1,5 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je 20 sati na sobnoj temperaturi, nakon čega je acetonitril uparen do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi reakcijski produkt pročišćen je na koloni silikagela uz smjesu otapala kloroforma i etil-acetata u omjeru 2:1 ili 4:1. Produkt dobiven nakon kromatografije trituiran je s heksanom.

3.4.1. *N*-Alil-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12a**



Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i alil-izocijanata **11a** (23,2 μ L, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12a**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 57,7 mg (89,3 %) produkta **12a** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,22$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 86,1\text{--}88,5\text{ }^{\circ}\text{C}$$

FTIR-ATR ν/cm^{-1} : 3346, 2933, 2838, 1745, 1636, 1612, 1560, 1507, 1426, 1288, 1247, 1224, 1175, 1137, 1102, 923, 830.

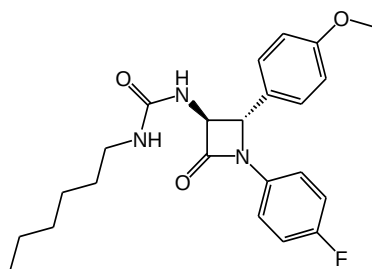
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,64–3,77 (m, 3H, CH_2 , CH_2NH); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 4,41 (dd, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H, C3, β -laktam); 4,99 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, C4, β -laktam); 5,04 (dd, $J_1 = 10,3$ Hz, $J_2 = 0,6$ Hz, 1H, CH, $\text{CH}_2=\text{CH}$); 5,13 (dd, $J_1 = 17,2$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H, CH, $\text{CH}_2=\text{CH}$); 5,52 (t, $J_1 = J_2 = 5,8$ Hz, 1H, NH -alil); 5,77 (ddt, $J_1 = 17,1$ Hz, $J_2 = 10,5$ Hz, $J_3 = 5,4$ Hz, 1H, CH, alil); 6,19 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, NH -C3 β -laktam); 6,84–6,91 (m, 4H, Ar-H); 7,16–7,24 (m, 4H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 42,85 (CH_2NH , C1, alil); 55,43 (CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,88 (C3, β -laktam); 67,19 (C4, β -laktam); 114,73 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,80 ($\text{CH}_2=\text{CH}$, C3, alil); 115,96 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,24 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 127,57 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,20 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,57 (d, $J = 2,6$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 135,17 ($\text{CH}_2=\text{CH}$, C2, alil); 157,58 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,38 (d, $J = 244,0$ Hz, C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 160,05 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,49 ($\text{C}=\text{O}$).

HR-MS za $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 369,1489$): izračunato m/z 370,1567 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 370,1579 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12a)} = 4,6$ min, *Površina* = 99,9 %.

3.4.2. *N*-Heksil-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12b**



12b

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i heksil-izocijanata **11b** (38,2 μL , 0,263 mmol) u bezvodnom acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12b**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 64,3 mg (88,8 %) produkta **12b** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,32$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_t = 58,3\text{--}62,4\text{ }^{\circ}\text{C}$$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3352, 2956, 2929, 2858, 1748, 1639, 1563, 1507, 1386, 1247, 1226, 1175, 1136, 1031, 830.

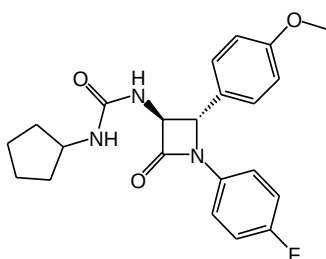
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,82-0,92 (m, 3H, CH_3 , *n*-heksil); 1,21-1,34 (m, 6H, 3 x CH_2 , *n*-heksil); 1,36-1,52 (m, 2H, CH_2 , *n*-heksil); 2,98-3,22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$, *n*-heksil); 3,79 (s, 3H, OCH_3); 4,41 (dd, $J_1 = 6,6\text{ Hz}$, $J_2 = 2,2\text{ Hz}$, 1H, C3, β -laktam); 5,02 (d, $J = 2,1\text{ Hz}$, 1H, C4, β -laktam); 5,14 (t, $J_1 = J_2 = 5,5\text{ Hz}$, 1H, NH-CH_2); 5,87 (d, $J = 6,6\text{ Hz}$, 1H, NH-C_3 β -laktam); 6,82-6,96 (m, 4H, Ar-H); 7,15-7,30 (m, 4H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 14,16 (C6, *n*-heksil); 22,72 (C5, *n*-heksil); 26,72 (C4, *n*-heksil); 30,19 (C3, *n*-heksil); 31,66 (C2, *n*-heksil); 40,67 (C1, *n*-heksil); 55,45 (CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,99 (C3, β -laktam); 67,33 (C4, β -laktam); 114,73 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,96 (d, $J = 22,7\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,23 (d, $J = 7,9\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 127,58 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,25 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,61 (d, $J = 2,7\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 157,48 (NHC(=O)NH); 159,39 (d, $J = 244,0\text{ Hz}$, C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 160,04 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,39 (C=O).

HR-MS za $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 413,2115$): izračunato m/z 414,2193 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 414,2158 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12b)} = 6,5\text{ min}$, *Površina* = 99,8 %.

3.4.3. *N*-Ciklopentil-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12c**



12c

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i ciklopentil-izocijanata **11c** (29,6 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12c**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom

uparivaču. Dobiveno je 59,5 mg (85,5 %) produkta **12c** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,30$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 138,7\text{--}143,7\text{ }^\circ\text{C}$$

FTIR-ATR $\hat{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3342, 2959, 1747, 1633, 1556, 1509, 1385, 1289, 1250, 1226, 1175, 1131, 1101, 1031, 830.

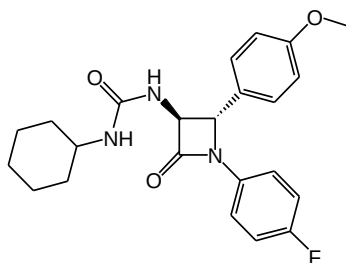
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,20–1,43 (m, 2H, CH_2 , ciklopentil); 1,44–1,76 (m, 4H, 2 x CH_2 , ciklopentil); 1,79–1,99 (m, 2H, CH_2 , ciklopentil); 3,72 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 3,97 (s, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH, ciklopentil); 4,43 (dd, 1H, $J_1 = 6,5$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, C3 β -laktam); 4,92 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, C4 β -laktam); 5,09 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, NH- β -laktam); 5,74 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, NH-ciklopentil), 6,79–6,97 (m, 4H, Ar-H), 7,14–7,31 (m, 4H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 23,69 (C3 i C4, ciklopentil); 33,50 (C2 i C5, ciklopentil); 52,24 (C1, ciklopentil); 55,46 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 64,04 (C3 β -laktam); 67,30 (C4, β -laktam); 114,72 (C3 i C5, $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 116,01 (d, $J = 22,7$ Hz, 4- FC_6H_4); 119,21 (d, $J = 7,9$ Hz, 4- FC_6H_4); 127,59 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,23 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,62 (d, $J = 2,8$ Hz, 4- FC_6H_4); 157,07 (NHCONH); 159,38 (d, $J = 244,0$ Hz, 4- FC_6H_4); 160,03 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,17 (C=O , β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 397,1802$): izračunato m/z 398,1880 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 398,1871 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12c)} = 5,5$ min, *Površina* = 99,9 %.

3.4.4. *N*-Cikloheksil-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12d**



12d

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i cikloheksil-izocijanata **11d** (33,6 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12d**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom

na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 60,5 mg (84,0 %) produkta **12d** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,40$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 127,8\text{--}129,4\text{ }^{\circ}\text{C}$$

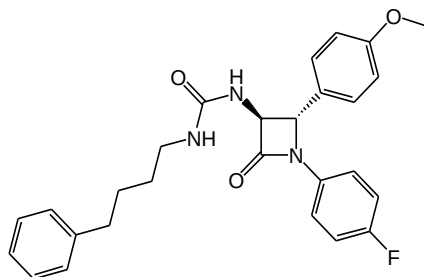
FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3327, 2929, 2853, 1751, 1636, 1560, 1508, 1450, 1304, 1248, 1225, 1175, 1136, 1100, 1031, 830.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 0,99–1,20 (m, 2H, CH_2 , cikloheksil); 1,20–1,39 (m, 2H, CH_2 , cikloheksil); 1,47–1,76 (m, 2H, CH_2 , cikloheksil); 1,80–2,00 (m, 2H, CH_2 , cikloheksil); 3,40–3,61 (m, 1H, CH, cikloheksil); 3,79 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,41 (dd, 1H, $J_1 = 6,4\text{ Hz}$, $J_2 = 2,1\text{ Hz}$, C3 β -laktam); 5,01 (d, $J = 2,2\text{ Hz}$, 1H, C4 β -laktam); 5,0 (t, 1H, NH) 5,76 (d; $J = 6,4\text{ Hz}$, 1H, $\text{NHC}(=\text{O})\text{-C3 } \beta\text{-laktam}$), 6,82–6,96 (m, 4H, Ar-H), 7,19–7,31 (m, 4H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 25,01; 25,04 (C3 i C5, cikloheksil); 25,65 (C4, cikloheksil); 33,75; 33,90 (C2 i C6, cikloheksil); 49,27 (C1, cikloheksil); 55,45 (CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 64,02 (C3 β -laktam); 67,36 (C4 β -laktam); 114,72 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,96 (d, $J = 22,7\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,23 (d, $J = 7,9\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 127,58 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,28 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,64 (d, $J = 2,7\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 156,67 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 160,03 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 159,39 (d, $J = 244,0\text{ Hz}$, C4, 4- FC_6H_4); 166,20 (C=O).

HR-MS za $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 411,1958$): izračunato m/z 412,204 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 412,2007 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12d)} = 5,9\text{ min}$, *Površina* = 99,8 %.

3.4.5. *N*-(4-Fenilbutil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12e****12e**

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 4-fenilbutil-izocijanata **11e** (45 µL, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β-laktamska urea **12e**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 63,7 mg (78,8 %) produkta **12e** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,33$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 86,7\text{--}87,1\text{ }^\circ\text{C}$$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3349, 3026, 2932, 2858, 1750, 1634, 1562, 1508, 1426, 1387, 1250, 1228, 1175, 1140, 1102, 1031, 831, 749.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,40–1,3 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$, C2 4-fenilbutil); 1,53–1,66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Ph}$, C3 4-fenilbutil); 2,58 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, C4 4-fenilbutil); 2,99–3,23 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$, C1 4-fenilbutil); 3,78 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,38 (dd, 1H, $J_1 = 6,7$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, C3 β-laktam); 4,99 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, C4 β-laktam); 5,17 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH-CH_2); 5,86 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, $\text{NH-}\beta$ -laktam); 6,82–6,92 (m, 4H, Ar-H); 7,10–7,29 (m, 9H, Ar-H).

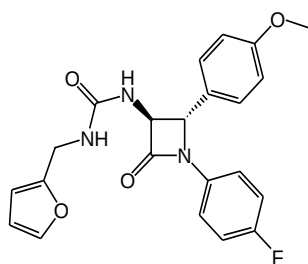
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 28,79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Ph}$, C3 4-fenilbutil); 29,86 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$, C2 4-Phbutil); 35,65 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$, C4 4-fenilbutil); 40,39 ($\text{CH}_2\text{-NH}$, C1 4-fenilbutil); 55,45 (CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,96 (C3 β-laktam); 67,29 (C4 β-laktam); 114,73 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,97 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,22 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 125,92 (C8 4-fenilbutil); 127,57 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,20 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,46; 128,52 (C6 i C10, 4-fenilbutil); 128,52 (C7 i C9, 4-fenilbutil); 133,58

(d; $J = 2,7$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 142,34 (C5 4-fenilbutil); 157,47 (NHC(=O)NH); 159,39 (d, $J = 244,1$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 160,04 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 166,42 (C=O, β-laktam).

HR-MS za C₂₇H₂₈FN₃O₃ ($M_r = 461,2115$): izračunato m/z 462,2193 [M+H]⁺, nađeno m/z 462,2175 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12f)} = 6,9$ min, $Površina = 99,7$ %.

3.4.6. *N-Furfuril-N'-[(±)-trans-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12f*



12f

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i furfural-izocijanata **11f** (28,2 μL, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β-laktamska urea **12f**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 64,4 mg (89,9 %) produkta **12f** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,22$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 188,8\text{--}189,9$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3333, 1732, 1650, 1611, 1556, 1508, 1427, 1388, 1426, 1247, 1218, 1176, 1146, 1104, 1076, 1028, 1010, 833, 743.

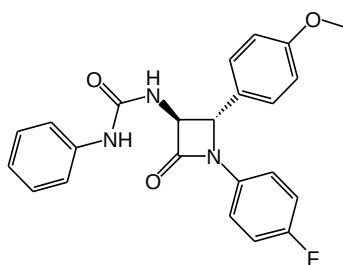
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 3,79 (s, 3H, OCH₃, 4-OCH₃C₆H₃); 4,17–4,36 (m, 2H, CH₂, C1 furfural); 4,38 (dd; $J_1 = 6,7$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H, C3, β-laktam); 4,99 (d; $J = 2,2$ Hz, 1H, C4, β-laktam); 5,66 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, NH-furfural); 6,06 (d; $J = 6,7$ Hz, 1H, NH-C3 β-laktam); 6,16 (d; $J = 3,1$ Hz, 1H, Ar-H, C3 furfural); 6,26 (dd; $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H, Ar-H, C4 furfural); 6,80–6,95 (m, 4H, Ar-H); 7,14–7,24 (m, 4H, Ar-H); 7,25–7,30 (m, 1H, Ar-H, C5 furfural).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 37,38 (CH_2 , C1, furfural); 55,45 (OCH_3 , 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 63,87 (C3, β -laktam); 67,14 (C4, β -laktam); 107,16 (C3, furfural); 110,54 (C4, furfural); 114,72 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,98 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,26 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 127,60 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,11 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,52 (d, $J = 2,6$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 142,12 (C5, furfural); 152,27 (C2, furfural); 157,21 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,40 (d, $J = 244,1$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,06 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,26 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ ($M_r = 409,1438$): izračunato m/z 410,1516 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 410,1509 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{\text{R}(12\text{f})} = 5,3$ min, *Površina* = 99,5 %.

3.4.7. *N*-Fenil-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12g**



12g

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i fenil-izocijanata **11g** (37,0 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12g**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 66,3 mg (93,5 %) produkta **12g** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,29$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 116,5\text{--}117,1$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3328, 1741, 1654, 1599, 1551, 1508, 1441, 1386, 1309, 1187, 1175, 1130, 1102, 830, 751, 691.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,77 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,40 (dd, 1H, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, C3, β -laktam); 5,06 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, C4 β -laktam); 6,35 (d, $J = 6,8$

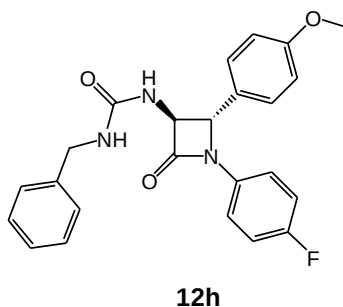
Hz, $\text{NH-C3 } \beta\text{-laktam}$); 6,82–6,90 (m, 4H, Ar-H); 7,09–7,15 (m, 2H, Ar-H); 7,16–7,24 (m, 6H, Ar-H); 7,58 (s, 1H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,45 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,74 (C3, $\beta\text{-laktam}$); 66,98 (C4, $\beta\text{-laktam}$); 114,79 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,03 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,42 (d, $J = 8,0$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 120,29 (C2 i C6, C_6H_5); 123,59 (C4, C_6H_5); 127,64 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,88 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 129,11 (C3 i C5, C_6H_5); 133,39 (d, $J = 2,3$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 138,35 (C4, C_6H_5); 155,31 (NHC(=O)NH); 159,51 (d, $J = 244,2$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,14 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,51 (C=O , $\beta\text{-laktam}$).

HR-MS za $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 405,1489$): izračunato m/z 406,1567 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 406,1550 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{\text{R}}(12\text{g}) = 6,1$ min, *Površina* = 99,6 %.

3.4.8. *N-Benzil-N'-[(±)-trans-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea 12h*



Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i benzil-izocijanata **11h** (32,5 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12h**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 65,9 mg (89,8 %) produkta **12h** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,28$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 164,1\text{--}167,3\text{ }^\circ\text{C}$$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3358, 3264, 3035, 2965, 2929, 1735, 1646, 1555, 1506, 1425, 1384, 1243, 1176, 1155, 1105, 1022, 841, 748, 706.

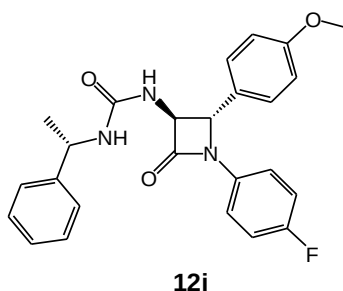
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,78 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,18–4,35 (m, 2H, CH_2 , benzil); 4,38 (dd, 1H, $J_1 = 6,6$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, C3, β -laktam); 4,98 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, C4 β -laktam); 5,57 (t, 1H, $J_{1,2} = 5,7$ Hz, NH -benzil), 5,94 (d, $J = 6,6$ Hz, NH -C3 β -laktam); 6,78–6,92 (m, 4H, Ar-H); 7,10–7,31 (m, 9H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 44,41 (CH_2 , benzil); 55,46 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,94 (C3, β -laktam); 67,21 (C4, β -laktam); 114,73 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,98 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,24 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 127,44 (Ph, C2 i C6, benzil); 127,60 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,10 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,74 (C3 i C5, benzil); 133,51 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 139,00 (Ph, C1, benzil); 157,43 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,39 (d, $J = 244,1$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,06 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,19 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 419,1645$): izračunato m/z 420,1723 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 420,1700 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{\text{R}(12\text{h})} = 5,8$ min, *Površina* = 99,4 %.

3.4.9. *N*-[*(S)*-(-)-1-Feniletil]-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12i**



Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i (*S*)-(-)- α -metilbenzil-izocijanata **11i** (37,0 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12i**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 68,5 mg (90,3 %) produkta **12i** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,36$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 108,8\text{--}113,4\text{ }^\circ\text{C}$$

FTIR-ATR ν/cm^{-1} : 3332, 2928, 2850, 1749, 1635, 1558, 1508, 1427, 1386, 1248, 1226, 1176, 1136, 1029, 831, 699.

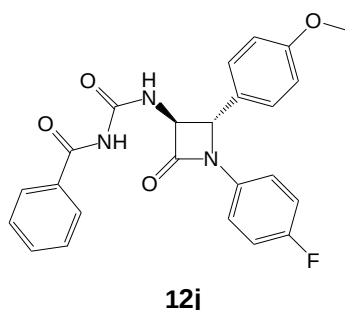
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,39 (dd, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 3,4$ Hz, 6H, 2 x CH_3 feniletil), 3,77 (s, 6H, 2 x OCH_3 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,29 (dd, $J_1 = 6,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H, C3 β -laktam); 4,45 (dd, $J_1 = 6,2$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H, C3 β); 4,75–4,86 (m, 2H, 2 x CH, feniletil); 4,87 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, C4 β -laktam); 4,93 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, C4 β -laktam); 5,58 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, NH-feniletil); 5,83 (dd, $J_1 = 11,0$ Hz, $J_2 = 6,4$ Hz, 2H, NH-C3 β -laktam); 6,76–6,94 (m, 8H, Ar-H); 7,08–7,35 (m, 18H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 23,28 i 23,60 (CH_3 feniletil); 50,11 i 50,16 (2x CH feniletil); 54,44 (2 x CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,81 i 64,11 (C3 β -laktam); 67,13 i 67,19 (C4 β -laktam); 114,69 (2 x C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,85 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 116,02 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,19 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 119,29 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 126,03 i 126,10 (C2 i C6, feniletil); 127,60 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,06 i 128,13 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,78 i 128,79 (Ph, C3 i C5, feniletil); 133,50 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 130,53 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 139,00 (C1-Ph, feniletil); 157,76 i 157,98 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,19 (d, $J = 244,3$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 159,29 (d, $J = 244,1$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,02 i 160,99 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 165,85 i 166,19 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 434,1872 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12j)} = 6,1$ min, *Površina* = 97,5 %.

3.4.10. *N*-Benzoil-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12j**



Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i benzoil-izocijanata **11j** (33,0 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL)

priređena je β -laktamska urea **12j**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 68,6 mg (90,4 %) produkta **12j** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,54$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_t = 225,5\text{--}227,8\text{ }^\circ\text{C}$$

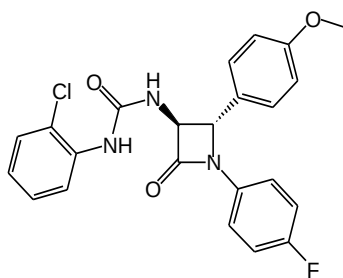
FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3266, 2934, 2837, 1756, 1676, 1611, 1535, 1508, 1466, 1385, 1247, 1217, 1175, 1137, 1101, 1029, 1005, 831, 705.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,80 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,68 (dd, $J_1 = 7,5\text{ Hz}$, $J_2 = 2,5\text{ Hz}$, 1H, C3, β -laktam); 5,10 (d, $J = 2,5\text{ Hz}$, 1H, C4, β -laktam); 6,82–6,98 (m, 4H, Ar-H); 7,15–7,36 (m, 6H, Ar-H); 7,45 (t, $J_1 = J_2 = 7,4\text{ Hz}$, 1H, Ar-H); 7,80–7,90 (m, 2H, Ar-H); 9,51 (d, $J = 7,5\text{ Hz}$, 1H, NH-C_3 β -laktam); 9,69 (s, 1H, $\text{NHC(=O)C}_6\text{H}_5$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,46 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 62,91 (C3, β -laktam); 66,48 (C4, β -laktam); 114,85 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,98 (d, $J = 22,7\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,31 (d, $J = 7,9\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 127,61 (C2 i C6, $\text{C(=O)C}_6\text{H}_5$); 127,90 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,99 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,92 (C3 i C5, $\text{C(=O)C}_6\text{H}_5$); 131,79 (C4, $\text{C(=O)C}_6\text{H}_5$); 133,35 (C1, $\text{C(=O)C}_6\text{H}_5$); 133,52 (d, $J = 2,6\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 154,36 (NHC(=O)NH); 159,40 (d, $J = 244,0\text{ Hz}$, C4, 4- FC_6H_4); 160,23 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 163,69 ($\text{C(=O)C}_6\text{H}_5$); 168,44 (C=O , β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4$ ($M_r = 433,1438$): izračunato m/z 434,1516 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 434,1510 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12j)} = 5,3\text{ min}$, *Površina* = 99,5 %.

3.4.11. *N*-(2-Klorfenil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12k****12k**

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 2-klorfenil-izocijanata **11k** (31,7 µL, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β-laktamska urea **12k**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 67,7 mg (87,9 %) produkta **12k** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,64$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 215,4\text{--}216,2\text{ }^{\circ}\text{C}$$

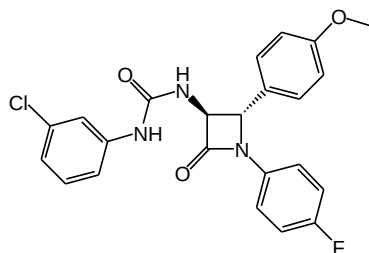
FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3340, 2928, 1733, 1679, 1650, 1612, 1587, 1538, 1508, 1390, 1247, 1212, 1177, 1101, 1028, 830.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,77 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,54 (dd, 1H, $J_1 = 6,5\text{ Hz}$, $J_2 = 2,2\text{ Hz}$, C3, β-laktam); 5,08 (d, 1H, $J = 2,2\text{ Hz}$, C4, β-laktam); 6,24 (d, 1H, $J = 6,7\text{ Hz}$, NH-C3 β-laktam); 6,78–6,94 (m, 6H, Ar-H); 7,11 (t, 1H, $J = 7,9\text{ Hz}$); 7,18–7,28 (m, 5H, Ar-H); 7,45 (s, 1H, Ar-H); 8,04 (s, 1H, $\text{NH-4-ClC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,44 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,92 (C3, β-laktam); 66,92 (C4, β-laktam); 114,80 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,03 (d, $J = 22,8\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,41 (d, $J = 7,9\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 121,80 (C6, 2- ClC_6H_4); 122,80 (C2, 2- ClC_6H_4); 123,69 (C4, 2- ClC_6H_4); 127,64 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,70 (C5, 2- ClC_6H_4); 127,78 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 129,16 (C3, 2- ClC_6H_4); 133,31 (d, $J = 2,7\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 135,37 (C1, 2- ClC_6H_4); 154,48 (NH-C(=O)-NH); 159,55 (d, $J = 244,2\text{ Hz}$, C4, 4- FC_6H_4); 160,15 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,98 (C=O, β-laktam).

HR-MS za $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 439,1099$): izračunato m/z 440,1177 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 440,1162 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12k)} = 6,8\text{ min}$, $\text{Površina} = 99,6\text{ \%}$.

3.4.12. *N*-(3-Klorfenil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12I****12I**

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 3-klorfenil-izocijanata **11I** (32,1 µL, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β-laktamska urea **12I**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 63,2 mg (82,1 %) produkta **12I** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,34$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 116,1\text{--}119,2\text{ }^{\circ}\text{C}$$

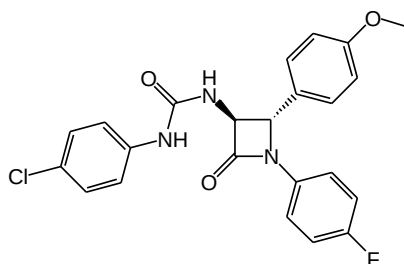
FTIR-ATR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3323, 3080, 2933, 1739, 1658, 1610, 1592, 1544, 1508, 1388, 1248, 1225, 1187, 1101, 1075, 830.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,78 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,37 (dd, 1H, $J_1 = 6,9\text{ Hz}$, $J_2 = 2,3\text{ Hz}$, C3, β-laktam); 5,11 (d, 1H, $J = 2,3\text{ Hz}$, C4, β-laktam); 6,58 (d, 1H, $J = 6,9\text{ Hz}$, NH-C3 β-laktam); 6,80–6,90 (m, 5H, Ar-H); 6,94–7,04 (m, 2H, Ar-H); 7,14–7,23 (m, 4H, Ar-H); 7,32 (t, $J = 2,0\text{ Hz}$, 1H, Ar-H); 7,84 (s, 1H, $\text{NH-4-ClC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,46 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,66 (C3, β-laktam); 66,84 (C4, β-laktam); 114,87 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,14 (d, $J = 22,8\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 117,44 (C2, 3- ClC_6H_4); 119,35 (C6, 3- ClC_6H_4); 119,51 (d, $J = 8,1\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 123,14 (C4, 3- ClC_6H_4); 127,56 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,62 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 129,86 (C5, 3- ClC_6H_4); 133,13 (d, $J = 2,2\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 134,55 (C3, 3- ClC_6H_4); 139,69 (C1, 3- ClC_6H_4); 155,01 (NHC(=O)NH); 159,64 (d, $J = 245,0\text{ Hz}$, C4, 4- FC_6H_4); 160,45 (C4, 4- ClC_6H_4); 166,88 (C=O , β-laktam).

HR-MS za $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 439,1099$): izračunato m/z 440,1177 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 440,1152 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12I)} = 6,8\text{ min}$, *Površina* = 99,7 %.

3.4.13. *N*-(4-Klorfenil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12m****12m**

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 4-klorfenil-izocijanata **11m** (40,4 mg, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β-laktamska urea **12m**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 68,3 mg (88,7 %) produkta **12m** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,32$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 215,3\text{--}217,8\text{ }^\circ\text{C}$$

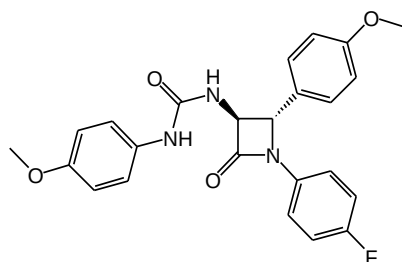
FTIR-ATR (KBr) ν/cm^{-1} : 3385, 3305, 2927, 1746, 1663, 1609, 1551, 1508, 1389, 1312, 1289, 1250, 1175, 1140, 1099, 1032, 833, 507.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,80 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,39 (dd, 1H, $J_1 = 6,7$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, C3, β-laktam); 5,16 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, C4, β-laktam); 6,24 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, NH -C3 β-laktam); 6,83–6,98 (m, 4H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,03–7,18 (m, 4H, 4- FC_6H_4); 7,19–7,30 (m, 4H, 4- ClC_6H_4); 7,38 (s, 1H, NH -4- ClC_6H_4).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,49 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,60 (C3, β-laktam); 67,05 (C4, β-laktam); 114,88 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,13 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,45 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 121,13 (C3 i C5, 4- ClC_6H_4); 127,59 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,72 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 129,00 (C2 i C6, 4- ClC_6H_4); 133,30 (d, $J = 2,8$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 136,84 (C1, 4- ClC_6H_4); 154,82 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,62 (d, $J = 244,8$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 161,25 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,51 ($\text{C}=\text{O}$, β-laktam).

HR-MS za $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 439,1099$): izračunato m/z 440,1177 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 440,1152 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12m)} = 6,7$ min, Površina = 99,6 %.

3.4.14. *N*-(4-Metoksifenil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12n****12n**

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 4-metoksifenil-izocijanata **11n** (μL, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β-laktamska urea **12n**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 70,9 mg (93,0 %) produkta **12n** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,22$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_f = 109,3\text{--}110,1\text{ }^{\circ}\text{C}$$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3321, 2935, 2836, 1742, 1649, 1610, 1552, 1506, 1386, 1303, 1292, 1223, 1174, 1136, 1030, 828.

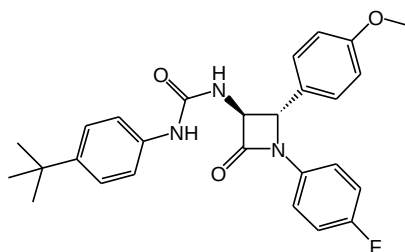
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,70 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 3,77 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,41 (dd, 1H, $J_1 = 6,9\text{ Hz}$, $J_2 = 2,3\text{ Hz}$, C3, β-laktam); 5,05 (d, $J = 2,2\text{ Hz}$, C4, β-laktam); 6,20 (d, $J = 6,7\text{ Hz}$, 1H, NH -C3 β-laktam); 6,85 (d; $J = 9,0\text{ Hz}$, 2H); 6,81–6,91 (m, 4H, Ar-H); 7,11 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, 2H, Ar-H); 7,16–7,24 (m, 4H, Ar-H), 7,34 (s, 1H, NH - $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ -4).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,43; 55,54 (2 x OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,71 (C3, β-laktam); 67,06 (C4, β-laktam); 114,39 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 114,39 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 114,75 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,98 (d, $J = 22,7\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,34 (d, $J = 7,9\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 123,26 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,62 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,02 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 130,99 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,49 (d, $J = 2,7\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 155,81 ($\text{NH}\text{C}(=\text{O})\text{NH}$); 156,48 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 159,43 (d, $J = 244,2\text{ Hz}$, C4, 4- FC_6H_4); 160,09 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,41 ($\text{C}=\text{O}$, β-laktam).

HR-MS za $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_4$ ($M_r = 435,1594$): izračunato m/z 436,1673 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 436,1656 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12n)} = 5,8$ min, *Površina* = 96,9 %.

3.4.15. *N*-(4-*tert*-Butilfenil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12o**



12o

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, mmol) i 4-*tert*-butilfenil-izocijanata **11o** (46,7 μ L, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12o**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 73,7 mg (91,2 %) produkta **12o** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,47$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 195,4\text{--}196,0$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3332, 2961, 1748, 1657, 1603, 1542, 1507, 1387, 1292, 1249, 1228, 1176, 1138, 1102, 1032, 831.

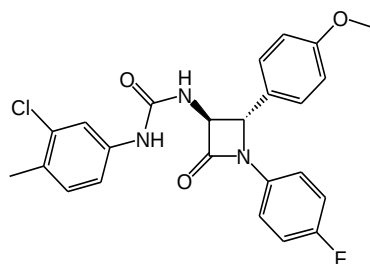
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,24 (s, 9H, 3 x CH_3 , 4-*t*- BuC_6H_4); 3,77 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,45 (dd, 2H, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, C3 β -laktam); 5,06 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, C4 β -laktam); 6,21 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, NH - β -laktam); 6,84–6,90 (m, 4H, Ar-H); 7,14–7,17 (m, 2H, Ar-H); 7,18–7,23 (m, 6H, Ar-H); 7,40 (s, 1H, NH - C_6H_4).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 31,48 (3 x CH_3 , 4-*t*- BuC_6H_4); 55,43 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,73 (C3 β -laktam); 67,01 (C4 β -laktam); 114,72 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,99 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,34 (d, $J = 7,8$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 120,93 (4-*t*- BuC_6H_4); 126,05 (C3 i C5, 4-*t*- BuC_6H_4); 127,64 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,96 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,43 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 135,40 (C1, 4-*t*- BuC_6H_4); 155,48 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,42 (d, $J = 244,6$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,06 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,28 (C=O, β -laktam).

HR-MS za $C_{27}H_{28}FN_3O_3$ ($M_r = 461,2115$): izračunato m/z 462,2193 $[M+H]^+$, nađeno m/z 462,2183 $[M+H]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12p)} = 7,5$ min, $Površina = 99,6$ %.

3.4.16. *N*-(3-Klor-4-metilfenil)-*N'*-[(±)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12p**



12p

Prema općem postupku, iz (±)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 3-klor-4-metilfenil-izocijanata **11p** (36,0 μ L, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12p**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 69,1 mg (87,0 %) produkta **12p** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,41$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 178,8$ – $174,2$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3327, 2931, 1741, 1658, 1588, 1542, 1508, 1384, 1290, 1225, 1175, 1136, 1102, 1030, 830.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 2,19 (s, 3H, CH_3 , 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 3,79 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,38 (dd, 1H, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, C3, β -laktam); 5,12 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, C4, β -laktam); 6,55 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, NH -C3 β -laktam); 6,84–6,90 (m, 5H, Ar-H); 6,92 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, Ar-H); 7,16–7,21 (m, 4H, Ar-H); 7,25 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, Ar-H); 7,70 (s, 1H, NH -3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$).

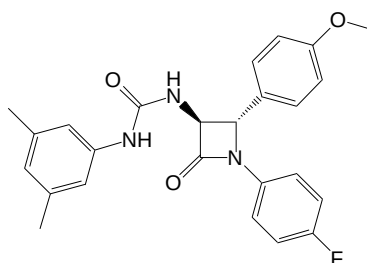
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 19,40 (CH_3 , 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 55,44 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,57 (C3, β -laktam); 66,87 (C4, β -laktam); 114,79 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,09 (C3 i C5, 4- FC_6H_4); 118,06 (C2, 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 119,44 (d, $J = 8,0$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 120,09 (C6, 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 127,60 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,66 (C1, 4-

CH₃OC₆H₄); 130,52 (C3, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 130,85 (C4, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 133,18 (d, $J = 2,4$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 134,29 (C1, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 137,16 (C5, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 155,12 (NH $\overline{C}$ (=O)NH); 159,54 (d, $J = 244,9$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 160,15 (C4, 4-ClC₆H₄); 160,35; 166,92 (C=O, β -laktam).

HR-MS za C₂₄H₂₁ClFN₃O₃ ($M_r = 453,1255$): izračunato m/z 454,1333 [M+H]⁺, nađeno m/z 454,1257 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12p)} = 7,1$ min, *Površina* = 99,2 %.

3.4.17. *N*-(3,5-Dimetilfenil)-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12r**



12r

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 3,5-dimetilfenil-izocijanata **11r** (37,0 μ L, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12r**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je svjetložuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 68,3 mg (90,0 %) produkta **12r** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,44$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 164,2\text{--}163,2$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3320, 2918, 2851, 1753, 1645, 1612, 1566, 1508, 1387, 1279, 1247, 1224, 1175, 1153, 1102, 1031, 831.

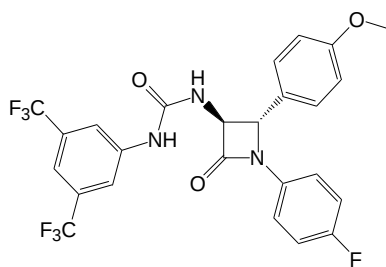
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 2,15 (s, 6H, 2 x CH₃, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 3,78 (s, 3H, 4-OCH₃C₆H₃); 4,40 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H, C3, β -laktam); 5,07 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, C4, β -laktam); 6,31 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, NH-C3 β -laktam); 6,60 (s, 1H, NH-3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 6,77–6,93 (m, 6H, Ar-H); 7,12–7,27 (m, 4H, Ar-H); 7,40 (s, 1H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 21,40 (2 x CH_3 , 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 55,43 (CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,70 (C3, β -laktam); 67,04 (C4, β -laktam); 114,75 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,00 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 118,25 (C2 i C6, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 119,38 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 125,52 (C4, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 127,64 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,96 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,43 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 138,10 (C1, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 138,78 (C3 i C5, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 155,36 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,45 (d, $J = 244,3$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,09 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,58 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 434,1871 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{\text{R}(12\text{r})} = 6,9$ min, $\text{Površina} = 95,1$ %.

3.4.18. *N*-[3,5-Bis(trifluorometilfenil)]-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12s**



12s

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, mmol) i 3,5-bis(trifluorometil)fenil-izocijanata **11s** (45,6 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12s**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je 71,3 mg (75,3 %) produkta **12s** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,43$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 192,8\text{--}193,7$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3318, 1746, 1672, 1614, 1571, 1509, 1474, 1442, 1384, 1273, 1255, 1229, 1176, 1137, 1033, 836.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 2,15 (s, 6H, 2 x CH_3 , 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 3,78 (s, 3H, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 4,40 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H, C3, β -laktam); 5,07 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H,

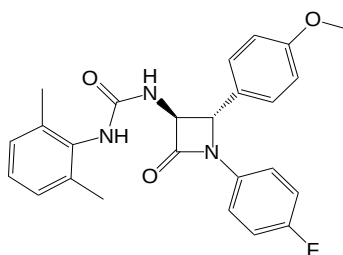
C4, β -laktam); 6,31 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, NH-C3 β -laktam); 6,60 (s, 1H, NH-3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 6,77–6,93 (m, 6H, Ar-H); 7,12–7,27 (m, 4H, Ar-H); 7,40 (s, 1H, Ar-H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ /ppm: 21,40 (2 x CH₃, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 55,43 (CH₃O; 4-CH₃OC₆H₄); 63,70 (C3, β -laktam); 67,04 (C4, β -laktam); 114,75 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 116,00 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 118,25 (C2 i C6, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 119,38 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 125,52 (C4, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 127,64 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 127,96 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 133,43 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 138,10 (C1, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 138,78 (C3 i C5, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 155,36 (NHC(=O)NH); 159,45 (d, $J = 244,3$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 160,09 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 166,58 (C=O, β -laktam).

HR-MS za C₂₅H₁₈F₇N₃O₃ ($M_r = 541,1236$): izračunato m/z 542,1315 [M+H]⁺, nađeno m/z 542,1301 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12s)} = 7,6$ min, *Površina* = 99,4 %.

3.4.19. *N*-(2,6-Dimetilfenil)-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12t**



12t

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 2,6-dimetilfenil-izocijanata **11t** (36,6 μ L, 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12t**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je bezbojno ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 67,2 mg (88,5 %) produkta **12t** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,30$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_f = 127,2$ – $128,9$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3311, 2961, 1753, 1638, 1612, 1548, 1508, 1384, 1248, 1226, 1175, 1134, 1101, 1030, 831.

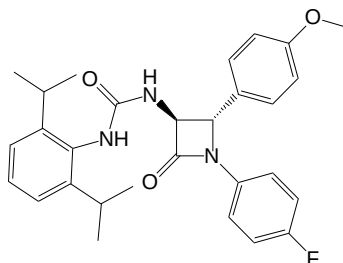
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 2,29 (s, 6H, 2 x CH_3 , 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 3,78 (s, 3H, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 4,44 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H, C3, β -laktam); 4,96 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, C4, β -laktam); 6,31 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, NH-C3 β -laktam); 6,60 (s, 1H, NH -3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 6,77–6,93 (m, 6H, Ar-H); 7,12–7,27 (m, 4H, Ar-H); 7,40 (s, 1H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 18,48 (2 x CH_3 , 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 55,45 (CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,91 (C3, β -laktam); 67,22 (C4, β -laktam); 114,75 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,92 (d, $J = 22,8$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 118,25 (C2 i C6, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 119,09 (d, $J = 7,8$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 125,52 (C4, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 127,53 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,23 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 133,70 (d, $J = 2,3$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 138,10 (C1, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 138,78 (C3 i C5, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$); 156,16 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,33 (d, $J = 243,7$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,07 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 166,58 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 434,1859 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12t)} = 6,0$ min, *Površina* = 96,7 %.

3.4.20. *N*-(2,6-Diizopropilfenil)-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12u**



12u

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 2,6-diizopropilfenil-izocijanata **11u** (56,2 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12u**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je svjetložuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 71,0 mg (82,8 %) produkta **12u** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,61$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$t_t = 120,2\text{--}122,0$ °C

FTIR-ATR ν/cm^{-1} : 3395, 2963, 1752, 1662, 1611, 1509, 1461, 1385, 1359, 1247, 1225, 1176, 1137, 1101, 1032, 831.

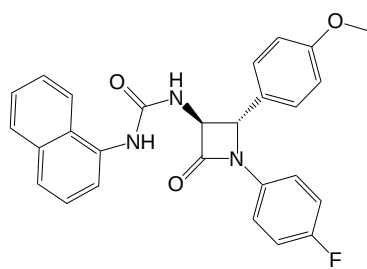
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,03-1,44 (m, 12H, 4 x 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 3,16-3,40 (m, 2H, 2 x CH, 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 3,77 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,50 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H, C3, β -laktam); 4,88 (d; $J = 2,2$ Hz, 1H, C4, β -laktam); 6,43 (s, 1H); 6,79–6,98 (m, 4H, Ar-H); 7,15–7,25 (m, 6H, Ar-H); 7,33 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 23,55; 24,42 (2 x CH, 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 28,60 (4 x CH_3 , 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 55,43 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,92 (C3, β -laktam), 67,12 (C4, β -laktam); 114,71 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,90 (d, $J = 22,7$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,04 (d, $J = 7,9$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 124,50 (C3 i C5, 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 127,41 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,19 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 129,51 (C4, 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 133,73 (d, $J = 2,7$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 147,97 (C2 i C6, 2,6-(*i*-Pr) $_2\text{C}_6\text{H}_3$); 156,81 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,27 (d, $J = 243,7$ Hz, C4, 4- FC_6H_4); 160,03 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 164,62 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 489,2428$): izračunato m/z 490,2506 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 490,2499 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{\text{R}}(12\text{v}) = 7,4$ min, *Površina* = 96,8 %.

3.4.21. *N*-(1-naftil)-*N'*-[($\pm$)-*trans*-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-3-il]urea **12v**



12v

Prema općem postupku, iz ($\pm$)-*trans*-3-amino-1-(4-fluorfenil)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-ona **3e** (50 mg, 0,175 mmol) i 1-naftil-izocijanata **11v** (37,8 μL , 0,263 mmol) u acetonitrilu (5 mL) priređena je β -laktamska urea **12v**. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je žuto ulje, koje je potom trituirano heksanom. Otapalo je upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 67,1 mg (84,2 %) produkta **12v** u obliku bijelog praha. $R_f = 0,4$ (kloroform/etil-acetat = 4:1)

$$t_t = 218,3\text{--}219,4\text{ }^{\circ}\text{C}$$

FTIR-ATR ν/cm^{-1} : 3396, 3058, 2958, 1748, 1668, 1611, 1511, 1397, 1358, 1339, 1286, 1254, 1211, 1173, 1102, 1033, 834.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,78 (s, 3H, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 4,50 (dd, $J_1 = 6,7\text{ Hz}$, $J_2 = 2,3\text{ Hz}$, 1H, C3, β -laktam); 5,02 (d, $J = 2,3\text{ Hz}$, 1H, C4, β -laktam); 5,80 (s, 1H, NH); 6,82–6,89 (m, 4H, Ar-H); 7,10 (s, 1H, NH); 7,17–7,21 (m, 4H, Ar-H); 7,41 (t, $J = 7,8\text{ Hz}$, 1H, naftil); 7,48–7,54 (m, 2H, naftil); 7,61 (d, $J = 7,4\text{ Hz}$, 1H, naftil); 7,10 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 1H, naftil); 7,83–7,88 (m, 1H, naftil); 8,02–8,07 (m, 1H, naftil).

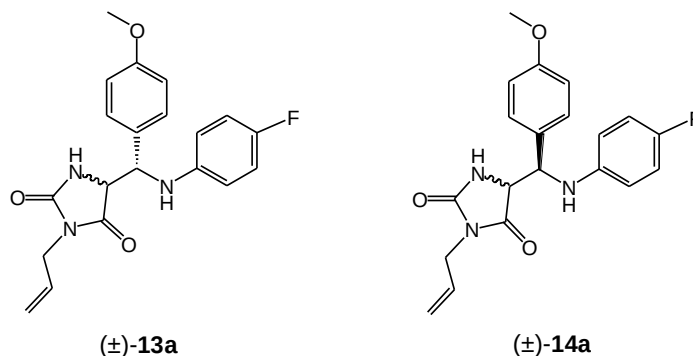
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,31 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 63,63 (C3, β -laktam), 67,07 (C4, β -laktam); 114,62 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,81 (d, $J = 22,8\text{ Hz}$, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 119,03 (d, $J = 7,9\text{ Hz}$, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 121,87 (naftil); 123,79 (naftil); 125,81 (naftil); 126,69 (naftil); 127,04 (naftil); 127,45 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 127,53 (naftil); 127,98 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,59 (naftil); 129,45 (naftil); 132,30 (naftil); 133,51 (d, $J = 1,08\text{ Hz}$, C1, 4- FC_6H_4); 134,54 (naftil); 155,83 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$); 159,24 (d, $J = 243,1\text{ Hz}$, C4, 4- FC_6H_4); 159,98 (C4, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 164,60 ($\text{C}=\text{O}$, β -laktam).

HR-MS za $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 455,1645$): izračunato m/z 456,1723 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 456,1714 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Synergi Polar-RP, $t_{R(12v)} = 6,7\text{ min}$, *Površina* = 99,8 %.

3.5. Priprava 3,5-disupstituiranih hidantoina

Otopina odgovarajuće β -laktamske uree (1,0 ekv.) u bezvodnom metanolu (5 mL) zagrijana je na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, a potom je dodana 25 %-tna otopina natrijevog metoksida u metanolu (1,1 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je uz refluks u atmosferi argona 1 sat. Tijek reakcije praćen je TLC-om i HPLC-om. Po završetku reakcije, u reakcijsku smjesu dodana je zasićena otopina natrijevog klorida (10 mL) te je ekstrahirana s kloroformom (3 x 15 mL). Organski slojevi su spojeni, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi reakcijski produkt pročišćen je na koloni silikagela uz smjesu otapala kloroforma i etil-acetata u omjeru 2:1 ili 4:1. Dobivena diastereomerna smjesa hidantoina **13/14** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda D-F, pokretna faza A - voda i B - acetonitril, vrijeme analize 50,18 min, protok 17 mL min^{-1} , $\lambda = 254\text{ nm}$). Sakupljene frakcije čistih *cis*- i *trans*-izomera ekstrahirane su s kloroformom (3 x 20 mL). Spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim magnezijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču.

3.5.1. 3-Alil-5-[[*(4-fluorfenil)amino*](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion **13a/14a**

Dijastereomerna smjesa hidantoina **13a/14a** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **12a** (40 mg, 0,108 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (24,8 μ L, 0,119 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 2:1. Dobiveno je 34,3 mg (85,8 %) smjese dijastereomera **13a/14a**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,42$ (kloroform/etil-acetat = 2:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13a:14a** = 47,5:52,5 ($t_{R(13a)} = 30,6$ min i $t_{R(14a)} = 32,9$ min; metoda A). Dijastereomerna smjesa **13a/14a** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda D). Dobiveno je 10 mg izomera **13a** i 11 mg izomera **14a**. Da bi se odredila apsolutna konfiguracija svakog enantiomera, mala količina izomera **13a** i **14a** odijeljena je na preparativnom HPLC-u na semi-preparativnoj koloni Chiral Art Amylose-SA, 10 μ m, 250 mm x 8 mm uz heksan/propan-2-ol (9:1, v/v) kao pokretnu fazu. Dobiveno je 0,8 mg enantiomera **13a-ent1**, 0,8 mg **13a-ent2**, 0,9 mg **14a-ent1** i 0,9 mg **14a-ent2**.

13a

$t_f = 155,0\text{--}156,9$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3351, 2933, 2837, 1774, 1702, 1610, 1508, 1445, 1409, 1344, 1249, 1216, 1177, 1108, 989, 930, 823.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 3,74 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 3,67-3,86 (m, 2H, CH_2 alil), 4,48 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, CH_2 alil), 4,51 (dd, $J_1 = 3,8$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H, CH hidantoin), 4,54 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, CH_2 alil), 4,80 (dd, $J_1 = 7,1$ Hz, $J_2 = 3,8$ Hz, 1H, CH bočni lanac), 4,85 (dd, $J_1 = 10,4$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, 1H, CH_2 alil), 4,99 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH bočni lanac), 5,43 (ddt, $J_1 = 17,2$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz, $J_3 = 5,0$ Hz, 1H, CH alil), 6,35 (s, 1H, NH hidantoin), 6,56-6,66 (m, 2H, 4- FC_6H_4), 6,78-6,89 (m, 4H, 4- FC_6H_4 + 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 7,25 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 40,67 (CH_2 , alil); 55,90 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 57,42 (CH bočni lanac); 63,04 (CH hidantoin); 114,57 (C_3 i C_5 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,93 (d, $J = 7,5$ Hz, C_2 i C_6 , 4- FC_6H_4); 116,28 (d, $J = 22,6$ Hz, C_3 i C_5 , 4- FC_6H_4); 116,37 ($\text{CH}_2=$, alil); 129,56 (C_1 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 130,33 (C_2 i C_6 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 132,48 (CH alil); 144,30 (d, $J = 1,7$ Hz, C_1 , 4- FC_6H_4); 156,82 (d, $J = 233,6$ Hz, C_4 , 4- FC_6H_4); 157,57 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{N}$); 160,62 (C_4 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 173,08 ($\text{C}=\text{O}$).

HR-MS za $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 369,1489$): izračunato m/z 370,1567 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 370,1562 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{\text{R}(13\text{a})} = 30,6$ min.

14a

$t_{\text{t}} = 168,4\text{--}170,7$ °C

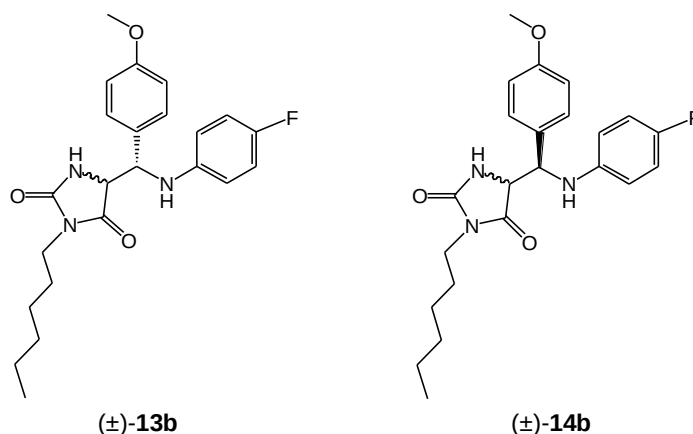
FTIR-ATR $\hat{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3351, 2933, 2837, 1774, 1702, 1610, 1508, 1445, 1409, 1344, 1249, 1216, 1177, 1108, 989, 930, 823.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 3,75 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 3,95–4,05 (m, 2H, CH_2 alil), 4,38 (dd, $J_1 = 3,1$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H, CH hidantoin), 4,91 (dd, $J_1 = 10,7$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, 1H, CH bočni lanac), 5,00 (dd, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H, CH_2 alil), 5,05 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, CH_2 alil), 5,25 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H, NH bočni lanac), 5,71 (ddt, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 9,9$ Hz, $J_3 = 5,0$ Hz, 1H, CH alil), 6,18 (s, 1H, NH hidantoin), 6,55–6,68 (m, 2H, 4- FC_6H_4), 6,81 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H, 4- FC_6H_4), 6,89 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 7,28 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 40,92 (CH_2 , alil); 55,90 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 57,36 (CH bočni lanac); 63,27 (CH hidantoin); 114,88 (C_3 i C_5 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,94 (d, $J = 7,5$ Hz, C_2 i C_6 , 4- FC_6H_4); 116,22 (d, $J = 22,3$ Hz, C_3 i C_5 , 4- FC_6H_4); 116,48 ($\text{CH}_2=$, alil); 129,37 (C_2 i C_6 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 131,44 (C_1 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 132,81 (CH alil); 144,33 (d, $J = 1,8$ Hz, C_1 , 4- FC_6H_4); 156,68 (d, $J = 233,4$ Hz, C_4 , 4- FC_6H_4); 158,15 ($\text{NHC}(=\text{O})\text{N}$); 160,28 (C_4 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 172,41 ($\text{NC}(=\text{O})\text{CH}$).

HR-MS za $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 369,1489$): izračunato m/z 370,1567 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nađeno m/z 370,1562 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{\text{R}(14\text{a})} = 32,9$ min.

3.5.2. 3-Heksil-5-{[(4-Fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil}imidazolidin-2,4-dion **13b/14b**

Dijastereomerna smjesa hidantoina **13b/14b** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **12b** (40 mg, 0,097 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (24,5 μ L, 0,107 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je 36,7 mg (91,8 %) smjese dijastereomera **13b/14b**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,39$ (kloroform/etil-acetat = 4:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13b:14b** = 46,9:53,1 ($t_{R(13b)} = 39,5$ min i $t_{R(14b)} = 41,4$ min; metoda C). Dijastereomerna smjesa **13b/14b** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda F). Dobiveno je 15 mg izomera **13b** i 13 mg izomera **14b**.

13b

$t_f = 164,2\text{--}167,5$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3387, 3359, 2950, 2929, 2856, 1762, 1709, 1612, 1581, 1506, 1455, 1422, 1359, 1256, 1178, 1113, 1030, 985, 820.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 0,83–0,90 (m, 3H, CH_3 heksil); 0,89–1,26 (m, 6H, 3 x CH_2 heksil); 1,27–1,35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,04–3,30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 3,74 (s, CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,48 (dd, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,81 (dd, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,05 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH bočni); 6,37 (s, 1H, NH hidantoin); 6,53–6,69 (m, 2H, C2 i C6 4- FC_6H_4); 6,74–6,93 (m, 4H, C3 i C5 4- FC_6H_4 + C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,29 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 14,13 (CH_3 , heksil); 22,56 (CH_2 , C5 heksil); 26,36 (CH_2 , C3 heksil); 27,86 (CH_2 , C2 heksil); 31,44 (CH_2 , C4 heksil); 38,81 (CH_2 , C1 heksil); 55,38 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 57,31 (CH bočni lanac); 60,47 (CH hidantoin); 114,54 (C3 i

C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,94 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,29 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 128,73 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 129,15 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 142,13 (d, $J = 2,1$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,84 (d, $J = 235,8$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,24 (NHC(=O)N); 160,04 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,23 (C=O).

HR-MS za C₂₃H₂₈FN₃O₃ ($M_r = 413,2115$): izračunato m/z 414,2193 [M+H]⁺, nađeno m/z 414,2182 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13b)} = 39,5$ min.

14b

$t_t = 137,4\text{--}139,3$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3387, 3359, 2950, 2929, 2856, 1762, 1709, 1612, 1581, 1506, 1455, 1422, 1359, 1256, 1178, 1113, 1030, 985, 820.

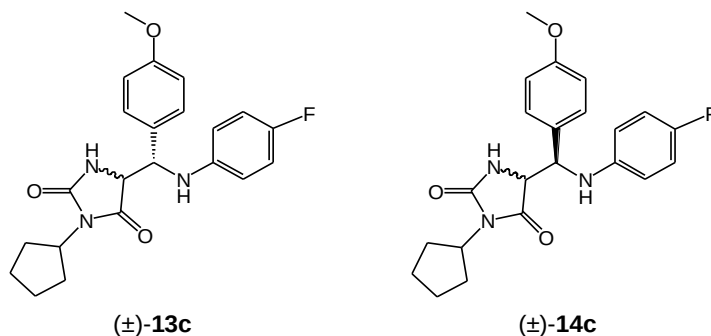
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 0,76–0,90 (m, 3H, CH₃ heksil); 0,89–1,26 (m, 6H, 3 x CH₂ heksil); 1,27–1,35 (m, 2H, CH₂CH₂NH); 3,23–3,43 (m, 2H, CH₂-N); 3,76 (s, CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 4,32 (dd, $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,87 (dd, $J_1 = 10,5$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,35 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H, NH bočni); 6,14 (s, 1H, NH hidantoin); 6,54–6,65 (m, 2H, C2 i C6 4-FC₆H₄); 6,74–6,93 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H, C3 i C5 4-FC₆H₄); 6,88 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄); 7,27 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, C2 i C6 4-CH₃OC₆H₄).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 14,13 (CH₃, heksil); 22,59 (CH₂, C5 heksil); 26,40 (CH₂, C3 heksil); 27,95 (CH₂, C2 heksil); 31,46 (CH₂, C4 heksil); 38,99 (CH₂, C1 heksil); 55,38 (OCH₃, 4-CH₃OC₆H₄); 60,18 (CH bočni lanac); 62,00 (CH hidantoin); 114,56 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,74 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 115,97 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 127,89 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 129,34 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 142,66 (d, $J = 2,1$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,44 (d, $J = 235,0$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,88 (NHC(=O)N); 159,64 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,13 (C=O).

HR-MS za C₂₃H₂₈FN₃O₃ ($M_r = 413,2115$): izračunato m/z 414,2193 [M+H]⁺, nađeno m/z 414,2184 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14b)} = 41,4$ min.

3.5.3. 3-Ciklopentil-5-{[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil}imidazolidin-2,4-dion **13c/14c**



Dijastereomerna smjesa hidantoina **13c/14c** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **12c** (40 mg, 0,101 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (25,4 μ L, 0,111 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je 31,8 mg (79,5 %) smjese dijastereomera **13c/14c**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,41$ (kloroform/etil-acetat = 4:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13c:14c** = 48,2:51,8 ($t_{R(13c)} = 41,1$ min i $t_{R(14c)} = 42,5$ min; metoda B). Dijastereomerna smjesa **13c/14c** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (Metoda F). Dobiveno je 13 mg izomera **13c** i 14 mg izomera **14c**.

13c

$t_f = 141,1\text{--}142,5$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3347, 3231, 2959, 1762, 1699, 1613, 1510, 1432, 1352, 1308, 1282, 1258, 1221, 1131, 1157, 1111, 965, 832.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 1,42–1,50 (m, 2H, C2a i C5a ciklopentil); 1,65–1,75 (m, 2H, C3a i C4a ciklopentil); 1,70–1,79 (m, 4H, C2b, C3b, C4b i C5b ciklopentil); 3,73 (s, 3H, CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,15–4,29 (m, 1H, C1 ciklopentil); 4,39 (dd, $J_1 = 3,7$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,77 (dd, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, 1H, CH bočni); 4,99 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,32 (s, 1H, NH hidantoin); 6,50–6,64 (m, 2H, C2 i C6 4- FC_6H_4); 6,81–6,86 (m, 4H, C3 i C5 4- FC_6H_4 i C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 7,24 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 25,69; 27,72 (C3 i C4 ciklopentil); 29,27; 29,54 (C2 i C5 ciklopentil); 51,96 (C1 ciklopentil); 55,95 (CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 57,78 (CH bočni lanac); 61,26 (CH hidantoin); 114,51 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,96 (d, $J = 7,6$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 116,30 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 129,52 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 130,25

(C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 144,44 (d, $J = 1,7$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,86 (d, $J = 233,6$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,96 (NH $\underline{C}(=O)N$); 160,60 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,79 (N $\underline{C}(=O)CH$).

HR-MS za C₂₂H₂₄FN₃O₃ ($M_r = 397,1802$): izračunato m/z 398,1880 [M+H]⁺, nađeno m/z 398,1869 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13c)} = 41,4$ min.

14c

$t_t = 211,0\text{--}211,8$ °C

FTIR-ATR $\hat{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3347, 3231, 2959, 1762, 1699, 1613, 1510, 1432, 1352, 1308, 1282, 1258, 1221, 1131, 1157, 1111, 965, 832.

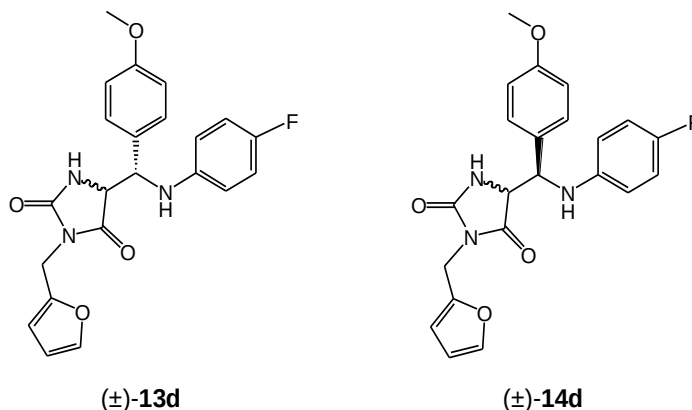
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 1,48–1,57 (m, 2H, C2a i C5a ciklopentil); 1,65–1,75 (m, 2H, C3a i C4a ciklopentil); 1,75–1,90 (m, 4H, C2b, C3b, C4b i C5b ciklopentil); 3,74 (s, 3H, CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 4,02–4,10 (m, 1H, C1 ciklopentil); 4,26 (dd, $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,84 (dd, $J_1 = 10,5$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,26 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,15 (s, 1H, NH hidantoin); 6,57–6,61 (m, 2H, C2 i C6 4-FC₆H₄); 6,81 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H, C3 i C5 4-FC₆H₄); 6,87 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄), 7,26 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, C2 i C6 4-CH₃OC₆H₄).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 25,84 (C3 i C4 ciklopentil); 29,64; 29,75 (C2 i C5 ciklopentil); 52,16 (C1 ciklopentil); 55,95 (CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 59,70 (CH bočni lanac); 62,09 (CH hidantoin); 114,83 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,87 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,24 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 129,46 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,31 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 144,41 (d, $J = 1,6$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,60 (d, $J = 233,2$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 158,42 (NH $\underline{C}(=O)N$); 160,33 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 173,50 (N $\underline{C}(=O)CH$).

HR-MS za C₂₂H₂₄FN₃O₃ ($M_r = 397,1802$): izračunato m/z 398,1880 [M+H]⁺, nađeno m/z 398,1870 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14c)} = 42,5$ min.

3.5.4. 3-Furfuril-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion
13d/14d



Dijastereomerna smjesa hidantoina **13d/14d** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **12f** (40 mg, 0,098 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (24,7 μ L, 0,108 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je 32,6 mg (81,5 %) smjese dijastereomera **13d/14d**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,43$ (kloroform/etil-acetat = 4:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13d:14d** = 47,4:52,6 ($t_{R(13d)} = 37,8$ min i $t_{R(14d)} = 40,8$ min; metoda A). Dijastereomerna smjesa **13d/14d** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda D). Dobiveno je 11 mg izomera (±)-**13d** i 13 mg izomera **14d**.

13d

$t_f = 165,8\text{--}168,9\text{ }^\circ\text{C}$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 1776, 1705, 1610, 1508, 1441, 1348, 1248, 1215, 1178, 1129, 1031, 1010, 937, 822.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 3,73 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,52 (dd, $J_1 = 3,8$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,30 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, CH_2 , C1a furfural) + 4,38 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H, CH_2 , C1a' furfural); 4,80 (dd, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 3,7$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 4,98 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 5,80 (dd, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H, CH, C4 furfural); 6,23 (dd, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H, CH, C3 furfural); 6,42 (s, 1H, NH hidantoin); 6,55–6,61 (m, 6H, Ar-H); 7,20 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ar-H); 7,28 (dd, $J_1 = 1,8$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H, CH, C5 furfural).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 35,37 (CH_2 , C1 furfural); 55,80 (OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 59,32 (CH bočni lanac); 61,98 (CH hidantoin); 108,62 (C3 furfural); 111,22 (C4

furfuril); 114,50 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,90 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,22 (d, $J = 22,4$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 130,13 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,27 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 143,24 (C5 furfuril), 144,29 (d, $J = 1,5$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 150,31 (C2 furfuril); 156,81 (d, $J = 233,5$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,20 (NHC(=O)N); 160,43 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,17 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₂H₂₀FN₃O₄ ($M_r = 409,1438$): izračunato m/z 410,1516 [M+H]⁺, nađeno m/z 410,1514 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13d)} = 37,8$ min.

14d

$t_f = 161,0$ – $163,9$ °C

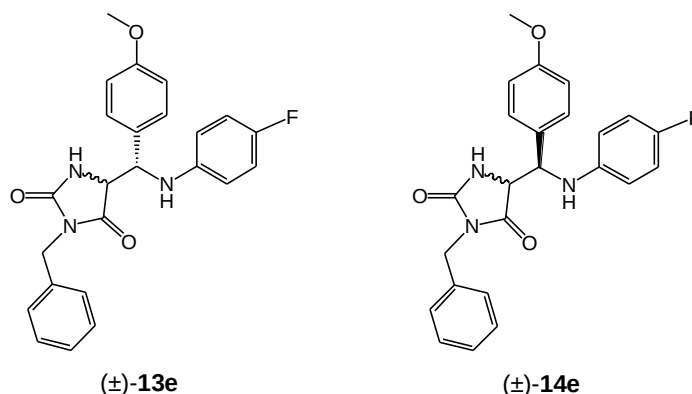
FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 1776, 1705, 1610, 1508, 1441, 1348, 1248, 1215, 1178, 1129, 1031, 1010, 937, 822.

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 3,74 (s, 3H, OCH₃, 4-CH₃OC₆H₄); 4,39 (dd, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,50 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, CH₂, C1a furfuril) + 4,55 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, CH₂, C1a' furfuril); 4,89 (dd, $J_1 = 10,6$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,22 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,16 (dd, $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H, CH, C3 furfuril); 6,25 (s, 1H, NH hidantoin); 6,31 (dd, $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H, CH, C2 furfuril); 6,75–6,87 (m, 6H, Ar-H); 7,26 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H); 7,37 (dd, $J_1 = 1,9$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H, CH, C4 furfuril).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 35,66 (CH₂, C1 furfuril); 55,87 (OCH₃, 4-CH₃OC₆H₄); 57,42 (CH bočni lanac); 63,11 (CH hidantoin); 108,78 (C3 furfuril); 111,41 (C4 furfuril); 114,86 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,86 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,20 (d, $J = 22,4$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 129,32 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,27 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 143,33 (C5 furfuril), 144,25 (d, $J = 1,4$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 150,60 (C2 furfuril); 156,64 (d, $J = 233,5$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,74 (NHC(=O)N); 160,22 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,83 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₂H₂₀FN₃O₄ ($M_r = 409,1438$): izračunato m/z 410,1516 [M+H]⁺, nađeno m/z 414,1509 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14d)} = 40,8$ min.

3.5.5. 3-Benzil-5-[[*(4-fluorfenil)amino*](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion **13e/14e**

Dijastereomerna smjesa hidantoina **13e/14e** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **12h** (47 mg, 0,112 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (28,1 μ L, 0,123 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform-etil-acetat u omjeru 2:1. Dobiveno je 40,6 mg (86,4 %) smjese dijastereomera **13e/14e**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,46$ (kloroform/etil-acetat = 2:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13e:14e** = 44,1:55,9 ($t_{R(13e)} = 32,3$ min i $t_{R(14e)} = 33,7$ min; metoda A). Dijastereomerna smjesa **13e/14e** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda E). Dobiveno je 16 mg izomera **13e** i 14 mg izomera **14e**.

13e

$t_f = 154,3\text{--}156,1$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3359, 1771, 1706, 1611, 1509, 1446, 1251, 1217, 1179, 10301, 822.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 3,75 (s, CH_3O ; 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,29 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H, CH_2 , C1a benzil) + 4,45 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, CH_2 , C1b benzil); 4,60 (dd, $J_1 = 3,5$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,76 (dd, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,21 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,54 (s, 1H, NH hidantoin); 6,58–6,66 (m, 2H, C2 i C6 4- FC_6H_4); 6,67–6,74 (m, 2H, benzil); 6,74–6,90 (m, 4H, C3 i C5 4- FC_6H_4 + C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,10–7,21 (m, 3H, benzil); 7,24 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 42,72 (CH_2 benzil); 56,42 (CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 59,81 (CH bočni lanac); 62,75 (CH hidantoin); 115,18 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,55 (d, $J = 7,5$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 116,91 (d, $J = 22,4$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 128,38 (C4 benzil); 128,75 (C3 i C5, benzil); 129,90 (C2 i C6, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 131,04 (C2 i C6, benzil); 131,86 (C1, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 137,76 (C1 benzil); 144,88 (d, $J = 1,6$ Hz, C1, 4- FC_6H_4); 157,57 (d, $J =$

233,8 Hz, C4, 4-FC₆H₄); 158,06 (NHC(=O)N); 161,16 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 173,17 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₄H₂₂FN₃O₃ (*M_r* = 419,1645): izračunato *m/z* 420,1723 [M+H]⁺, nađeno *m/z* 420,1715 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, *t_R*(13e) = 32,3 min.

14e

t_t = 187,3–191,0 °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3359, 1771, 1706, 1611, 1509, 1446, 1251, 1217, 1179, 10301, 822.

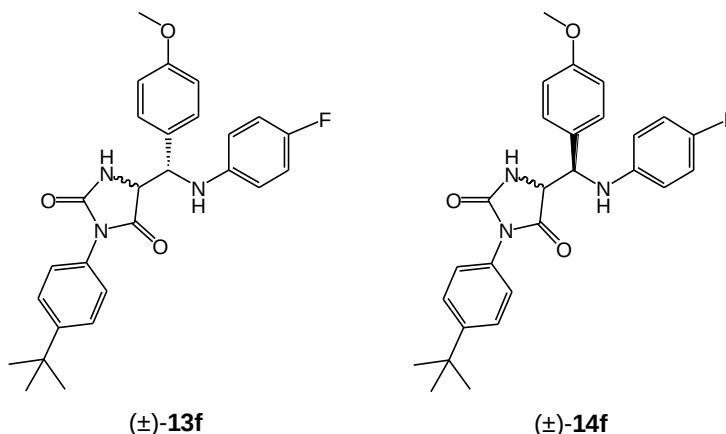
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 3,77 (s, CH₃O; 4-CH₃OC₆H₄); 4,52 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H, CH₂, C1a benzil) + 4,63 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H, CH₂, C1b benzil); 4,45 (dd, *J*₁ = 3,2 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H, CH hidantoin); 4,84 (dd, *J*₁ = 10,8 Hz, *J*₂ = 3,2 Hz, 1H, CH bočni lanac); 4,91 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,30 (s, 1H, NH hidantoin); 6,15–6,21 (m, 1H, benzil); 6,30–6,36 (m, 1H, benzil); 6,53–6,67 (m, 2H, C2 i C6 4-FC₆H₄); 6,73–6,96 (m, 6H, C3 i C5 4-FC₆H₄ + C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄ + 2H benzil); 7,10–7,21 (m, 3H, benzil); 7,28 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, 4-CH₃OC₆H₄), 7,37–7,42 (m, 1H, benzil).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 42,96 (CH₂ benzil); 56,50 (CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 57,99 (CH bočni lanac); 63,88 (CH hidantoin); 115,50 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 116,47 (d, *J* = 7,4 Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,86 (d, *J* = 22,7 Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 128,93 (C4 benzil); 128,75 (C3 i C5, benzil); 129,97 (C2 i C6, benzil); 130,06 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 131,86 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 138,15 (C1 benzil); 144,86 (d, *J* = 1,6 Hz, C1, 4-FC₆H₄); 157,36 (d, *J* = 233,3 Hz, C4, 4-FC₆H₄); 158,91 (NHC(=O)N); 160,86 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 174,02 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₄H₂₂FN₃O₃ (*M_r* = 419,1645): izračunato *m/z* 420,1723 [M+H]⁺, nađeno *m/z* 420,1725 [M+H]⁺.

RP-HPLC: *t_R*(14e) = 33,7 min

3.5.6. 3-(4-*tert*-Butilfenil)-5-[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil}imidazolidin-2,4-dion **13f/14f**



Dijastereomerna smjesa hidantoina **13f/14f** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **14o** (40 mg, 0,087 mmol) i 25%-tne otopine NaOMe (22,0 μ L, 0,096 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform-etil-acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je 35,5 mg (88,8 %) smjese dijastereomera **13f/14f**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,61$ (kloroform/etil-acetat = 4:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13f:14f** = 44,5:54,5 ($t_{R(13f)} = 50,3$ min i $t_{R(14f)} = 52,6$ min; metoda C). Dijastereomerna smjesa **13f/14f** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda F). Dobiveno je 12 mg izomera **13f** i 13 mg izomera **14f**.

13f

$t_f = 87,5\text{--}90,5\text{ }^\circ\text{C}$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 3237, 2963, 1770, 1716, 1610, 1509, 1462, 1364, 1253, 1223, 1178, 1109, 1031, 828.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 1,30 (s, 9H, *tert*-butil); 3,76 (s, 3H, OCH_3 , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,50 (dd, $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,89 (dd, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,08 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,48 (s, 1H, NH hidantoin); 6,62–6,68 (m, 2H, C2 i C6 4- FC_6H_4); 6,77–6,83 (m, 4H, C3 i C5 4- FC_6H_4 + C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 6,83–6,90 (m, 4H, 4-*t*- BuC_6H_4); 7,42 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 31,43 (3 x CH_3 , 4-*t*- BuC_6H_4); 55,94 (CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 57,90 (CH bočni lanac); 62,94 (CH hidantoin); 114,89 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,00 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 116,32 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 126,86

(C3 i C5, 4-*t*-BuC₆H₄); 127,40 (C2 i C6, 4-*t*-BuC₆H₄); 130,17 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 130,46 (C1, 4-*t*-BuC₆H₄); 130,31 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 144,38 (d, $J = 1,5$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 152,52 (C4, 4-*t*-BuC₆H₄); 156,87 (d, $J = 233,8$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,05 (NHC(=O)N); 160,70 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,07 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₇H₂₈FN₃O₃ ($M_r = 461,2115$): izračunato m/z 462,2193 [M+H]⁺, nađeno m/z 462,2187 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13f)} = 50,3$ min.

14f

$t_t = 233,9$ – $234,6$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 3237, 2963, 1770, 1716, 1610, 1509, 1462, 1364, 1253, 1223, 1178, 1109, 1031, 828.

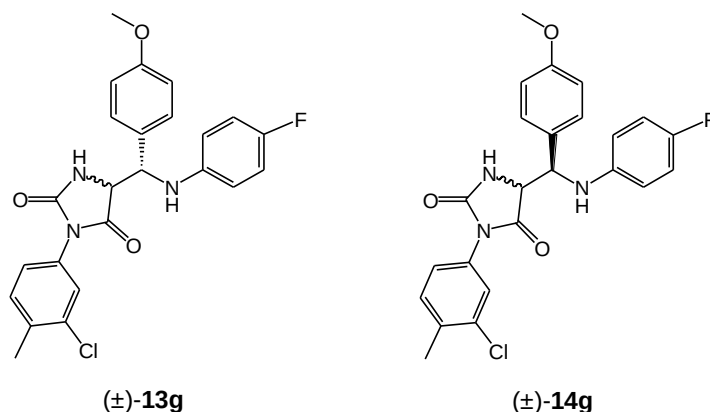
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 1,32 (s, 9H, *tert*-butil); 3,76 (s, 3H, OCH₃, 4-CH₃OC₆H₄); 4,64 (dd, $J_1 = 10,7$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,98 (dd, $J_1 = 10,7$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,39 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,62–6,68 (m, 2H, C2 i C6 4-FC₆H₄); 6,69 (s, 1H, NH hidantoin); 6,91 (t, $J = 9,0$ Hz, 2H, C3 i C5 4-FC₆H₄); 7,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄); 7,30–7,36 (m, 4H, 4-*t*-BuC₆H₄); 7,49 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, C2 i C6 4-CH₃OC₆H₄).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 31,47 (3 x CH₃, 4-*t*-BuC₆H₄); 55,97 (CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 59,77 (CH bočni lanac); 61,92 (CH hidantoin); 114,57 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,97 (d, $J = 7,4$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,25 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 126,93 (C3 i C5, 4-*t*-BuC₆H₄); 127,31 (C2 i C6, 4-*t*-BuC₆H₄); 129,38 (C1, 4-*t*-BuC₆H₄); 129,46 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,18 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 144,29 (d, $J = 1,5$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 152,49 (C4, 4-*t*-BuC₆H₄); 156,70 (d, $J = 233,5$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,54 (NHC(=O)N); 160,37 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,71 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₇H₂₈FN₃O₃ ($M_r = 461,2115$): izračunato m/z 462,2193 [M+H]⁺, nađeno m/z 462,2187 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14f)} = 52,6$ min.

3.5.7. 3-(3-klor-4-metilfenil)-5-[[[(4-Fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion **13g/14g**



Dijastereomerna smjesa hidantoina **13g/14g** dobivena je reakcijom β-laktamske uree **12p** (42 mg, 0,093 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (23,3 μL, 0,102 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etil-acetat u omjeru 2:1. Dobiveno je 30,1 mg (75,3 %) smjese dijastereomera **13g/14g**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,37$ (kloroform/etil-acetat = 2:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13g:14g** = 50:50 ($t_{R(13g)} = 36,9$ min i $t_{R(14g)} = 38,6$ min; metoda C). Dijastereomerna smjesa **13g/14g** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda F). Dobiveno je 12 mg izomera **13g** i 11 mg izomera **14g**.

13g

$t_f = 128,1\text{--}131,6\text{ }^\circ\text{C}$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3370, 1761, 1708, 1610, 1509, 1419, 1252, 1252, 1223, 1177, 1108, 1029, 819.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 2,37 (s, 3H, CH_3 , 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 3,76 (s, 3H, CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,64 (dd, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,88 (dd, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, 1H, CH bočni); 5,05 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,69 (s, 1H, NH hidantoin); 6,59–6,68 (m, 2H, C2 i C6 4- FC_6H_4), 6,73–6,83 (2H, C3 i C5 4- FC_6H_4 + C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,09 (dd, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, C6, 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 7,19 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, C5 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 7,29–7,36 (m, 2H, C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,33–7,38 (1H, C2 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 19,85 (CH_3 , 3-Cl-4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$); 55,97 (CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 59,80 (CH bočni lanac); 61,86 (CH hidantoin); 114,58 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$);

116,05 (d, $J = 7,6$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,32 (d, $J = 22,3$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 126,07 (C2, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 127,67 (C6, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 129,30 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 129,44 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,83 (C4, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 132,24 (C5, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 134,58 (C3, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 137,27 (C1, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 144,32 (d, $J = 1,7$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,89 (d, $J = 233,8$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 156,49 (NHC(=O)N); 160,39 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 172,29 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₄H₂₁ClFN₃O₃ ($M_r = 453,1255$): izračunato m/z 454,1333 [M+H]⁺, nađeno m/z 454,1329 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13g)} = 36,9$ min.

14g

$t_t = 207,3\text{--}208,9$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3370, 1761, 1708, 1610, 1509, 1419, 1252, 1252, 1223, 1177, 1108, 1029, 819.

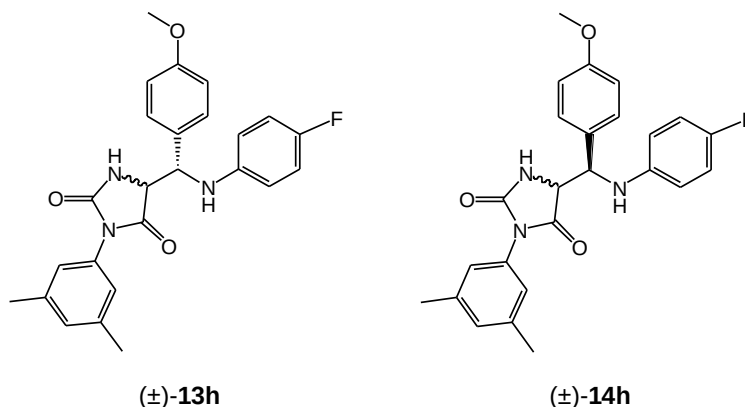
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 2,34 (s, 3H, CH₃, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 3,76 (s, 3H, CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 4,51 (dd, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,98 (dd, $J_1 = 10,7$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H, CH bočni); 5,34 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,46 (s, 1H, NH hidantoin); 6,63–6,68 (m, 2H, C2 i C6 4-FC₆H₄), 6,83 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H, C3 i C5 4-FC₆H₄), 6,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄); 7,09 (dd, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, C6, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 7,19 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, C5 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 7,33 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, C2 i C6 4-CH₃OC₆H₄); 7,36 (dd, 1H, C2 3-Cl-4-CH₃C₆H₃).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 19,82 (CH₃, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 55,94 (CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 57,88 (CH bočni lanac); 63,01 (CH hidantoin); 114,89 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 116,05 (d, $J = 7,6$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,26 (d, $J = 22,4$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 126,04 (C2, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 127,67 (C6, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 130,30 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,08 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 131,52 (C4, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 132,18 (C5, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 134,64 (C3, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 137,39 (C1, 3-Cl-4-CH₃C₆H₃); 144,24 (d, $J = 1,8$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,74 (d, $J = 233,3$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 156,97 (NHC(=O)N); 160,77 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 171,72 (NC(=O)CH).

HR-MS za C₂₄H₂₁ClFN₃O₃ ($M_r = 453,1255$): izračunato m/z 454,1333 [M+H]⁺, nađeno m/z 454,1329 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14g)} = 38,6$ min.

3.5.8. 3-(3,5-Dimetilfenil)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion **13h/14h**



Smjesa diastereomera hidantoina **13h/14h** dobivena je reakcijom β -laktamske uree **12r** (40 mg, 0,092 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (23,1 μ L, 0,101 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform-etilacetat u omjeru 2:1. Dobiveno je 23,5 mg (58,8 %) smjese diastereomera **13h/14h**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,39$ (kloroform/etil-acetat = 2:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer diastereomera **13h:14h** = 51,0:49,0 ($t_{R(13h)} = 45,8$ min i $t_{R(14h)} = 47,5$ min; metoda B). Dijastereomerna smjesa **13h/14h** odvojena je preparativnom HPLC s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda E). Dobiveno je 9 mg izomera **13h** i 8 mg izomera **14h**.

13h

$t_f = 101,4\text{--}104,0\text{ }^\circ\text{C}$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3353, 3248, 1771, 1706, 1611, 1509, 1438, 1411, 1358, 1279, 1254, 1221, 1173, 1108, 1029, 824.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 2,25 (s, 6H, 2 x CH_3 , 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 3,77 (s, 3H, CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,43 (dd, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,88 (dd, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, 1H, CH bočni); 5,05 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,41 (s, 2H, C2 i C6, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 6,79–6,89 (m, 4H, Ar-H); 6,99 (s, 1H, C4, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 6,89–6,94 (m, 4H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 21,12 (2 x CH_3 , 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 55,93 (CH_3O , 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 59,80 (CH bočni lanac); 61,87 (CH hidantoin); 114,56 (C3 i C5, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 115,00 (d, $J = 7,5$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 116,32 (d, $J = 22,4$ Hz, C3 i C5, 4- FC_6H_4); 125,47 (C2 i C6, 3,5- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 130,38 (C2 i C6, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$); 129,36 (C1, 4- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_4$);

130,81 (C4, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 132,70 (C3 i C5, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 139,80 (C1, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 144,27 (d, $J = 1,8$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,88 (d, $J = 233,6$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,05 (NH $\underline{C}(=O)$ N); 160,78 (C4, 4-OCH₃C₆H₄); 172,04 (N $\underline{C}(=O)$ CH).

HR-MS za C₂₅H₂₄FN₃O₃ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 [M+H]⁺, nađeno m/z 434,1876 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13h)} = 45,8$ min.

14h

$t_t = 202,3\text{--}206,4$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3353, 3248, 1771, 1706, 1611, 1509, 1438, 1411, 1358, 1279, 1254, 1221, 1173, 1108, 1029, 824.

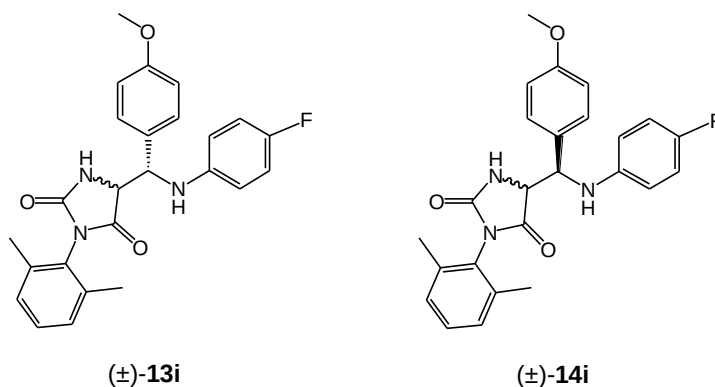
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 2,30 (s, 6H, 2 x CH₃, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 3,77 (s, 3H, CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 4,49 (dd, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,97 (dd, $J_1 = 10,6$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H, CH bočni); 5,37 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,41 (s, 1H, NH hidantoin); 6,62–6,69 (m, 4H, Ar-H), 6,75 (s, 2H, C2 i C6, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 7,04 (s, 1H, C4, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 6,62–6,69 (m, 4H, Ar-H); 7,29–7,36 (m, 4H, Ar-H).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 21,20 (2 x CH₃, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 55,93 (CH₃O, 4-OCH₃C₆H₄); 57,87 (CH bočni lanac); 62,93 (CH hidantoin); 114,87 (C3 i C5, 4-OCH₃C₆H₄); 115,50 (d, $J = 7,5$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,25 (d, $J = 22,3$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 125,48 (C2 i C6, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 129,47 (C2 i C6, 4-OCH₃C₆H₄); 130,80 (C4, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 131,16 (C1, 4-OCH₃C₆H₄); 132,95 (C3 i C5, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 139,87 (C1, 3,5-(CH₃)₂C₆H₃); 144,36 (d, $J = 1,7$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,71 (d, $J = 233,5$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 157,48 (NH $\underline{C}(=O)$ N); 160,39 (C4, 4-OCH₃C₆H₄); 172,65 (N $\underline{C}(=O)$ CH).

HR-MS za C₂₅H₂₄FN₃O₃ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 [M+H]⁺, nađeno m/z 434,1876 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14h)} = 47,5$ min.

3.5.9. 3-(2,6-Dimetilfenil)-5-[[[(4-fluorfenil)amino](4-metoksifenil)metil]imidazolidin-2,4-dion **13i/14i**



Dijastereomerna smjesa hidantoina **13i/14i** dobivena je reakcijom β-laktamske uree **12t** (45 mg, 0,104 mmol) i 25%-tne otopine natrijevog metoksida (26,1 μL, 0,114 mmol) u metanolu. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala kloroform/etilacetat u omjeru 2:1. Dobiveno je 34,1 mg (75,8 %) smjese dijastereomera **13i/14i**, koja na TLC-u pokazuju jednu mrlju $R_f = 0,56$ (kloroform/etil-acetat = 4:1). HPLC analizom na koloni Zorbax Extend-C18 utvrđen je omjer dijastereomera **13i:14i** = 46,9:53,1 ($t_{R(13i)} = 42,5$ min i $t_{R(14i)} = 44,2$ min; metoda B). Dijastereomerna smjesa **13i/14i** odvojena je na preparativnom HPLC-u s Zorbax Extend-C18 PrepHT kolonom (metoda F). Dobiveno je 14 mg izomera **13i** i 14 mg izomera **14i**.

13i

$$t_f = 115,7\text{--}117,3\text{ }^{\circ}\text{C}$$

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 2929, 1781, 1712, 1611, 1508, 1479, 1442, 1404, 1250, 1177, 1216, 1109, 1031, 823.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 2,09 (s, 3H, CH_3 , 2,6- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 2,19 (s, 3H, CH_3 , 2,6- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 3,75 (s, 3H, CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 4,85 (dd, $J_1 = 3,5$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H, CH hidantoin); 4,95 (dd, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, 1H, CH bočni lanac); 5,01 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,52 (s, 1H, NH hidantoin); 6,62–6,69 (m, 2H, C2 i C6 4- FC_6H_4), 6,80–6,88 (m, 4H, C2 i C6 4- FC_6H_4 + C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 7,01 (t, 1H, C4, 2,6- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 7,18 (dd, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, 2H, C3 i C5, 2,6- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 7,35 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 16,65 (2 x CH_3 , 2,6- $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3$); 55,97 (CH_3O , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 59,14 (CH bočni lanac); 62,34 (CH hidantoin); 114,87 (C3 i C5, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 115,06 (d, $J = 7,6$ Hz, C2 i C6, 4- FC_6H_4); 116,34 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4-

FC₆H₄); 129,04; 129,06 (C3 i C5, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 130,20 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 130,83 (C1, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 130,88 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 131,21 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 137,86; 138,01 (C2 i C6, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 144,19 (d, $J = 1,8$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,66 (NH $\underline{C}(=O)N$); 156,90 (d, $J = 233,9$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 160,92 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 171,52 (NC $\underline{(=O)CH}$).

HR-MS za C₂₅H₂₄FN₃O₃ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 [M+H]⁺, nađeno m/z 434,1872 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(13i)} = 42,5$ min.

14i

$t_t = 168,6\text{--}170,8$ °C

FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 2929, 1781, 1712, 1611, 1508, 1479, 1442, 1404, 1250, 1177, 1216, 1109, 1031, 823.

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 1,99 (s, 3H, CH₃, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 2,14 (s, 3H, CH₃, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 3,77 (s, 3H, CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 4,66 (dd, $J_1 = 2,9$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, CH hidantoin); 5,05 (dd, $J_1 = 11,2$ Hz, $J_2 = 2,9$ Hz, 1H, CH bočni); 5,43 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH bočni lanac); 6,77 (s, 1H, NH hidantoin); 6,62–6,69 (m, 2H, C2 i C6 4-FC₆H₄), 6,88 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, C3 i C5 4-FC₆H₄); 6,93 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄); 7,25 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, C4 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 7,12 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, C3 i C5, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 7,37 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, C3 i C5 4-CH₃OC₆H₄).

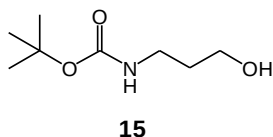
¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ/ppm : 17,96 (2 x CH₃, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 55,94 (CH₃O, 4-CH₃OC₆H₄); 57,32 (CH bočni lanac); 64,07 (CH hidantoin); 115,05 (C3 i C5, 4-CH₃OC₆H₄); 115,98 (d, $J = 7,5$ Hz, C2 i C6, 4-FC₆H₄); 116,28 (d, $J = 22,5$ Hz, C3 i C5, 4-FC₆H₄); 129,38 (C2 i C6, 4-CH₃OC₆H₄); 129,15; 129,25 (C3 i C5, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 129,38 (C2 i C6, 4-OCH₃C₆H₃); 129,52 (C1, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 130,29 (C3 i C5, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 131,47 (C1, 4-CH₃OC₆H₄); 137,86; 138,01 (C2 i C6, 2,6-(CH₃)₂C₆H₃); 144,19 (d, $J = 1,8$ Hz, C1, 4-FC₆H₄); 156,66 (NH $\underline{C}(=O)N$); 156,90 (d, $J = 233,9$ Hz, C4, 4-FC₆H₄); 160,92 (C4, 4-CH₃OC₆H₄); 171,52 (NC $\underline{(=O)CH}$).

HR-MS za C₂₅H₂₄FN₃O₃ ($M_r = 433,1802$): izračunato m/z 434,1880 [M+H]⁺, nađeno m/z 454,1872 [M+H]⁺.

RP-HPLC: Zorbax Extend-C18, $t_{R(14i)} = 44,2$ min.

3.6. Sinteza fenilamino-derivata parazoantina A i F

3.6.1. Priprava *tert*-butilnog estera *N*-(3-hidroksil-propil)karbaminske kiseline **15**



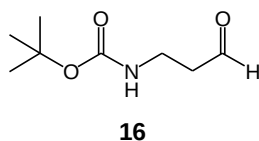
U 3-aminopropan-1-ol (3 mL, 13,074 mmol) dodani su di-*tert*-butil-dikarbonat (3 mL, 13,074 mmol) i katalitička količina joda (332 mg, 1,307 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 2,5 h na sobnoj temperaturi. Dodan je dietil-eter (150 mL), a zatim je smjesa isprana 5 %-tnom vodenom otopinom natrijeva tiosulfata (50 mL) i zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata (50 mL). Organski sloj osušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi reakcijski produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat u omjeru 1:1. Dobiveno je 5,67 g (78 %) spoja **15** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,33 (s, 9H, 3 x CH_3); 1,55 (p, 2H, $J = 6,0$ Hz, CH_2); 3,17 (q, 2H, $J = 6,3$ Hz, CH_2); 3,54 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH_2); 4,76 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 28,48 (2 x CH_3 , Boc); 32,96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 37,18 (CH_2NH); 59,41 (CH_2OH); 79,77 (CH); 157,25 ($\text{C}=\text{O}$, Boc).

ESI-MS za $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ ($M_r = 175,2280$): izračunato m/z 198,22 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 198,28 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.6.2. Priprava *tert*-butilnog estera *N*-(3-okso-propil)karbaminske kiseline **16**



U bezvodni diklormetan (54 mL) dodan je bezvodni dimetil-sulfoksid (1,8 mL, 25,27 mmol). Otopina je ohlađena na -78°C u atmosferi argona. Ohlađenoj otopini polako je dokapan oksalil-klorid (1,1 mL, 12,67 mmol) i dobivena smjesa miješala se 15 minuta na -78°C , nakon čega je polako dokapana otopina *tert*-butilnog estera *N*-(3-hidroksil-propil)karbaminske kiseline **15** (1,47 g, 8,39 mmol) u bezvodnom diklormetanu. Reakcijska smjesa miješana je 1 sat pri -78°C prije nego je dodan bezvodni trietilamin (5,8 mL, 41,95 mmol). Nakon dodatka trietilamina temperatura je polako podignuta do sobne temperature i miješanje je nastavljeno

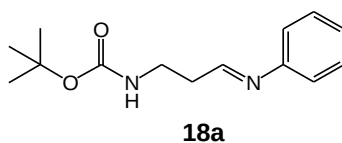
idućih 30 minuta. Reakcija je prekinuta dodavanjem 10 %-tne vodene otopine klorovodične kiseline (15 mL) te ekstrahirana s etil-acetatom (3 x 30 mL). Organski slojevi su spojeni, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 1,39 g (95,8 %) spoja **16** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 1,33 (s, 9H, 3 x CH_3); 1,55 (p, 2H, $J = 6,0$ Hz, CH_2); 3,17 (q, 2H, $J = 6,3$ Hz, CH_2); 3,54 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH_2); 4,92 (s, 1H, NH); 9,81 (s, 1H, CHO).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 28,48 (2 x CH_3 , Boc); 32,96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 37,18 (CH_2NH); 59,41 (CH_2OH); 79,77 (CH); 157,25 ($\text{C}=\text{O}$, Boc).

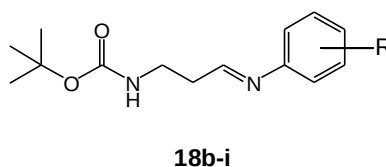
HR-MS za $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_3$ ($M_r = 173,2120$): izračunato m/z 196,0950 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 196,0953 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.6.3. Priprava tert-butilnog estera *N*-[(3-fenilimino)propil]karbaminske kiseline **18a**



Otopini spoja **16** (200 mg, 1,154 mmol) u bezvodnom diklormetanu (5 mL) dodan je anilin (105 μL , 1,154 mmol) uz snažno miješanje reakcijske smjese. Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi tijekom 20 sati, nakon čega je otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 130 mg sirovog produkta u obliku žutog ulja.

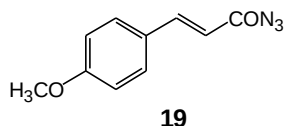
3.6.4. Priprava imina **18b-i**



Pokušane su sinteze imina **18b-i** s dobivenim aldehidom **16** i raznim komercijalnim anilinima. Korišteni su: 2-izopropilanilin, 3-metoksianilin, 4-kloranilin, 4-fluoranilin, 4-butilanilin, 2,6-dimetilanilin, 3,5-dimetilanilin i 3,5-dimetoksianilin, a kao otapalo korišten je diklormetan. Kao sredstvo za vezanje vode korišten je bezvodni magnezijev sulfat.

Otopini spoja **16** (1 ekv.) u bezvodnom diklormetanu (5 mL) dodan je odgovarajući anilin (1 ekv.) uz snažno miješanje reakcijske smjese. Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi tijekom 20 sati, nakon čega je otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču.

3.6.5. Priprava 3-(4-metoksifenil)akrilil-azida **19**

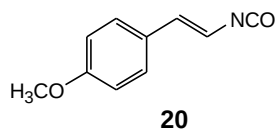


4-metoksicimtna kiselina (2 g, 11,220 mmol) suspendirana je u vodi (5 mL). Aceton je dodavan dok se kiselina nije otopila, a potom je otopina ohlađena na 0 °C. U ohlađenu otopinu dodana je otopina trietilamina (1,9 mL, 13,464 mmol) u acetonu (23 mL) i otopina etil-klorformijat (1,4 mL, 14,586 mmol) u acetonu (6 mL). Reakcijska smjesa miješana je 30 minuta na 0 °C, nakon čega je dokapana otopina natrijevog azida (1,1 g, 16,830 mmol) u vodi (5 mL). Nakon dodatka azida reakcija je miješana 1 sat na 0 °C. Reakcijska smjesa je nakon završetka reakcije izlivena u hladnu vodu (50 mL) te ekstrahirana s *tert*-butil-metilnim-eterom (3 x 100 mL). Organski slojevi su spojeni, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Sirovi acil-azid pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat u omjeru 1:1. Dobiveno je 1,65 g (72,4 %) spoja **19** u obliku žutih kristala.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 3,78 (s, 3H, OCH_3); 6,31 (d, 2H, $J = 16,1$ Hz, CH_2); 6,90 (d, 2H, $J = 8,42$ Hz, CH_2); 7,46 (d, $J = 8,42$ Hz, 2H, Ar-H); 7,73 (d, $J = 8,42$ Hz, 2H, Ar-H).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 55,57 (OCH_3); 114,64 (C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 116,61 ($\text{CH}=\text{C}(\text{O})\text{N}_3$); 126,69 (C1 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 130,55 (C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 146,63 ($\text{CH}=\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ -4); 162,25 (C4 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$), 172,31 (C=O).

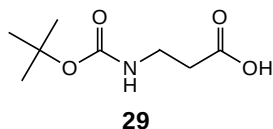
HR-MS za $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ ($M_r = 203,2010$): izračunato m/z 226,0592 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 226,0596 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.6.6. Priprava 1-(2-izocijanatovinil)-4-metoksibenzena **20**

Otopina acil-azida **19** (730 mg, 3,593 mmol) u bezvodnom toluenu (6 mL) grijana je na 68 °C preko noći, nakon čega je otapalo upareno na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 616 mg (97,9 %) spoja **20** u obliku žutog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 3,77 (s, 3H, OCH_3); 6,39 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H, CH); 6,66 (d, $J = 13,8$ Hz, 1H, CH_2); 6,88 (d, $J = 8,76$ Hz, 2H, Ar-H); 7,73 (d, $J = 8,76$ Hz, 2H, Ar-H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 55,91 (OCH_3); 115,14 (C3 i C5 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 117,51 ($\text{CH}=\text{NCO}$); 125,80 ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$); 126,65 ($\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3-4$); 128,23 (C2 i C6 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 128,31 (C1 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$); 160,53 (C4 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$).

3.6.7. Priprava 3-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]propionske kiseline **29**

U otopinu di-*tert*-butil-dikarbonata (25,7 mL, 0,112 mol) u etanolu (20 mL) dodan je amberlist 15 (10 % mase β -alanina, 400 mg) i smjesa je zagrijana na 45 °C. U zagrijanu smjesu dodan je β -alanina (4 g, 0,045 mol). Reakcijska smjesa miješana je 24 sata na 45 °C, a potom je profiltrirana i otapalo je upareno na rotacijskom vakuumskom uparivaču, a ostatak nakon uparavanja suspendiran je u heksanu. Smjesa je snažno miješana 2 minute, a zatim profiltrirana preko sinter lijevka. Dobiveno je 7,45 g (88 %) produkta **29** u obliku bijelog praha.

$t_{\text{f}} = 76,4\text{--}77,8$ °C

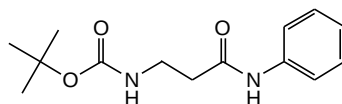
FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3440, 2967, 2912, 1699, 1510, 1440, 1407, 1366, 1292, 1236, 1159, 979, 937, 862, 837.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 1,45 (s, 3 x CH_3 , *tert*-butil); 2,58 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$); 3,39 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 5,05 (s, 1H, NH); 10,50 (bs, 1H, OH).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 28,50 (3 x CH_3 , *tert*-butil); 34,62 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$); 36,00 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NHCOO}$); 79,83 (C, *tert*-butil); 156,07 (OC(=O)NH); 177,75 (C(=O)NHPh).

HR-MS za $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_4$ ($M_r = 189,1001$): izračunato m/z 212,0899 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 212,0894 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.6.8. Priprava *tert*-butilnog 3-okso-3-[(fenilamino)propil]karbamata **30**



30

U otopinu β -alanina (500 mg, 2,643 mmol) u bezvodnom diklometanu (10 mL) dodani su tionil-klorid (192 μL , 2,643 mmol), trietilamin (1,1 mL, 7,292 mmol) i anilin (241 μL , 2,643 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 1 sat na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je isprana s 1 mol L^{-1} vodenom otopinom natrijeva hidrogensulfata i zatim 1 mol L^{-1} vodenom otopinom natrijeva hidroksida. Organski sloj osušen je nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 419 mg (60 %) produkta **30** u obliku bijelog praha.

$$t_{\text{f}} = 168,2\text{--}169,8\text{ }^{\circ}\text{C}$$

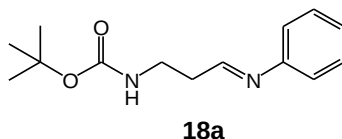
FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3380, 3314, 3146, 2979, 1671, 1603, 1546, 1522, 1498, 1427, 1411, 1310, 1287, 1182, 1162, 1084, 982,.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 1,27 (s, 3 x CH_3 , *tert*-butil); 2,54 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CONHPh}$); 3,43 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NHCOO}$); 5,20 (s, 1H, NHCOO); 7,05 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, C4 fenil); 7,15-7,33 (m, 2H, C3 i C5 fenil); 7,48 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, C2 i C6 fenil); 7,85 (s, 1H, NH amid).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ/ppm : 28,53 (3 x CH_3 , *tert*-butil); 36,64 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CONHPh}$); 37,73 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NHCOO}$); 79,79 (C, *tert*-butil); 119,99 (C2 i C6 fenil); 124,47 (C4 fenil); 129,11 (C3 i C5 fenil); 137,99 (C1 fenil); 156,50 (OC(=O)NH); 169,83 (C(=O)NHPh).

HR-MS za $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ ($M_r = 264,1474$): izračunato m/z 287,1372 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nađeno m/z 287,1367 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.6.9. Priprava tert-butilnog estera *N*-[3-fenilimino)propil]karbaminske kiseline **18a** redukcijom sekundarnog amida **30**



Amid **30** (400 mg, 1,513 mmol) otopljen je u diklormetanu (6 mL, $c(\mathbf{29}) = 0,25 \text{ mol dm}^{-3}$), a potom je dodan 2-fluorpiridin (143 μL , 1,664 mmol). Reakcijska smjesa ohlađena je na -78°C u aceton/suhi led kupelji. Reakcija smjesa miješala se 10 minuta na -78°C , a potom je dokapan anhidrid trifluormetansulfonske kiseline (267 μL , 1,589 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 10 minuta na -78°C , a zatim 10 minuta na 0°C . U reakcijsku smjesu dokapan je trietilsilan (266 μL , 1,664 mmol) i smjesa je miješana sljedećih 10 minuta na 0°C , a potom je postepeno podignuta do sobne temperature i miješanje je nastavljeno sljedećih 5 sati. Reakcija je prekinuta dodavanjem zasićene otopine natrijeva hidrogensulfata, a potom je ekstrahirana diklormetanom (3 x 10 mL). Spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltrirani i otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveno je 140 mg produkta u obliku žutog ulja.

3.7. Enantioseparacija ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** i ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-j** i **14a-j**

3.7.1. Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

3.7.1.1. Utjecaj kiralne nepokretne faze

Otopine uzoraka ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** pripravljene su u masenoj koncentraciji od $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ otapanjem 1 mg uzorka u 5 mL metanola uz primjenu ultrazvučne kupelji. Njihova analiza provedena je na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama koje su utemeljene na derivatima celuloze (Chiralcel OD-3, Chiralcel OJ, Chirallica PST-10, Chiralcel IB i Chiralpak IC), amiloze (Chiralpak AD-3, Chiralpak AS-3 i Chiralpak IA) i levana (Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9) koristeći metanol kao pokretnu fazu. Protok pokretne faze bio je $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, radna temperatura kolone 30°C , radna valna duljina detektora 254 nm, a volumen injektiranja 20 μL .

3.7.1.2. Utjecaj temperature

Uzorci za analizu pripremljeni su prema postupku opisanom u odjeljku 3.7.1.1. Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12b-f**, **12h-j** i **12m-r** provedeno je na koloni Chirallica PST-10 pri različitim temperaturama kolone (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 i 45 °C) uz metanol kao pokretnu fazu. Protok pokretne faze bio je 1,0 mLmin⁻¹, radna valna duljina detektora 254 nm, a volumen injektiranja 20 μ L.

3.7.2. Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** primjenom superkritične fluidne kromatografije

3.7.2.1. Utjecaj kiralne nepokretne faze

Otopine uzoraka ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** pripremljene su u masenoj koncentraciji od 0,5 mg mL⁻¹ otapanjem 1 mg uzorka u 2 mL metanola uz primjenu ultrazvučne kupelji. Njihova analiza provedena je na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama koje su utemeljene na derivatima celuloze (Chiralcel OD-3, Chiralcel IB i Chirallica PST-10) i amiloze (Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA) koristeći CO₂/metanol (70:30, v/v) kao pokretnu fazu. Protok pokretne faze bio je 4,0 mL min⁻¹, radna temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa, a volumen injektiranja 20 μ L. Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 254 nm te se snimalo UV područje od 190 do 400 nm.

3.7.2.2. Utjecaj modifikatora

Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** provedeno je na celuloznoj koloni Chirallica PST-10 koristeći superkritični ugljikov(IV) oksid s dodatkom alkoholnog modifikatora. Kao modifikatori korišteni su metanol, etanol i propan-2-ol. Uzorci su analizirani uz pokretne faze sljedećeg sastava: CO₂/metanol (70:30, v/v), CO₂/etanol (70:30, V/V) i CO₂/propan-2-ol (70:30, v/v). Protok pokretne faze bio je 4,0 mLmin⁻¹, radna temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa, a volumen injektiranja 20 μ L. Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 254 nm te se snimalo UV područje od 190 do 400 nm.

3.7.2.3. Utjecaj bazičnog aditiva

Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** provedeno je na celuloznoj koloni Chirallica PST-10 koristeći superkritični ugljikov(IV) oksid s dodatkom bazičnog aditiva, odnosno izopropilamina. Uzorci su analizirani uz pokretne faze sljedećeg sastava CO₂/metanol/izopropilamin (70:30:0,1; v/v/v) i CO₂/metanol/izopropilamin (70:30:0,2; v/v/v). Protok pokretne faze bio je 4,0 mL min⁻¹, radna temperatura kolone 30 °C, povratni tlak 11 MPa, a volumen injektiranja 20 μ L. Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 254 nm te se snimalo UV područje od 190 do 400 nm.

3.7.2.4. Utjecaj temperature kolone

Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** provedeno je na koloni Chirallica PST-10 na različitim temperaturama (29, 32, 35, 38 i 41 °C) uz CO₂/metanol (70:30, v/v) kao pokretnu fazu. Protok pokretne faze bio je 4,0 mL min⁻¹, povratni tlak 11 MPa, a volumen injektiranja 20 μ L. Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 254 nm te se snimalo UV područje od 190 do 400 nm.

3.7.2.5. Utjecaj povratnog tlaka

Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** provedeno je na celuloznoj koloni Chirallica PST-10 pri različitim povratnim tlakovima (11, 12, 13, 14 i 15 MPa) uz CO₂/metanol (70:30, v/v) kao pokretnu fazu. Protok pokretne faze bio je 4,0 mL min⁻¹, radna temperatura kolone 35 °C, a volumen injektiranja 20 μ L. Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 254 nm te se snimalo UV područje od 190 do 400 nm.

3.7.3. Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Otopine uzoraka ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** pripravljene su u masenoj koncentraciji od 0,5 mg mL⁻¹ otapanjem 1 mg uzorka u 1 mL heksan/propan-2-ola uz primjenu ultrazvučne kupelji. Njihova analiza provedena je na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama koje su utemeljene na derivatima celuloze (Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB) i amiloze (Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA) koristeći heksan/propan-2-ol (90:10, v/v) kao pokretnu fazu.

Protok pokretne faze bio je $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, radna temperatura kolone $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, radna valna duljina detektora 254 nm , a volumen injektiranja $20 \text{ }\mu\text{L}$.

3.8. Biološki eksperimentalni dio

3.8.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antibakterijsko djelovanje nosintetiziranih *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** određeno je neznatno modifikiranom metodom mikrodilucije u bujonu prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*)¹⁶¹ na sojevima *Escherichia coli* NCTC 12241, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903. Svi uzorci *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** otopljeni su u dimetil-sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$ i razrijeđeni su kationski podešenim Mueller-Hinton bujonom (engl. *Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth, CAMHB*) u rasponu koncentracija od $128\text{--}0,125 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Za pripremu inokuluma, ispitivane su bakterijske kulture nasadene na triptikaza sojinom agaru i inkubirane aerobno na temperaturi od $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći. Nakon toga, napravljena je suspenzija bakterijskog soja koncentracije od 0,5 MacFarlanda turbidimetrijskom metodom u 5 mL sterilnog 0,85% suspenzijskog medija. Tako priređena suspenzija razrijeđena je s sterilnim CAMHB-om da bi se postigla radna koncentracija od $1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$. U prvi stupac mikrotitarske ploče stavljeno je $100 \text{ }\mu\text{L}$ *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** otopljenih pri $256 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ u CAMHB-u (pri 4 % DMSO), a u stupce od 2–11 stavljeno je $50 \text{ }\mu\text{L}$ sterilnog CAMHB-a. Zatim je serijskom dilucijom s $50 \text{ }\mu\text{L}$ napravljeno dvostruko razrijeđenje od stupaca 1–10. $50 \text{ }\mu\text{L}$ radne bakterijske suspenzije ($1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ u CAMHB-u) dodano je u svaku jažicu stupaca 1–11 da bi se postigla konačna koncentracija spojeva *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** u rasponu od $128\text{--}0,125 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (pri 2 % DMSO) sa koncentracijom bakterijskih sojeva od $5 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ u volumenu od $100 \text{ }\mu\text{L}$. Stupac 11 korišten je za pozitivnu kontrolu rasta bakterija (samo bakterijski soj u CAMHB-u), a stupac 12 za negativnu kontrolu sterilnosti medija (samo CAMHB). Mikrotitarske ploče inkubirane su 20 ± 2 sati na $35 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Sva ispitivanja provedena su u dva neovisna navrata svaki put u tehničkim duplikatima. Svaka eksperimentalna proba uključivala je pozitivne (jažice bez standarda lijeka i uzorka) i negativne (samo sterilni mediji) kontrole i kontrolu kvalitete korištenjem kloramfenikola. Minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *Minimal Inhibitory Concentration, MIC*) je najniža koncentracija pri kojoj antimikrobna tvar u potpunosti inhibira rast mikroorganizma.¹⁶² Nakon inkubacije se vizualno ustanovi ima li замуćenja u jažici.

Spektrofotometrijska apsorbancija izmjerena je pomoću čitača mikroploča pri valnoj duljini apsorbancije od 600 nm. Minimalne inhibitorne koncentracije, ako su primjećene, potvrđene su kultivacijom 50 μL sadržaja jažice na Mueller-Hinton agaru pri 35 °C trajanju od 24–48 sati. Također, antifungalno djelovanje novosintetiziranih *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** određeno je metodom mikrodilucije u bujonu prema CLSI smjernicama¹⁶³ na sojevima *Candida albicans* ATCC 90028 i *Saccharomyces cerevisiae* BY 4741. Svi uzorci *trans*- β -laktamskih urea **12a-v** pripremljeni su kao i za ispitivanje antibakterijskog djelovanja osim što su korišteni YPD bujon i agar mediji za kultivaciju inkubirani 48 sati na 30 ± 1 °C te su jažice mikrotitarske ploče inokulirane u koncentraciji od 5×10^3 CFU mL^{-1} . Antifungalno sredstvo nistatin korišteno je za kontrolu kvalitete.

3.8.2. Određivanje antitumorske aktivnosti

Utjecaj pripravljenih *trans*- β -laktamskih urea **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t** i 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** na stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), karcinoma jajnika (A2780), karcinoma dojke (MCF-7) i netransformirane stanice ljudskih fibroblasta (HFF-1), provedeno je kolorimetrijskim MTT testom.¹⁶⁴ MTT metoda određivanja preživljavanja stanica u nazočnosti potencijalno toksičnog agensa temelji se na određivanju aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza živih stanica koje kataliziraju pretvorbu žuto obojenog (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT-a) u ljubičasti talog formazana, čiji su kristali topljivi u dimetil-sulfoksidu (DMSO). Stanice HepG2, A2780 i HFF-1 nasadene su u koncentraciji od 1×10^5 stanica mL^{-1} , a stanice MCF-7 nasadene su u koncentraciji od 2×10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su inkubirane preko noći, te su potom dodani testirani spojevi u rang koncentracija 100–0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon 72 h inkubacije, medij je odliven i u svaku jažicu dodan je MTT te je slijedila inkubacija tijekom 4 h. Nastali kristali formazana su potom otopljeni u dimetil-sulfoksidu. Apsorbancija je očitana na čitaču mikrotitarskih ploča (Hidex Chameleon V čitaču) pri valnoj duljini na 595 nm. Postotak stanične proliferacije pod utjecajem derivata purina u odnosu na kontrolne stanice izračunat je prema izrazu:

$$\text{Postotak rasta} = \frac{(A - \text{Blank})}{(B - \text{Blank})} \times 100 \quad (1.1)$$

gdje je A apsorbancija stanica nakon inkubacije s ispitivanim spojevima, B apsorbancija stanica bez stimulacije, a Blank je apsorbancija MTT-a s dimetil-sulfoksidom.

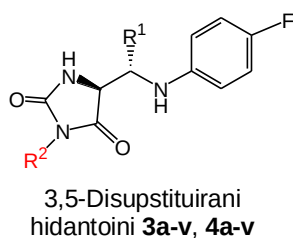
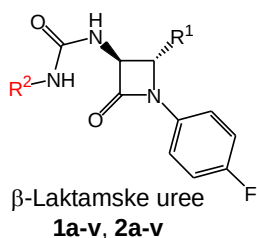
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. *In silico* karakterizacija *trans*- β -laktamskih urea, 3,5-disupstituiranih hidantoina, parazoantina A-J i fenilamino-derivata parazoantina A i F

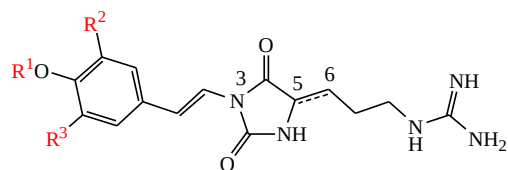
Primjenom programa za predviđanje ADMET svojstava, u ovom radu proučavani su spojevi koji se mogu svrstati u tri skupine, Slika 19:

- a) *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**,
- b) 3,5-disupstituirane hidantoina **3a-v** i **4a-v** i
- c) parazoantine **5a-l**.

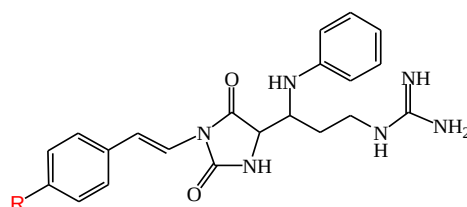
Rezultati dobiveni predviđanjem uspoređeni su s rezultatima predviđenim za ezetimib i njegove amidne analoge **TD1-6** te s poznatim eksperimentalnim podacima za lijek ezetimib, Slika 20.¹⁶⁵⁻¹⁷² Pripravljene ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **1a-v** s bočnom skupinama na N-1 položaju β -laktamskog prstena odgovaraju amidima **TD1-6**, koje su 2014. godine pripravili Dražić i suradnici, Slika 20.⁵³ Amidi **TD1-6** konfiguracijom na C-3 i C-4 kiralnim centrima β -laktamskog prstena, te bočnim skupinama na N-1 i C-4 pozicijama odgovaraju lijeku ezetimibu, Slika 20. Ezetimib pripada skupini lijekova koji snižavaju razinu lipida tako što selektivno inhibiraju apsorpciju kolesterola i biljnih sterola u crijevima.¹⁷³ Ezetimib inhibira transporter sterola NPC1L1 (engl. *Niemann-Pick C1-Like Intracellular Cholesterol Transporter 1*) koji unosi kolesterol i fitosterol iz crijeva u krv, i tako smanjuje njihov dotok u jetru. Često se koristi u kombinaciji sa statinima zbog njihovog komplementarnog učinka. Primjena ezetimiba sa statinima smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika koji imaju koronarnu bolest srca.^{174,175}



- | | |
|---|--|
| a , R^2 =alil | l , R^2 =3-Cl-C ₆ H ₄ |
| b , R^2 =heksil | m , R^2 =4-Cl-C ₆ H ₄ |
| c , R^2 = ciklopentil | n , R^2 =4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ |
| d , R^2 =cikloheksil | o , R^2 =4-C(CH ₃) ₃ -C ₆ H ₄ |
| e , R^2 = 4-fenilbutil | p , R^2 =3-Cl-4-CH ₃ -C ₆ H ₃ |
| f , R^2 =furfuril | r , R^2 =3,5-(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ |
| g , R^2 =C ₆ H ₅ | s , R^2 =3,5-(CF ₃) ₂ -C ₆ H ₃ |
| h , R^2 =C ₆ H ₅ -CH ₂ | t , R^2 =2,6-(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ |
| i , R^2 =C ₆ H ₅ -CH(CH ₃) | u , R^2 =2,6-((CH ₃) ₂ CH) ₂ -C ₆ H ₃ |
| j , R^2 =C ₆ H ₅ -C(=O) | v , R^2 =1-naftil |
| k , R^2 =2-Cl-C ₆ H ₄ | |



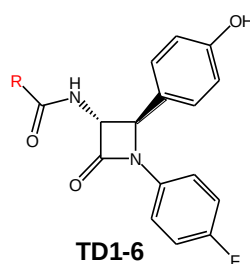
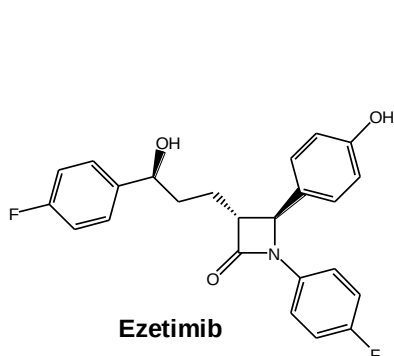
- Parazoantin A (5a):** R^1 =H, R^2 =H, R^3 =H
Parazoantin B (5b): R^1 =H, R^2 =H, R^3 =H $\Delta^{5,6}$
Parazoantin C (5c): R^1 =CH₃, R^2 =H, R^3 =H $\Delta^{5,6}$
Parazoantin D (5d): R^1 =CH₃, R^2 =Br, R^3 =H
Parazoantin E (5e): R^1 =CH₃, R^2 =Br, R^3 =H $\Delta^{5,6}$
Parazoantin F (5f): R^1 =CH₃, R^2 =H, R^3 =H
Parazoantin G (5g): R^1 =H, R^2 =Br, R^3 =H
Parazoantin H (5h): R^1 =H, R^2 =Br, R^3 =H $\Delta^{5,6}$
Parazoantin I (5i): R^1 =CH₃, R^2 =Br, R^3 =Br
Parazoantin I (5j): R^1 =CH₃, R^2 =Br, R^3 =Br $\Delta^{5,6}$



**Fenilamino derivati
parazoantina A i F**

- 5k**, R=OH
5l, R=OCH₃

Slika 19. Kemijske strukture β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituירanih hidantoina **3a-v** i **4a-v**, prirodnih parazoantina **5a-l** i fenilamino-derivata parazoantina A **5k** i F **5l** proučavanih u ovom radu



- TD1**, R=(E)-C₆H₅-CH=CH-
TD2, R=(E)-(4-F-C₆H₄)-CH=CH-
TD3, R=C₆H₅-CH₂-
TD4, R=4-F-C₆H₄-CH₂-
TD5, R=C₆H₅-
TD6, R=4-F-C₆H₄-

Slika 20. Kemijska struktura ezetimiba i β -laktamskih amida **TD1-TD6**

4.1.1. Apsorpcija

Primjenom programa ADMET Predictor i DataWarrior izračunati su sljedeći parametri koji utječu na apsorpciju spojeva u krv:

- 1) M_r – relativna molekulska masa (molekulska veličina), $M_r > [450, 550]$
- 2) HBA – broj akceptora vodikove veze, $HBA > [8, 10]$
- 3) HBD – broj donora vodikove veze, $HBDH > [4, 5]$
- 4) TSA ($\text{\AA}^2$) – ukupna površina
- 5) TPSA ($\text{\AA}^2$) – topološka ukupna polarna površina molekule, $TPSA > [120; 155]$,
- 6) RelPSA – relativna polarna površina
- 7) N-FrRotB – broj slobodno rotirajućih veza pri čemu barem jedan vezani atom mora biti sp^3 -hibridiziran, $N_FrRotB > [9, 11]$
- 8) ShapeIndex – indeks oblika (sferičan $< 0,5 <$ linearan)
- 9) Flexibility – molekularna fleksibilnost (niska $< 0,5 <$ visoka)
- 10) $S+logP$ – koeficijent razdjeljenja (particije) između oktan-1-ola i vode (parametar lipofilnosti, (kontinuirani model), $S+logP > [4,5; 5,5]$
- 11) $S+Sw$ (mg/mL) – topljivost u vodi (parametar hidrofilnosti), (kontinuirani model), $S+Sw < [0,003; 0,010]$
- 12) $S+P_{eff}$ (cm/s $\times 10^4$) – pasivna permeabilnost kroz stijenku jejunuma, (kontinuirani model), $S+P_{eff} < [0,25; 0,5]$
- 13) *RuleOf5* – broj parametara koji odstupaju od Lipinskijevog pravila pet
- 14) *RuleOf5_Code* – oznaka parametra koji odstupa od Lipinskijevog pravila pet (LP5)
- 15) *Absn_Risk* – broj potencijalnih farmakokinetičkih problema za dani spoj povezanih s nedovoljnom apsorpcijom
- 16) *Absn_Code* – ukupni rizik povezan s apsorpcijom spoja u krvotok uslijed neprimjerene veličine i neravnoteže između lipofilnih i hidrofilnih karakteristika spoja.

„Meke“ granice su navedene uz molekulske deskriptore (1-3, 5-9) i fizikalno-kemijska svojstva (10-12). Prema LR5 spojevi s M_r većom od 500 imaju veću vjerojatnost da neće proći kroz stijenku tankog crijeva pasivnom difuzijom i tako biti absorbirani u krv. U programu ADMET Predictor umjesto „čvrste“ granice 500 koriste se „mek“ granica definirana rasponom 450–550. Tako se već spojevi s M_r većom od 450 mogu smatrati potencijalno problematičnim. Ukoliko je $M_r > 550$, vjerojatnost za pasivni prolaz kroz stijenku crijeva je gotovo 0. Analogno se interpretiraju i ostale „mek“ granice.

Apsorpcija se definira kao dolazak lijeka s mjesta primjene u plazmu. To vrijedi za sve putove osim intravenske aplikacije. Apsorpcija lijeka određena je fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka, formulacijom i načinom primjene. Formulacije (npr. tablete, kapsule, otopine) se sastoje od lijeka i drugih sastojaka i priređene su za različite putove primjene (npr. peroralni, sublingvalni, rektalni, inhalacijski, kutani i injekcijski). Da bi se apsorbirali, lijekovi moraju biti otopljeni, pa se kruti oblici (npr. tablete) trebaju dobro otapati. Čitav niz čimbenika utječe na brzinu apsorpcije lijeka poput veličine i oblika molekule, polarnosti, lipofilnosti, stupnja ionizacije, topljivosti u različitim medijima, mehanizma transporta (aktivni ili pasivni) i drugo. Sama struktura staničnih membrana i barijera je vrlo bitan čimbenik za apsorpciju lijekovite tvari. Postoje tri načina transporta tvari preko staničnih membrana, a to su: pasivna difuzija, potpomognuta difuzija i aktivni transport. Prijenos molekula preko barijera u organizmu, kao što je ona gastrointestinalnog trakta, se odvija na tri načina: transcelularnim transportom, paracelularnim transportom i aktivnim transportom.¹⁷⁶

Na temelju dobivenih podataka može se procijeniti bioraspoloživost ispitivanih spojeva u uvjetima *in vitro* i/ili *in vivo*. Za predviđanje *in vivo* bioraspoloživosti i tzv. sličnosti s lijekovima (engl. *Drug-Like Properties* ili *Drug-Likeness*) predložena su mnoga jednostavna pravila, kao što su na primjer Lipinskijeva, Veberova i Gelovanijeva pravila.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰

Uobičajena praksa u dizajniranju novih lijekova utvrđuje zadovoljava li spoj Lipinskijeva pravila pet (LP5). LP5 je metoda kojom se određuje koliko određeni spoj može biti povoljan kao lijek za oralnu primjenu kod ljudi, tj. koristi se za predviđanje oralne bioraspoloživosti.^{155,177,178} LP5 se sastoji od četiri točke i glasi: lijek ne smije imati više od 5 donora vodikove veze, ne smije imati više od 10 akceptora vodikove veze, mora imati molekulsku masu manju ili jednaku 500 daltona i *logP* manji ili jednak 5 (ili *MlogP* manji od 4,15).¹⁵⁵ Veberova pravila nalažu sljedeće: broj slobodno rotirajućih veza ne smije biti veći od 10, topološka polarna površina (TPSA) mora biti manja od 140 Å² ili zbroj donora i akceptora vodikovih veza manji od 12.¹⁷⁹ Gelovanijeva pravila pak zahtijevaju da je TPSA manja od 140 Å², molarna refraktivnost između 40 i 130 cm³/mol te broj atoma u molekuli od 20 do 70.¹⁸⁰

Lipofilnost je fizikalno-kemijsko svojstvo spoja koje opisuje njegovu sposobnost da se otapa u mastima, uljima, lipidima i nepolarnim organskim otapalima, kao što su heksan ili toluen.¹⁸¹ zražava se logaritmom koeficijenta raspodjele (*logP*) otopljenog spoja između vode i organskog otapala koje se ne miješa s vodom, a najčešće se koristi oktan-1-ol.¹⁸¹ Vrijednost *logP* je vrlo važno svojstvo lijekova jer utječe na njihovu farmakokinetiku, farmakodinamiku i toksikološki profil, odnosno na topljivost, apsorpciju, distribuciju, metabolizam, eliminaciju,

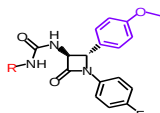
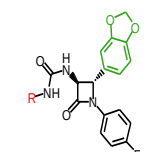
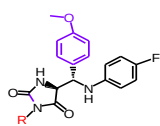
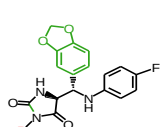
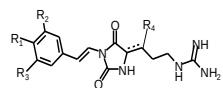
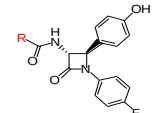
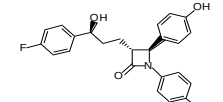
vezanje na proteine plazme, interakciju s receptorom, transport lijeka kroz stanične membrane i krvno-moždanu barijeru.^{155,180,183}

TPSA se računa kao zbroj površina svih polarnih atoma u molekuli i može predstavljati mjeru hidrofilnosti i sposobnost ispitivanih spojeva da formiraju vodikove veze.^{179,184,185} Sposobnost stvaranja vodikovih veza opisuje se češće brojevima HBA i HBD. Broj veza s mogućnošću rotacije (N_FrRotB) ukazuje na konformacijsku fleksibilnost koja predstavlja još jedan važan faktor za optimalnu bioraspoloživost. Za spojeve koji imaju $HBA < 10$, $HBD < 5$ i $N_FrRotB < 10$ predviđa se dobra oralna bioraspoloživost (Lipinski i Veber).^{154,179}

Rezultati predviđanja molekulskih deskriptora i fizikalno-kemijskih svojstava serije *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituiranih hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l**, amida **TD1-6** i ezetimiba prikazani su u Tablici 14 i na Slikama 21, 22 i 23.

Parazoantinski spojevi **5a-l** su bazični spojevi, a ostali ispitivani spojevi su neutralni, Slika 19. Parazoantini **5a-l** imaju gvanidinsku skupinu ($-HNC(=NH)NH_2$) u bočnom lancu, koja je pozitivno nabijena i učinkovit donor vodikove veze. Iz Slika 21a i 21b je vidljivo da parazoantinski spojevi **5a-l** imaju više HBA i HBD, kao i veću RelPSA u odnosu na ostale promatrane spojeve u ovom radu. Zbog takvih karakteristika ovi su spojevi polarniji, hidrofilniji (slabo liposolubilni), topljiviji u vodi, ali i slabije permeabilni kroz lipofilne membrane, Slike 21-23. Unutar skupine parazoantina postoji veliki raspon topljivosti, od slabo topljivog fenilamino-derivata parazoantina A **5k** do jako topljivog parazoantina C **5c**, Slika 19. Za parazoantine, osim već spomenutih svojstava, predviđeno je da su izduženiji i fleksibilniji nego *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, hidantoini **3a-v** i **4a-v**, amidi **TD1-6** i ezetimib. Parazoantini su i manje molekule s manjom molekulskom masom i TSA, Tablica 14 i Slika 21c.

Tablica 14. Deskriptivni statistički parametri za vrijednosti molekulskih deskriptora (M_r , TPSA, N-FrRotB) koji utječu na apsorpcijske karakteristike po serijama *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituiranih hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l**, amida **TD1-6** i lijeka ezetimiba.

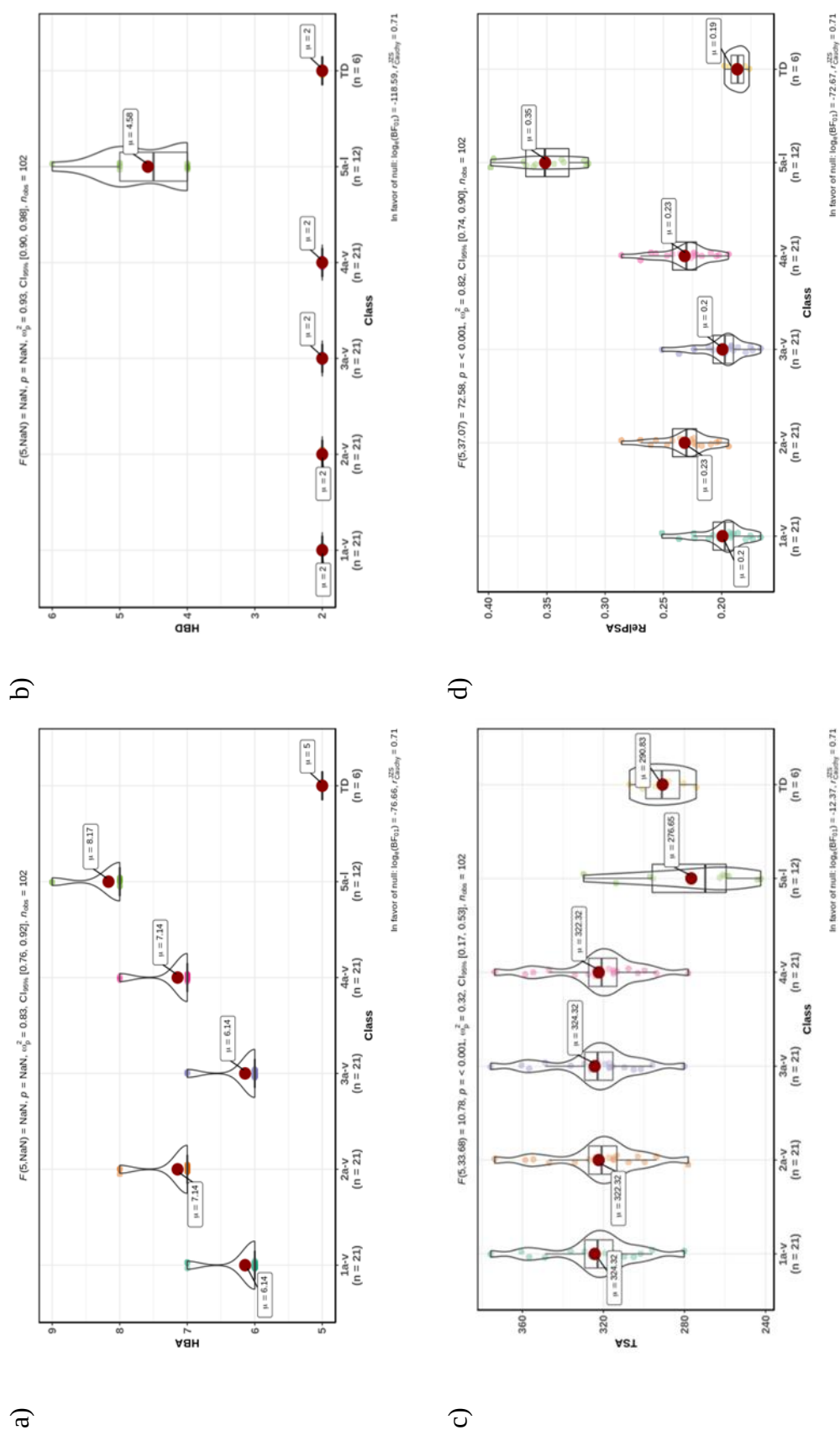
Struktura	Spoj	M_r	TPSA (Å²)	N_FrRotB	
	1a-v	$\bar{x}$	437,08	72,55	7,86
		$\pm$ SD	35,34	4,87	1,24
		Min.	369,40	70,67	7,00
		Max.	541,43	87,74	11,00
	2a-v	$\bar{x}$	451,06	81,78	6,86
		$\pm$ SD	35,34	4,87	1,24
		Min.	383,38	79,90	6,00
		Max.	555,41	96,97	10,00
	3a-v	$\bar{x}$	437,08	72,55	6,86
		$\pm$ SD	35,34	4,87	1,24
		Min.	369,40	70,67	6,00
		Max.	541,43	87,74	10,00
	4a-v	$\bar{x}$	451,06	81,78	5,86
		$\pm$ SD	35,34	4,87	1,24
		Min.	383,38	79,90	5,00
		Max.	555,41	96,97	9,00
	5a-j	$\bar{x}$	392,48	127,13	6,50
		$\pm$ SD	59,82	7,62	1,17
		Min.	315,33	120,54	5,00
		Max.	489,18	143,57	9,00
	TD1-6	$\bar{x}$	398,74	69,64	4,67
		$\pm$ SD	15,26	0,00	1,03
		Min.	376,39	69,64	4,00
		Max.	420,42	69,64	6,00
	Ezetimib		409,44	60,77	6

^aOpis navedenih molekulskih deskriptora nalazi se na str.140.

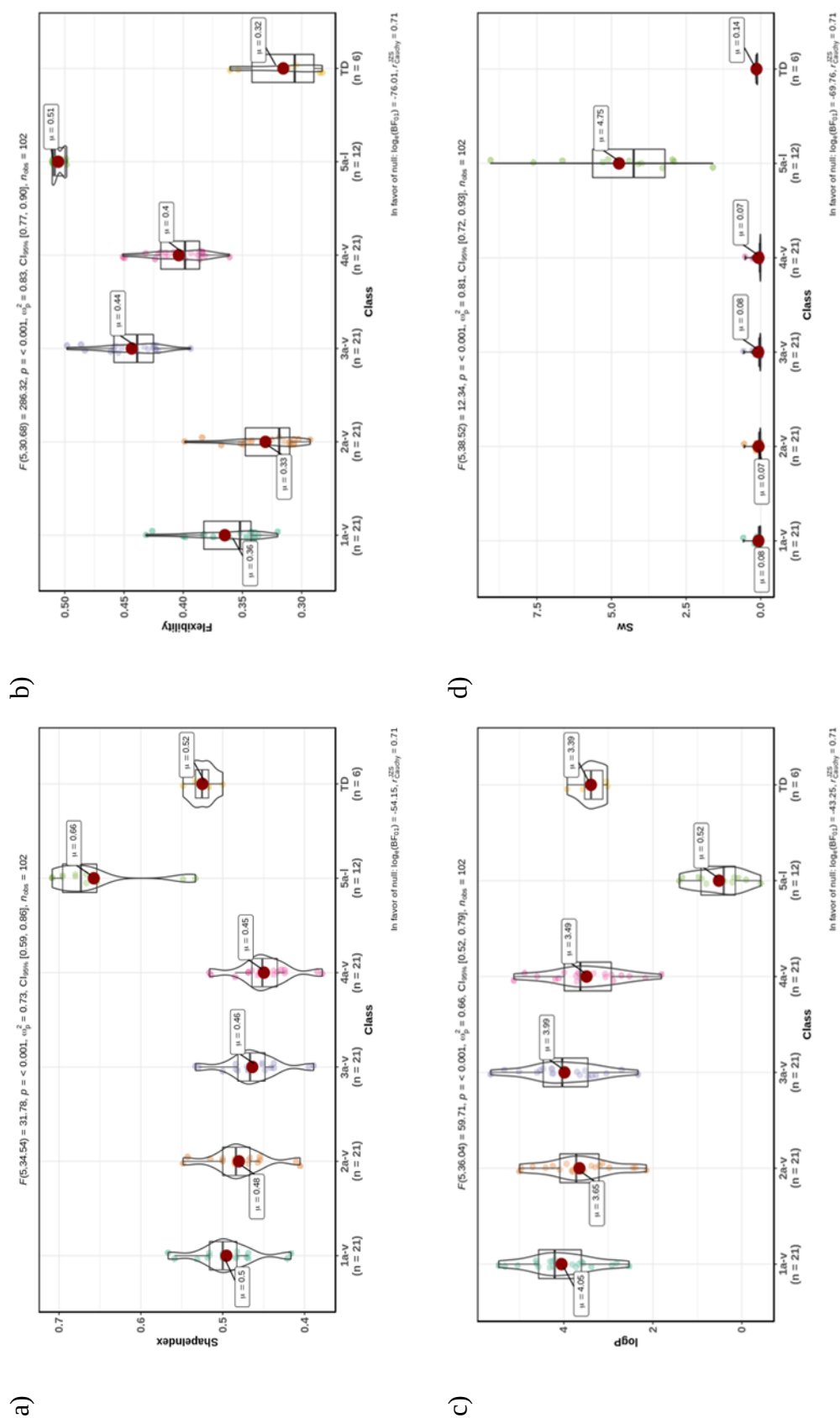
^bKemijske strukture prikazane su na Slikama 19 i 20.

trans- β -Laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, hidantoini **3a-v** i **4a-v**, ezetimib i njegovi amidni analozi **TD** imaju isti broj HBD, slične su polarnosti, lipofilnosti i topljivosti u vodi, Slika 21b,d i 22c,d. Derivati s 1,3-benzodiodksol-5-il supstituentom **2a-v** i **4a-v** zbog jednog dodatnog atoma kisika, imaju više HBA nego derivati s 4-metoksifenilnim supstituentom **1a-v** i **3a-v**, a isto tako više i od ezetimiba i amida **TD1-6**, Slika 21a. *trans*- β -Laktamske uree **1a-v** i **2a-v** i hidantoini spojevi **3a-v** i **4a-v** slični su po veličini, ali su veći od parazoantina **5a-l**, amida **TD** i ezetimiba,

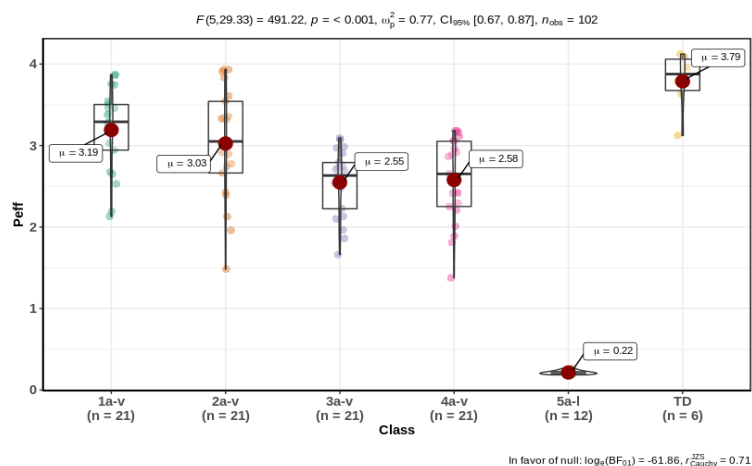
Slika 21c. Program DataWarrior predviđa da se uvođenjem hidantoiniskog prstena **3a-v** i **4a-v** malo povećava fleksibilnost u odnosu na spojeve s β -laktamskim prstenom **1a-v** i **2a-v**. β -Laktamski prsten je rigidan, a hidantoiniski prsten povećava fleksibilnost molekule, ali ne značajno, Slika 22b. Nadalje, uočava se da su β -laktamske uree nešto lipofilnije u odnosu na 3,5-disupstituirane hidantoine **3a-v** i **4a-v**, te da su spojevi s 4-metoksifenilnim supstituentom **1a-v** i **3a-v** lipofilniji nego njihovi 1,3-benzodioksol-5-ilni analozi **2a-v** i **4a-v**, Slika 22c. Hidantoiniski spojevi **3a-v** i **4a-v** slabije prolaze kroz membranu u odnosu na β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**. *trans*- β -Laktamske uree **2a-v** s 1,3-benzodioksol-5-il supstituentom lakše prolaze kroz staničnu membranu u odnosu na *trans*- β -laktamske uree **1a-v** s 4-metoksifenilnim supstituentom na C-4 atomu β -laktama, Slika 23. Vrlo hidrofilni spojevi obično nisu u stanju difundirati pasivno kroz membrane, jer jedva ulaze u hidrofobnu unutrašnjost lipofilnog dvosloja, dok lipofilne molekule mogu proći staničnu membranu jer su topljivije u lipidnom dvosloju. Veliki broj HBD-a često je uzrok slabe propusnosti, apsorpcije i bioraspoloživosti.¹⁸⁶



Slika 21. Usporedba parametara a) HBA, b) HBD, c) TSA ($\text{\AA}^2$), d) RelPSA za šest serija spojeva *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l** i amida **TD**. Vrijednosti molekularskih deskriptora za ezetimib: HBA = 4, HBD = 2, TSA = 297,8 $\text{\AA}^2$, RelPSA = 0,14



Slika 22. Usporedba a) indeksa oblika *ShapeIndex*, b) molekularne fleksibilnosti *Flexibility*, c) koefijenta lipofilnosti *S+logP*, d) topljivosti u vodi *S+Sw* (mg/ml) između klasa *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l** i amida **TD**. Vrijednosti za ezetimib: *ShapeIndex* = 0,53; *Flexibility* = 0,34; *logP* = 4,18 i *Sw* = 0,12 mg mL⁻¹



Slika 23. Usporedba permeabilnosti $S+Pe_{eff}$ ($\text{cm/s} \times 10^4$) serije *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v** i hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l** i amida **TD**. $S+Pe_{eff}$ (ezetimib) = $5,34 \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$

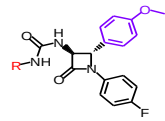
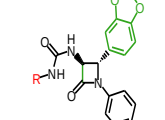
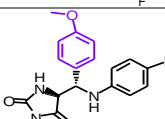
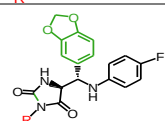
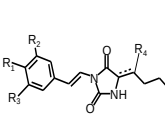
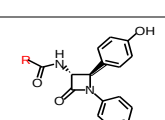
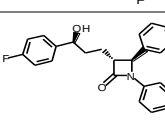
Pomoću programa ADMET Predictor procijenjeni su za svaki spoj parametri koji odstupaju od LP5 te rizici od niskog prolaza kroz stijenku crijeva i ulaska u krv (*Absn_Risk*), Tablica 15. Model *Absn_Risk* uključuje osam parametara koji se temelje na deskriptorima M_r , HBA, HBD, ch, RotB i predviđenim fizikalno-kemijskim svojstvima Kow, Peff i Sw.

Prema dobivenim podacima, 64 od ukupno 103 proučavanih spojeva zadovoljava LP5, 32 spoja odstupaju prevelikom lipofilnošću ($MlogP > 4,15$; **1b**, **1d**, **1e**, **1g-i**, **1k-m**, **1o-v**, **2e**, **2i**, **2o-v**, **3o**, **3s**, **3u**, **4u**) i 6 spojeva ne zadovoljava molekulskom masom ($M_r > 500$; **1s**, **2s**, **2u**, **3s**, **4s** i **4u**), Tablica 15. Iznimka su parazoantinski spojevi (**5a**, **5b**, **5g**, **5h**, **5i**, **5j**) kojima broj HBD stvara prepreku dobroj bioraspoloživosti. Spoj koji krši dva ili više LP5 se smatra da neće proći kroz stijenku jejunuma i ući u krv.

Najpovoljnije apsorpcijske parametre pokazuju ezetimib i amidni analozi ezetimiba **TD1-6** za koje je predviđeno da prepreku dobroj bioraspoloživosti predstavlja lipofilnost, Tablica 15. Najlošiji apsorpcijski profil predviđen je za parazoantinske derivate **5a-l**, za koje se vrijednost *Absn_Risk* kreće u rasponu 1,61–3,17, Tablica 15. Najnižu vrijednost tj. najmanji *Absn_Risk* ima parazoantin **5f**, a najvišu vrijednost fenilamino-derivat parazoantin **5k**, Slika 19. Većini parazoantina prepreku bioraspoloživosti i dobroj sličnosti s lijekom prema predviđanjima predstavljaju: previše donora vodikovih veza, naboj i niska permeabilnost. Tako za fenilamino-derivate parazoantina **5a** i **5l** prepreku dobroj bioraspoloživosti predstavlja upravo previše akceptora vodikovih veza. Za većinu *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v** i hidantoina **3a-v** i **4a-v** prepreku dobroj bioraspoloživosti i dobroj sličnosti s lijekom ezetimibom prema predviđanjima predstavlja visoka lipofilnost. Za neke β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v** i hidantoina **3a-v** i **4a-v** prepreku predstavljaju i veličina molekula (**1h**, **1s**, **1t**, **1v**, **2e**, **2h-v**, **3e**, **3o**, **3p**, **3s**,

3u, 3v, 4e, 4h-v), broj veza koje slobodno rotiraju (**1b, 1e, 2b, 2e, 3b i 3e**) i slaba topljivost u vodi (**1s, 1v, 2o, 2s, 2u, 2v, 3j, 3r, 3u, 3v, 4j, 4o, 4s, 4u i 4v**), Slika 19.

Tablica 15. Odstupanje od Lipinskijevog pravila 5 i procjena rizika od neuspješne apsorpcije u krv za šest klasa spojeva i ezetimib. 0 – nema odstupanja od LP5, 1 - odstupanje jednog parametra i 2 – odstupanje dva parametra.

Kemijska struktura	Spoj	Broj	RuleOf5			RuleOf5_ Code	Absn_Risk		Absn_Code
			0	1	2		$\bar{x}$	$\pm$ SD	
	1a-v	21	5	15	1	LP – 16 spojeva MW – 1 spoj	$\bar{x}$ 1,12 $\pm$ SD 0,79 Min. 0,00 Max. 3,00		Size – 6 spojeva RotB – 2 spoja Kow – 19 spojeva Sw – 4 spoja
	2a-v	21	12	7	2	LP - 9 spojeva MW – 2 spoja	$\bar{x}$ 1,14 $\pm$ SD 0,89 Min. 0,00 Max. 3,00		Size – 15 spojeva RotB – 2 spoja Kow – 17 spojeva Sw – 4 spoja
	3a-v	21	18	2	1	LP - 3 spoja MW – 1 spoj	$\bar{x}$ 0,83 $\pm$ SD 0,84 Min. 0,00 Max. 3,00		Size – 6 spojeva RotB – 2 spoja Kow – 15 spojeva Sw - 4 spoja
	4a-v	21	19	1	1	LP - 1 spoj MW – 2 spoja	$\bar{x}$ 0,77 $\pm$ SD 0,91 Min. 0,00 Max. 3,00		Size – 15 spojeva Kow – 11 spojeva Sw – 4 spoja
	5a-l	12	6	6		HBD – 6 spojeva	$\bar{x}$ 2,16 $\pm$ SD 0,50 Min. 1,61 Max. 3,17		Size – 2 spoja HBA – 2 spoja HBD – 12 spojeva Ch – 12 spojeva Peff – 12 spojeva
	TD1-6	6	4	2			$\bar{x}$ 0,66 $\pm$ SD 0,27 Min. 0,35 Max. 1,00		Kow – 6 spojeva
	Ezetimib	1		1		LP		1,0	Kow

^aRuleOf5- LP5, Absn_Risk - broj potencijalnih farmakokinetičkih problema za dani spoj povezanih s nedovoljnom apsorpcijom. ^bParametri koji ulaze u RuleOf5_Code: MW - oznaka za $M_r > 500$, Hb - oznaka za HBD > 5, NO - oznaka za HBA > 10 i LP oznaka – $\log P > 5$ (ili $M\log P > 4,15$). ^cParametri koji ulaze u Absn_Code: Size – ukazuje na probleme zbog veličine, Kow- ukazuju na probleme s lipofilnošću $S+\log P$, Sw – ukazuje na probleme s topljivošću u vodi $S+Sw$, RotB – ukazuje na probleme s N_{FrRotB} , HBD – ukazuje na probleme s brojem donora vodikove veze, HBA – ukazuje na probleme s brojem akceptora vodikove veze; ch – ukazuje da je spoj jako nabijena molekula; Peff: ukazuje na nisku permeabilnost $S+Peff$. ^b Kemijske strukture prikazane su na Slikama 19 i 20.

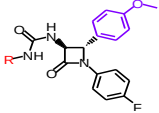
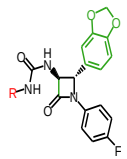
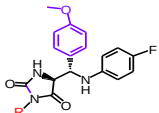
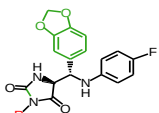
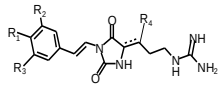
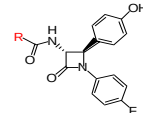
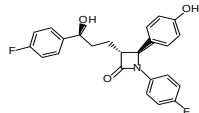
4.1.2. Distribucija

Za *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituirane hidantoine **3a-v** i **4a-v**, parazoantine **5a-l**, ezetimib i amide **TD1-6** pomoću programa ADMET Predictor izračunati su i parametri koji opisuju distribucijske karakteristike spojeva malih molekulskih masa u ljudskom tijelu:

- 1) *BBB Filter* – pripadni model predviđa prolazi li spoj ili ne kroz krvno-moždanu barijeru (engl. *Blood-Brain Barrier*) (klasifikacijski model- visoka/niska vjerojatnost prelaska)
- 2) *LogBB* – model predviđa vrijednost logaritma particijskog koeficijenta $C_{\text{mozak}}/C_{\text{krv}}$ kojim se kvantificira zadržavanje spoja u mozgu jednom kad je prošao BBB (kontinuirani model)
- 3) *Pgp_Substr* – model predviđa je li spoj ili nije supstrat membranske pumpe P-gp (ATP-ovisna translokaza ABCB1 poznata i kao Multidrug resistance protein 1, MDR1) (klasifikacijski model – da/ne)
- 4) *Pgp_Inh* – model predviđa je li spoj ili nije inhibitor pumpe P-gp (klasifikacijski model – da/ne)
- 5) *S+hum_fup* (%) – udio slobodnog/nevezanog spoja u ljudskoj plazmi (kontinuirani model)
- 6) *S+fumic* – udio slobodnog spoja u mikrosomima ljudske jetre (kontinuirani model)
- 7) *RBP* – odnos koncentracije spoja u krvi i plazmi (kontinuirani model)

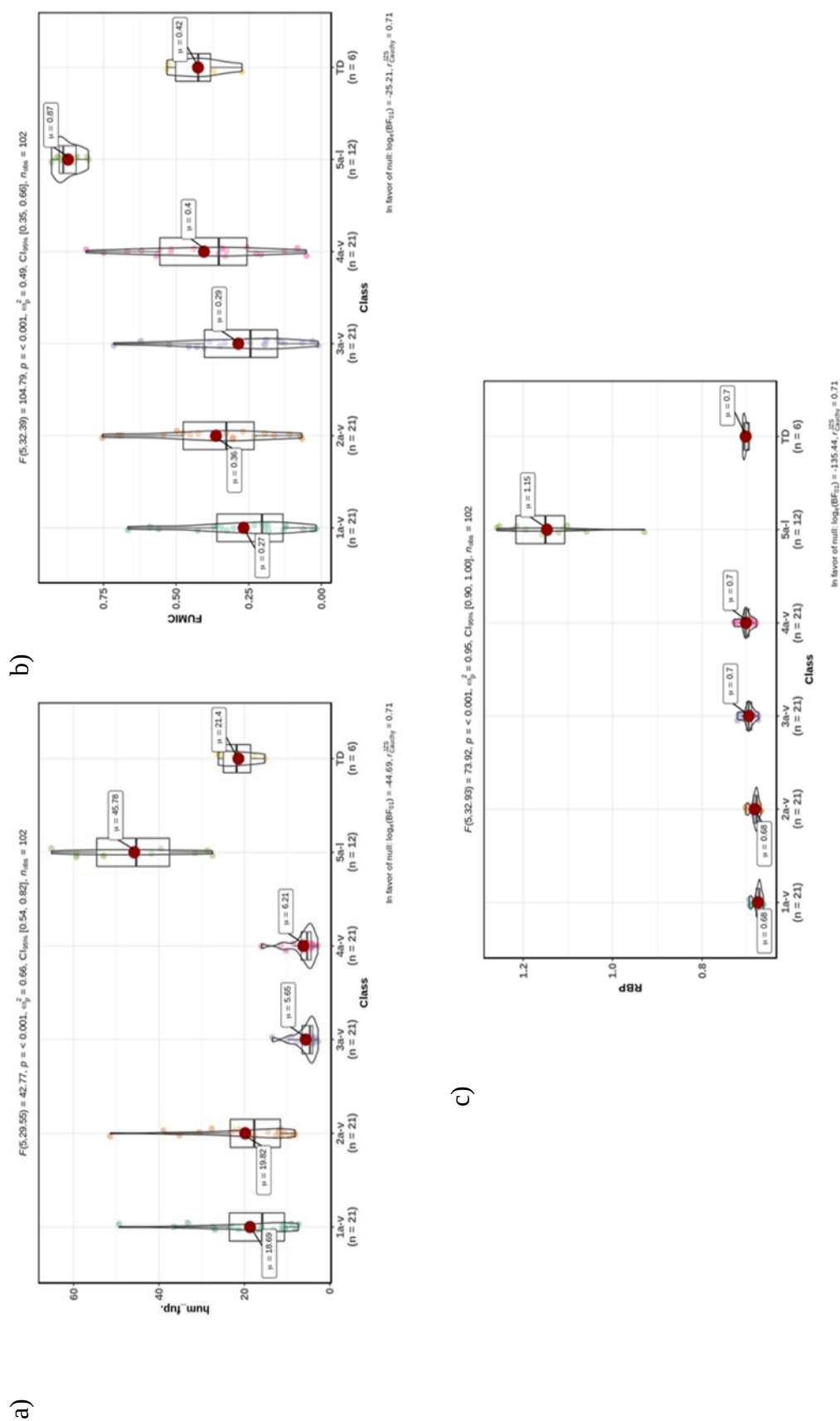
Nakon apsorpcije u krv, lijek se brzo prenosi po organizmu i dolazi do tkiva/organa gdje djeluje.¹⁸⁷ Krv se sastoji od plazme (to je tekući dio) i krvnih stanica koje plivaju u plazmi (crvenih krvnih stanica - eritrocita, bijelih krvnih stanica - leukocita i krvnih pločica - trombocita). Lijekovi se kroz tijelo prenose putem krvne plazme ili/i putem krvnih stanica. U plazmi lijekovi se nalaze u dva oblika: (1) slobodnom obliku otopljeni u tekućini plazme i/ili (2) vezani za proteine plazme (engl. *Human Serum Albumin*, HSA).¹⁸⁸ Za distribuciju lijekova iznimno su važni HSA, alfa-1-kiseli glikoprotein te razni lipoproteini. Kiseli i neutralni lijekovi se općenito vežu na HSA, a bazične molekule za alfa-1-kiseli glikoprotein ili lipoproteine.¹⁸⁹ HSA je najzastupljeniji protein u ljudskoj plazmi i prenosi mnoge egzogene (lijekove) i endogene (masne kiseline, bilirubin, hem, metalne ione npr. Zn^{2+} , itd.) tvari kroz tijelo.¹⁸⁷ U Tablici 16 prikazane su predviđene vrijednosti za četiri distribucijska parametara za 6 grupa novih spojeva.

Tablica 16. Usporedba distribucijskih parametara između šest podgrupa novih spojeva *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituirane hidantoinine **3a-v** i **4a-v**, parazoantine **5a-l**, amide **TD1-6** i referentnog spoja ezetimiba, predviđenih s modelima programa ADMET Predictor.

Kemijska struktura	Spoj	BBB_Filter	LogBB	Pgp_Substr	Pgp_Inh
	1a-v	17 niska 4 visoka	$\bar{x}$	-0,05	
			$\pm$ SD	0,22	15 Da
			Min.	-0,62	6 Ne
			Max.	0,40	
	2a-v	17 niska 4 visoka	$\bar{x}$	-0,14	
			$\pm$ SD	0,21	16 Da
			Min.	-0,70	5 Ne
			Max.	0,32	
	3a-v	17 niska 4 visoka	$\bar{x}$	0,30	
			$\pm$ SD	0,25	11 Ne
			Min.	-0,38	10 Da
			Max.	0,63	20 Da
	4a-v	18 niska 3 visoka	$\bar{x}$	0,16	
			$\pm$ SD	0,26	16 Da
			Min.	-0,52	5 Ne
			Max.	0,52	20 Da
	5a-l	Niska	$\bar{x}$	-0,85	
			$\pm$ SD	0,07	Da
			Min.	-0,96	Ne
			Max.	-0,74	
	TD1-6	Niska	$\bar{x}$	0,01	
			$\pm$ SD	0,14	3 Da
			Min.	-0,18	3 Ne
			Max.	0,16	Da
	Ezetimib	Visoka	0,09	Ne	Da

^aOpis navedenih distribucijskih parametara nalazi se na str. 149.

^bKemijske strukture prikazane su na Slikama 19 i 20.



Slika 24. Usporedba frakcije slobodnog spoja a) u plazmi *S+hum_fup* (%) b) u mikrosomima ljudske jetre *S+fumic* i c) odnosa koncentracije spoja u krvi i plazmi RBP za šest serija spojeva: *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l** i amida **TD**. Vrijednosti za ezetimib: *S+hum_fup* = 11,1 %, *S+fumic* = 0,21 i *RBP* = 0,70

Program ADMET Predictor predviđa da ezetimib prolazi krvno-moždanu barijeru (engl. *Blood-Brain Barrier*, BBB), dok je u literaturi poznato da β -laktami ne prolaze BBB.^{190,191} Također, program predviđa da parazoantini **5a-l**, amidi **TD1-6** te većina *trans*- β -laktamskih urea i hidantoina ne prolaze kroz BBB. Budući da ovi spojevi ne prolaze BBB, neće izazivati nuspojave u središnjem živčanom sustavu (engl. *Central Nervous System*, CNS). Uloga BBB je zaštita CNS od štetnih tvari i istovremena opskrba istog nutrijentima.¹⁸⁹ Sposobnost ispitivanih grupa spojeva da prolaze kroz BBB i da su aktivni u CNS-u također se može predvidjeti na temelju prethodno izračunatih fizikalno-kemijskih parametara, Tablica 14. Da bi se neki kemijski spoj smatrao potencijalno uspješnim lijekom CNS-a, mora zadovoljiti sljedeće fizikalno-kemijske zahtjeve: $M_r \leq 450$, $HBA \leq 7$, $HBD \leq 3$, $TPSA \leq 60-70 \text{ \AA}^2$ i broj rotirajućih veza ≤ 8 i $MlogP \leq 5$.¹⁹² Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da samo ezetimib i njegovi amidni analozi **TD1-6** ispunjavaju sve navedene zahtjeve neophodne da bi se spoj moglo smatrati potencijalno uspješnim CNS lijekom, odnosno sposobnim za prolazak kroz BBB i aktivnim u CNS-u. Međutim, predviđeno je da amidni analozi ezetimiba ne prolaze kroz BBB. Parazoantinski spojevi **5a-l** pokazuju najveće odstupanje od gore navedenih zahtjeva. Ovi spojevi imaju $HBA \geq 8$, $HBD \geq 4$, $TPSA > 120 \text{ \AA}^2$, a parazoantini **I 5i** i **J 5j** imaju i $M_r > 450$, Slika 20. Sve β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v** i hidantoini **3a-v** i **4a-v** imaju $TPSA \geq 70,67 \text{ \AA}^2$, a neki spojevi iz ovih klasa imaju i $M_r > 450$ (**1e**, **1o**, **1p**, **1s**, **1u**, **1v**, **2e**, **2k-m**, **2o**, **2p**, **2s**, **2u**, **2v**, **3e**, **3o**, **3p**, **3s**, **3u**, **3v**, **4e**, **4k-m**, **4o**, **4p**, **4s**, **4u** i **4v**) i/ili $HBA > 7$ (**2f**, **2j**, **2n**, **4j** i **4n**), broj rotirajućih veza > 9 (**1b**, **1e**, **2b**, **2e**, **3b** i **3e**), $MlogP > 5$ (**1o**, **1s**, **1u**, **2u**), Slika 19.

Za β -laktamske i hidantoininske derivate s 3,5-bis(trifluormetil)fenilnom skupinom (**1s**, **2s**, **3s**, **4s**), 1-naftilnom skupinom (**1v**, **2v**, **3v**, **4v**) te za derivat s fenilnom skupinom **3g** je predviđeno da prelaze BBB i da se zadržavaju u mozgu, dok je za preostale derivate s fenilnom skupinom (**1g**, **2g**, **4g**) i derivate s 4-metoksifenilnom skupinom (**1n**, **2n**, **3n**, **4n**) predviđeno da prolaze BBB, ali da se ne zadržavaju u mozgu. Za referentne spojeve, odnosno za ezetimib i amidne analoge ezetimiba **TD1-6**, program predviđa da su inhibitori aktivnosti P-gp, što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima.¹⁶⁵ Nadalje, program predviđa da ezetimib i tri amida nisu supstrati P-gp. Prema dostupnim literaturnim podacima, ezetimib je supstrat P-gp i MRP2 (engl. *Multidrug Resistance-Associated Protein 2*).¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

Za većinu *trans*- β -laktamskih urea (15 od 21 **1a-v**, 16 od 21 **2a-v**) i 3,5-disupstituiranih hidantoina (20 od 21 **3a-v**, 20 od 21 **4a-v**) program predviđa da su inhibitori P-gp. Što se tiče predviđanja jesu li ispitivani spojevi supstrati za P-gp, dobiveni rezultati pokazuju da su sve *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, 10 od 21 hidantoina **3a-v** te 16 od 21 hidantoina **4a-v** supstrati za P-gp. Jedino hidantoini s alilnim supstituentom **3a**, **4a** na N-3 atomu hidantoinskog

prstena nemaju interakcije s P-gp, odnosno ovi spojevi nisu ni supstrati ni inhibitori transportog proteina P-gp. Parazoantinski spojevi **5a-l** su predviđeni kao supstrati P-gp, ali ne i njegovi inhibitori.

Lijek koji je apsorbiran u krv počinje se distribuirati u tkiva. Količina koja će se raspoređivati u tkivima ovisi o njegovoj lipofilnosti i vezivanju za proteine plazme. Slobodna frakcija spoja (lijeka) odgovorna je za terapijske i/ili toksične učinke.¹⁸⁹

Parazoantinski spojevi **5a-l** se značajno razlikuju od ostalih spojeva s obzirom na udjele *S+hum_fup*, *S+fumic* i omjer *RBP*, Slika 24. Parazoantini su slobodniji u plazmi, dok je za ostale spojeve predviđeno značajnije vezanje za proteine plazme s obzirom da su vrijednosti *RBP* manje od 1, Slika 24c. Vezanje na HSA je prema predviđanju najznačajnije za hidantoiniske derivate, Slika 24a. Prema dostupnim literaturnim podacima, ezetimib ($\log P = 4,39$)¹⁷⁵ je u velikoj mjeri (93,9–94,5 %) vezan na proteine u plazmi.^{167,169} Jedino je za parazoantinske spojeve **5a-l** predviđen omjer *RBP* > 1, Slika 24c. Kada je *RBP* > 1, spoj ulazi u krvne stanice (eritrocite ili neke druge krvne stanice). To mu može biti prednost, jer onda ne mora prolaziti razne membrane, nego ih krvne stanice nose na mjesto djelovanja.

Što je veća slobodna frakcija spoja u mikrosomima jetre to je veća vjerojatnost za njihovu metaboličku transformaciju. Za parazoantinske spojeve **5a-l** predviđene su visoke vrijednosti *S+fumic*, Slika 24b. Prosječna slobodna frakcija ovih spojeva u mikrosomima ljudske jetre iznosi (87 ± 4) %. Također, za očekivati je da derivati s 1,3-benzodioksol-5-il supstituentom **2a-v** i **4a-v** će biti više metabolizirani od derivata s 4-metoksifenilnim supstituentom na C-4 atomu β -laktamskog prstena **1a-v** i **3a-v**. Unutar β -laktamskih i hidantoinskih grupa spojeva, za derivate s alilnom skupinom (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**, 66,6–81,1 %) i s furfurilnom skupinom (**1f**, **2f**, **3f**, **4f**, 59,0–75,0 %) su predviđene ekstenzivne metaboličke transformacije.

4.1.3. Metabolizam i ekskrecija

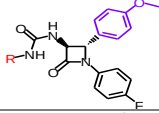
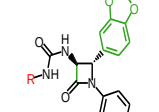
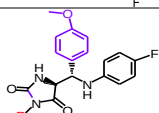
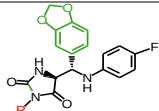
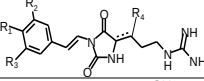
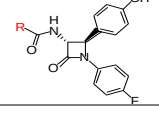
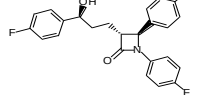
Metabolizam i izlučivanje analiziranih spojeva predviđeni su upotrebom ADMET Predictora i internetskog servera admetSAR [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>], Tablice 17 i 18. Primjenom poslužitelja admetSAR procjenjuje se je li spoj inhibitor ili supstrat CYP450 enzima i/ili transportnih proteina. Ovaj parametar je ključan za predviđanje metabolizama lijeka te predviđanje potencijalnih interakcija ispitivanog lijeka s ostalim lijekovima.¹⁸⁹

Proteini CYP450 su glavni enzimi uključeni u metabolizam lijekova faze I (oko 75 % ukupnog metabolizma) koji prevode spojeve u polarnije produkte koji se izlučuju iz

organizma.^{193,194,195} Lijekovi se u I fazi metabolizma modificiraju reakcijama oksidacije, redukcije i hidrolize, pri čemu nastaju nove funkcionalne skupine ili se modificiraju već postojeće funkcionalne skupine. Ako su nakon prve faze metaboliti dovoljno polarni mogu se odmah eliminirati iz organizma, no najčešće to nije slučaj pa prolaze kroz reakcije druge faze metabolizma kao što je glukuronidacija. Enzimi CYP450 svrstani su u tri glavne genske obitelji: CYP1, CYP2, CYP3. Sekvenciranjem humanog genoma otkriveno je 115 različitih gena CYP450 proteina od kojih je 57 funkcionalno.¹⁹⁵ U metabolizmu lijekova sudjeluju CYP3A4/5 (36 %), CYP2D6 (19 %), CYP2C8/9 (16 %), CYP1A2 (11 %), , CYP2C19 (8 %), CYP2E1 (4 %), CYP2B6 (3 %) i CYP2A6 (3 %).¹⁹⁶

Svi spojevi su predviđeni kao supstrati CYP3A4 enzima što ukazuje na mogućnost njihove metaboličke transformacije, Tablica 17. Hidantoiniski derivati **3a-v** i **4a-v** i parazoantini **5a-l** su također potencijalni supstrati enzima CYP2C9 kao i ezetimib. Hidantoiniski derivati s ciklopentilnom (**3c**, **4c**), cikloheksilnom (**3d**, **4d**), 4-fenilbutilnom (**3e**, **4e**) i 1-naftilnom skupinom (**3v**, **4v**) su mogući supstrati i CYP2D6 enzima. Zajedničko svim ispitivanim spojevima je da nisu inhibitori CYP1A2 i CYP2D6 izoenzima. Parazoantini **5a-l** kao i amidni derivati **TD1-6** također ne inhibiraju druge razmatrane CYP450 izoforme te se može zaključiti da je vjerojatnost da ovi derivati izazovu nepoželjne interakcije lijek – lijek mala. Neki β-laktamski (**1a,b**, **1d-f**, **1h**, **1n**, **1o**, **1r**, **1t**, **2a,b**, **2d-f**, **2h**, **2n**, **2o**, **2r**, **2t**) i hidantoiniski derivati (**3a**, **3b**, **3d**, **3f**, **3h**, **3o**, **3r**, **3t**, **4a**, **4b**, **4d**, **4f**, **4h**, **4o**, **4r**, **4t**) kao i ezetemib su potencijalni inhibitori CYP3A4 enzima. Hidantoiniski derivati su također predviđeni kao mogući inhibitori CYP2C9 (**3c-d**, **3g-o**, **3s**, **4c-d**, **4g-o**, **4s**) i CYP2C19 (**3a-s**, **4a-s**) izoformi. β-Laktamski derivati s heksilnom skupinom **1b** i **2b** su predviđeni kao mogući inhibitori CYP2C19 izoforme, dok su derivati s 4-metoksifenilnom skupinom **1n** i **2n** predviđeni kao mogući inhibitori CYP2C19 izoforme.

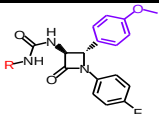
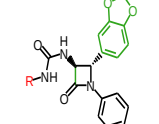
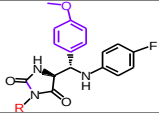
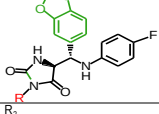
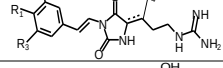
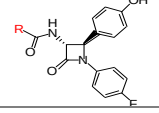
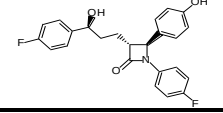
Tablica 17. Pregled vrijednosti metaboličkih parametara određenih primjenom softvera admetSAR [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>] za *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituirane hidantoine **3a-v** i **4a-v**, parazoantine **5a-l**, ezetimib i njegove amidne analoge **TD1-6**.

Struktura	Spoj	S+CL_Mech	ECCS_Class	CYP supstrat				CYP inhibitor			
				2C9	2D6	3A4	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
	1a-v	metabolizam	Klasa 2	16 Ne 5 Da	Ne	Da	Ne	20 Ne 1 Da	20 Ne 1 Da	Ne	11 Ne 10 Da
	2a-v	metabolizam	Klasa 2	16 Ne 5 Da	Ne	Da	Ne	20 Ne 1 Da	20 Ne 1 Da	Ne	11 Ne 10 Da
	3a-v	metabolizam	Klasa 2	5 Ne 16 Da	17 Ne 4 Da	Da	Ne	8 Ne 13 Da	4 Ne 17 Da	Ne	13 Ne 8 Da
	4a-v	metabolizam	Klasa 2	5 Ne 16 Da	17 Ne 4 Da	Da	Ne	8 Ne 13 Da	3 Ne 18 Da	Ne	13 Ne 8 Da
	5a-l	bubrežna eliminacija	Klasa 4	Da	Ne	11 Da 1 Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	TD1-6	metabolizam	Klasa 2	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	Ezetimib	metabolizam	Klasa 2	Da	Ne	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Da

^aS+CL_Mech – model predviđa glavni put izlučivanje ispitivanog spoja (klasifikacijski model – metabolizam/jetreni unos/bubrežna eliminacija), ECCS_Class – klasifikacija ispitivanog spoja prema ECCS-u. Ovi parametri predviđeni su programom ADMET Predictor, a ostali parametri – CYP (citokrom P450) supstrat (2C9, 2D6, 3A5, 1A2) i CYP inhibitor (2C9, 2C19, 2D6, 3A4) predviđeni su primjenom poslužitelja admetSAR.^b Detaljne kemijske strukture prikazane su na Slikama 19 i 20.

Nadalje, primjenom poslužitelja admetSAR predviđeno je da većina spojeva inhibira farmakokinetički važne transportere OATP 1B1 i 1B3, Tablica 18. Svi derivati osim nekih parazoantinskih (**5a**, **5d**, **5g-j**) su predviđeni i kao inhibitori transportera BSEP.

Tablica 18. Mogućnost inhibicije farmakokinetičkih transportera *trans*- β -laktamskim ureama **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituiranim hidantoinima **3a-v** i **4a-v**, parazoantinima **5a-l**, amidima **TD** i ezetimibom predviđena softverom admetSAR.

Struktura	Spoj	BCRP	BSEP	MATE1	OATP			OCT	
					1B1	1B3	2B1	1	2
	1a-v	Ne	Da	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
	2a-v	Ne	Da	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
	3a-v	Ne	Da	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
	4a-v	Ne	Da	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
	5a-l	Ne	6 Ne 6 Da	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
	TD1-6	Ne	Da	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne
	Ezetimib	Ne	Da	Ne	Da	Ne	Ne	Ne	Ne

^aBCRP - proteinprotein rezistencije raka dojke, BSEP - eksportna pumpa za žučne soli, MATE1 - prijenosnik za izlučivanje više lijekova i toksina, OATP 1B1/1B3/2B1 - organski anionski transportni polipeptid, OCT1/2 – organski kationski transporter. ^bDetaljne kemijske strukture prikazane su na Slikama 19 i 20.

Predviđanja dobivena s programom ADMET Predictor su u skladu s onima od poslužitelja admetSAR, Tablica 17. β -Laktamski **1a-v** i **2a-v** i hidantoini derivati **3a-v** i **4a-v** kao i **TD1-6** i ezetimib su predviđeni da se eliminiraju putem metaboličkih transformacija svrstani su tzv. ECCS klasu 2, Slika 25. Ovi spojevi metaboliziraju se enzimima kao što su CYP3A4, UGT, CYP2D6, esterase i CYP2C. Za hidrofilne parazoantine **5a-l** se može očekivati eliminacija putem bubrežnog metabolizma i urina i svrstani su u ECCS klasu 4. Njihova eliminacija putem bubrega posredovana je specifičnim transporterima OAT 1B1 i 1B3, Tablica 18.

Poželjno je da se još u ranoj fazi razvoja lijeka ispitivana tvar svrsta u određenu klasu ECCS (engl. *Extended Clearance Classification System* - prošireni sustav klasifikacije klirensa). ECCS klasifikacija se primjenjuje u otkrivanju novih lijekova, kako bi se predvidjela brzina uklanjanja novih spojeva na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. Zapravo, prema ECCS klasifikaciji gleda se kako će se neki kemijski spoj najvjerojatnije izlučiti iz tijela s obzirom na svoju veličinu, permeabilnost kroz membranu i naboj.¹⁹⁷ Čistoća (klirens) je učinkovitost nepovratnog uklanjanja lijeka. Čistoća se definira kao "volumen krvi očišćene od lijeka po jedinici vremena". To je konstanta proporcionalnosti između koncentracije lijeka u plazmi i brzine eliminacije.¹⁹⁸

Na Slici 25 prikazana je nadogradnja biofarmaceutskog klasifikacijskog sustava (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS). BCS sustav ima široku primjenu u istraživanju lijekova, razvoju formulacija i regulatornoj znanosti.¹⁹⁹ Prema BCS, djelatne tvari se, ovisno o njihovoj topljivosti i permeabilnosti, osnovnim parametrima koji određuju brzinu i stupanj apsorpcije nakon oralne primjene mogu svrstati u jednu od četiri biofarmaceutske klase:

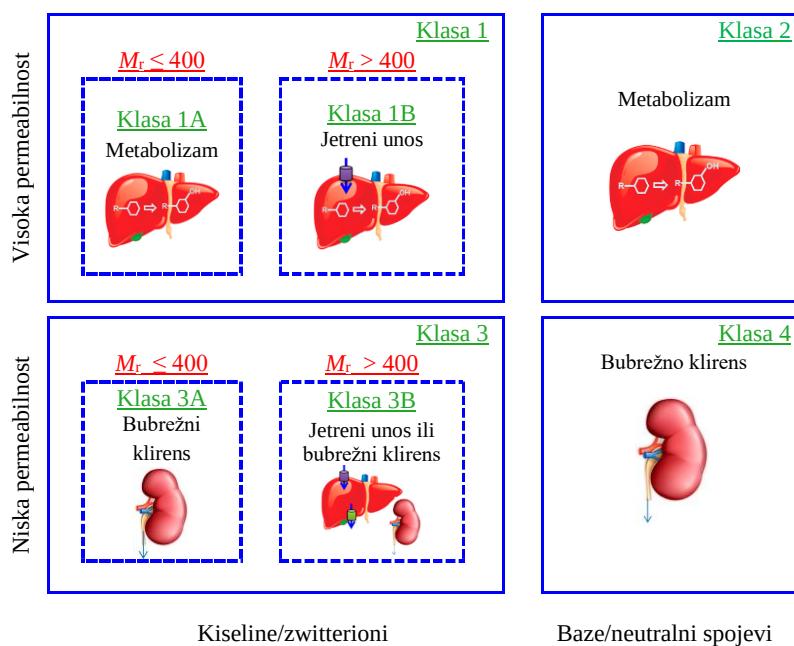
- **klasa I** – tvari visoke permeabilnosti i visoke topljivosti,
- **klasa II** – tvari visoke permeabilnosti i niske topljivosti,
- **klasa III** – tvari niske permeabilnosti i visoke topljivosti i
- **klasa IV** – tvari niske permeabilnosti i niske topljivosti.

Prema ECCS sustavu klasifikacije djelatne tvari se svrstavaju u jednu od 6 klasa:¹⁹⁷

- **klasa 1A** – kiseline/zwiterioni male molekulske mase ($M_r < 400$ Da) i visoke permeabilnosti ($P > 5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Metabolizam ($\geq 70\%$) je prevladavajući mehanizam klirensa spojeva ove klase. Oni se obično metaboliziraju pomoću UDP glukuronoziltransferaze (UGT) $\cong$ CYP2C enzimi $\gg$ esterase $\gg$ enzima CYP3A4.
- **klasa 1B** – kiseline/zwiterioni velike molekulske mase ($M_r \geq 400$ Da) i visoke permeabilnosti ($P > 5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Ovi spojevi uključuju jetreni unos koji je posredovan jetrenim transporterima, odnosno polipeptidima za prijenos organskih aniona OATP1B1/1B3. Uglavnom, metaboliziraju se metaboličkim enzimima CYP2C $>$ esterase $>$ UGT $>$ CYP3A. Nastali metaboliti se iz jetre izlučuju putem žuči te ulaze u cirkulaciju iz koje se izlučuju fecesom ili urinom.
- **klasa 2** – baze i neutralni spojevi s visokom permeabilnošću ($P > 5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Spojevi klase 2 uklanjaju se metabolizmom (visok stupanj metabolizma $\geq 70\%$). Oni

se primarno metaboliziraju enzimima CYP3A4 >> UGT > CYP2D6 > esterase = CYP2C.

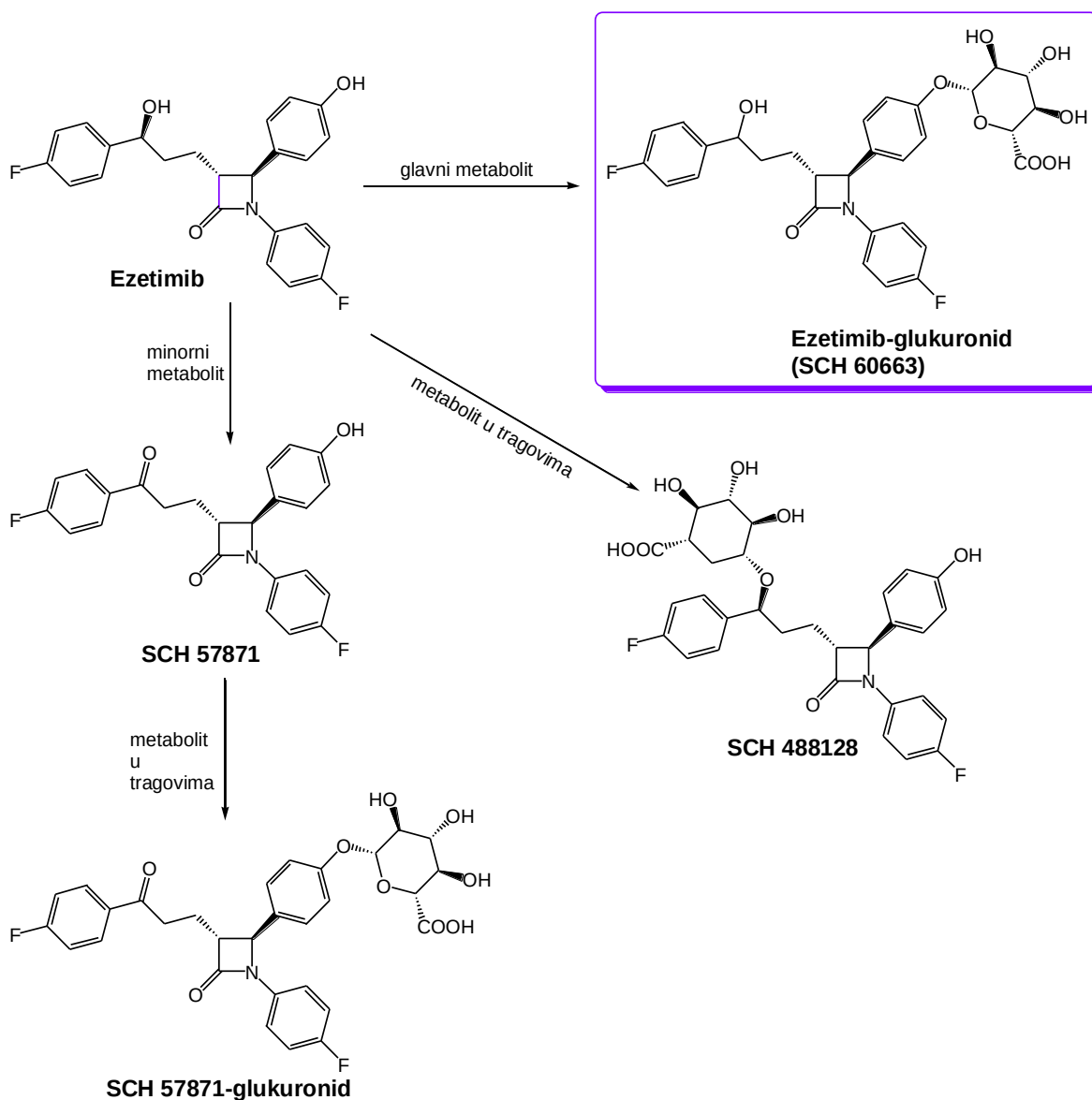
- **klasa 3A** – kiseline i zwitterioni male molekulске mase ($M_r < 400$ Da) i niske permeabilnosti ($P < 5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Spojevi klase 3A bubrežno se čiste, gdje su transporter OAT1 i OAT3 potencijalno uključeni u njihovu aktivnu bubrežnu sekreciju. Spojevi klase 3A su također potencijalni supstrati za prijenosnike lijekova poput BCRP, MRP2 i P-gp, koji olakšavaju izlučivanje hidrofilnih spojeva.
- **klasa 3B** – kiseline i zwitterioni velike molekulске mase ($M_r \geq 400$ Da) i niske permeabilnosti ($P < 5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Njihov mehanizam uklanjanja (klirens) je ili aktivni jetreni unos i/ili izlučivanje putem bubrega. Jetreni unos obično je posredovan OATP transporterima. Jednom kad ovi spojevi dođu u jetru, imaju tendenciju da se iz nje eliminiraju u žuč kao nepromijenjeni lijek. Bubrežno izlučivanje posredovano je specifičnim transporterom OAT.
- **ECSCS klasa 4** – baze i neutralni spojevi niske permeabilnosti ($P < 5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Eliminacija kroz bubrege (75 %) glavni je mehanizam klirensa ove klase. Njihova bubrežna eliminacija posredovana je specifičnim transporterima OAT1, OAT3 i/ili OCT2. P-gp i MATE1/2K su glavni efluksni transporter koji utječu na bubrežnu eliminaciju spojeva klase 4.



Slika 25. ECSCS klasifikacija djelatnih tvari prema svojstvima molekulске mase, ionizacije i permeabilnosti (preuzeto iz El-Kattan i Varma, 2018.)¹⁹⁷

Nakon oralnog uzimanja, ezetimib se brzo metabolizira u tankom crijevu. Glavni put metabolizma ezetimiba je glukuronidacija 4-hidroksifenilne skupine, koja je posredovana enzimima UGT1A1, UGT1A3 i UGT2B15, kojom nastaje ezetimib-glukuronid, poznat kao SCH 60663.^{167,169.170} UDP-glukuronozil-transferaze (UGT) predstavljaju porodicu enzima membrane endoplazmatskog retikuluma koji kataliziraju proces glukuronidacije, reakciju faze II metabolizma lijekova u jetri. Glukuronidacija je proces tijekom kojeg se odvija prijenos kisele glukuronske skupine s uridin-difosfoglukuronske kiseline na funkcionalne skupine specifičnih supstrata, čime se povećava polarnost ciljne lipofilne molekule te se omogućuje njeno izlučivanje iz organizma putem žuči ili urina.²⁰⁰

Ezetimib-glukoronid SCH 60663 je prevladavajući metabolit ezetimiba u plazmi i urinu, a čini se da djeluje kao snažni inhibitor apsorpcije kolesterola. Uz SCH 60663, nastaju još tri metabolita, benzilni glukoronid ezetimiba SCH 488128, keton ezetimiba SCH 57871 i njegov SCH 57871-glukoronid, Slika 26. Međutim, ovi metaboliti nastaju u vrlo malim količinama. Metabolizam ezetimiba posredovan CYP enzimima (oksidacijski metabolizam) je minimalan.^{167,169.170}



Slika 26. Biotransformacijski put ezetimiba

4.1.4. Toksičnost

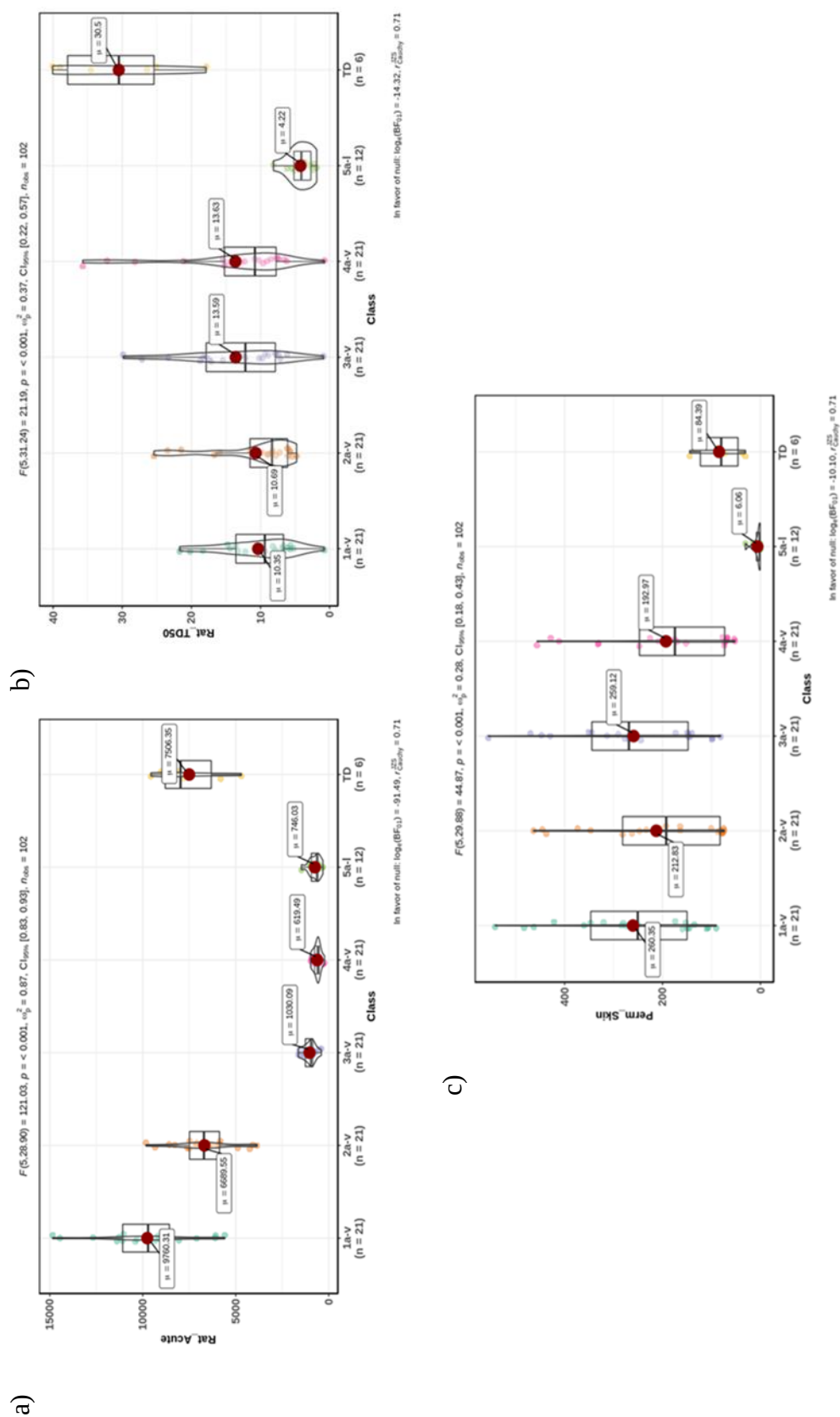
Primjenom programa ADMET Predictor (Modul Tox) za *trans*- β -laktamske uree (**1a-v**, **2a-v**), 3,5-disupstituirane hidantoine (**3a-v**, **4a-v**), parazoantine **5a-l**, ezetimib i amidne analoge ezetimiba **TD1-6** izračunati su sljedeći parametri toksičnosti:

- 1) *Rat_Acute* (mg kg^{-1}) – akutna toksičnost u štakora, predviđena vrijednost doze LD50 za letalnu akutnu toksičnost u 50 % testiranih štakora bilo kojim mehanizmom (kontinuirani model), *Rat_Acute* < [200, 320]

- 2) *Rat_TD50* (mg kg^{-1} na dan) – kronična toksičnost u glodavaca - karcinogenost izražena preko predviđene vrijednosti dnevne oralne doze TD50 koja izaziva tumor u 50% populacije (kontinuirani model), *Rat_TD50* < [4; 6,5]
- 3) *MUT_xxx* – pripadni model predviđa mutagenost čistog spoja na sojevima *S. typhimurium* bakterije TA98 (98), TA_100 (100), TA1535 (1535) i TA97 i/ili TA1537 (97+1537) (klasifikacijski model – pozitivna/negativna mutagenost)
- 4) *MUT_mxxx* – pripadni model predviđa mutagenost spoja nakon aktivacije jetrenih mikrosomalnih enzima u štakora na sojevima *S. typhimurium* bakterije TA98 (98), TA_100 (100), TA1535 (1535) i TA97 i/ili TA1537 (97+1537) (klasifikacijski model – pozitivna/negativna mutagenost)
- 5) *MUT_102+wp2* – pripadni model predviđa mutagenost čistog spoja na soju *S. typhimurium* bakterije TA102 ili soju *E. coli* bakterije WP2 uvrA (klasifikacijski model – pozitivna/negativna mutagenost)
- 6) *MUT_m102+wp2* – pripadni model predviđa mutagenost spoja nakon aktivacije jetrenih mikrosomalnih enzima u štakora na soju *S. typhimurium* bakterije TA102 ili soju *E. coli* bakterije WP2 uvrA (klasifikacijski model – pozitivna/negativna mutagenost)
- 7) *Perm_Skin* ($\text{cm/s} \times 10^7$) – permeabilnost kroz ljudsku kožu (kontinuirani model)
- 8) *hERG_Filter* – potencijalna inhibitorna aktivnost spoja prema hERG ljudskim (engl. *Human Ether-a-go-go Related Gene*) kalijevim (K^+) kanalima – kardiotoksičnost. (klasifikacijski model – toksičan/netoksičan)
- 9) *hERG_pIC50* – mjera afiniteta ispitivanih spojeva za hERG kalijeve kanale i potencijalna kardiotoksičnost izražena kao pIC₅₀. pIC₅₀ je negativni logaritam od vrijednosti IC₅₀ (mol dm^{-3}). (kontinuirani model), *hERG_pIC50* > [5,5; 6]
- 10) *Tox_Risk* – broj potencijalnih problema koje sa toksičnošću može imati ispitivani spoj
- 11) *Tox_Code* – ukupni rizik kada je toksičnost u pitanju. Parametri koji ulaze u *Tox Code*: *hERG* – ukazuje na kardiotoksičnost, *HEPX* – ukazuje na hepatotoksičnost, *Xr* – ukazuje na kroničnu karcinogenost mijerenu na štakorima, *MUT* – ukazuje na mutagenost.

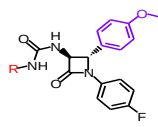
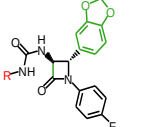
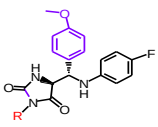
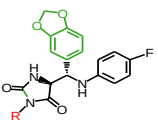
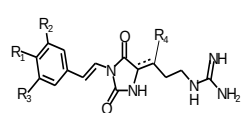
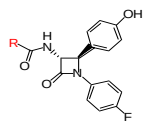
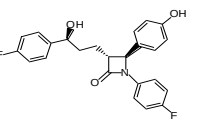
Za većinu *trans*- β -laktamskih urea (**1a-v**, **2a-v**), hidantoina (**3a-v**, **4a-v**), parazoantina **5a-l**, amidnih analoga ezetimiba **TD1-6**, kao i za ezetimib očekuje se da neće izazvati akutnu toksičnost, Slika 27a. Jedino su hidantoini spoj **4s** s 3,5-bis(trifluormetil)fenilnom skupinom

(*Rat_Acute* = 303,98 mg kg⁻¹) i parazoantin I **5i** (*Rat_Acute* = 311,32 mg kg⁻¹) predviđeni kao potencijalni akutni otrovi, Slika 27a. TD50 je koncentracija spoja koja uzrokuje tumor u 50 % životinja. Što je vrijednost TD50 manja, to je spoj kancerogeniji. Iz Slike 27b je vidljivo da su parazoantinski spojevi **5a-l** kancerogeniji u odnosu na ostale klase spojeva. Za četiri parazoantinska derivata (**5b**, **5g**, **5j**, **5k**) predviđene vrijednosti su *Rat*_TD50 < [4; 6,5]. Ezetimib i njegovi amidni analozi **TD1-6** predviđeni su kao najmanje kancerogeni. Parazoantinski spojevi **5a-l** su manje permeabilni kroz kožu u odnosu na ostale spojeve. Najpermeabilniji spojevi kroz membrane su β-laktamski i hidantoini derivati s 4-fenilbutilnom skupinom (**1e**, **2e**, **3e**, **4e**), 4-*tert*-butilfenilnom skupinom (**1o**, **2o**, **3o**, **4o**), 3,5-bis(trifluormetil)fenilnom skupinom (**1s**, **2s**, **3s**, **4s**), 2,6-izopropilfenilnom skupinom (**1u**, **2u**, **3u**, **4u**) i 1-naftilnom skupinom (**1v**, **2v**, **3v**, **4v**).



Slika 27. Usporedba a) akutne toksičnosti *Rat_Acute* (mg/kg), b) kronične toksičnosti u glodavaca *Rat_TD50* (mg kg⁻¹ na dan) i c) permeabilnosti kroz ljudsku kožu *Perm_Skin* (cm s⁻¹ x 10⁷) serije *trans*-β-laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l** i amida **TD**. Vrijednosti za ezetimib: *Rat_Acute* = 4250,24 mg/kg, *Rat_TD50* = 58,86 mg kg⁻¹ na dan i *Perm_Skin* = 35,56 x 10⁷ cm s⁻¹

Tablica 19. Rezultati predviđanja za seriju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, hidantoina **3a-v** i **4a-v**, parazoantina **5a-l**, amida **TD1-6** te za ezetimib dobiveni s modelima programa ADMET Predictor za toksična svojstva spojeva.

Kemijska struktura								
Spoj		1a-v	2a-v	3a-v	4a-v	5a-l	TD1-6	Ezetimib
MUT_{xxx}	MUT_98	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	negativan
	MUT_100	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	
	MUT_1535	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	
	MUT_97+1536	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	10 pozitivnih	6 negativnih	
MUT_{mxxx}	MUT_m98	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	negativan
	MUT_m100	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	
	MUT_m1535	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	
	MUT_m97+1536	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativnih	6 negativnih	
MUT₁₀₂+wp2		21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	7 pozitivnih	6 negativnih	negativan
MUT_{m102}+wp2		21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	21 negativnih	12 negativni	6 negativnih	negativan
hERG-Filter		12 toksičnih	11 toksičnih	15 toksičnih	13 toksičnih	10 netoksičnih	6 toksični	toksičan
hERG- pIC₅₀ (mol dm⁻³)	$\bar{x}$	5,08	4,90	4,69	4,55	4,67	5,01	5,66
	$\pm$ SD	0,28	0,28	0,24	0,24	0,13	0,04	
	Min.	4,53	4,34	4,14	4,00	4,49	4,96	
	Max.	5,49	5,30	5,02	4,88	4,90	5,08	
Tox_Risk	$\bar{x}$	0,16	0,18	0,05	0,14	1,55	0	0,32
	$\pm$ SD	0,31	0,33	0,22	0,35	0,45		
	Min.	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00		
	Max.	1,00	1,00	1,00	1,13	2,00		
Tox_Code		HEPX -1 spoj Xr -5 spojeva	HEPX -1 spoj Xr -6 spojeva	Xr – 2 spoja	HEPX -1 sp. Xr – 2 spoja rat – 2 spoja	Xr – 11 spojeva rat – 1 spoj MUT – 10 spojeva	/	hERG

^aOpis navedenih parametara toksičnosti nalazi se na str. 160 i 161. ^bDetaljne kemijske strukture prikazane su na Slikama 19 i 20.

Za većinu *trans*- β -laktamskih urea (**1g**, **1k-v**, **2g**, **2k-s**, **2u**, **2v**), hidantoina (**3e**, **3g**, **3i-v**, **4e**, **4g**, **4j-s**, **4u**, **4v**), kao i za ezetimib predviđena je inhibitorska aktivnost kalijevog kanala hERG, Tablica 19. Inhibicija kalijevog kanala hERG dovodi do produljenog QT intervala uslijed čega može doći do potencijalno fatalne ventrikularne tahiaritmije zvane Torsade de Pointes. Jedino je za ezetimib između svih analiziranih derivata predviđena moguća kardiotoksičnost.

Primjenom programa ADMET Predictor predviđeni su i parametri hepatotoksičnosti i estrogenog (*Estro_Filter*, klasifikacijski model – da/ne) i androgenog (*Astro_Filter*, klasifikacijski model – da/ne) djelovanja u štakorima. Modeli za hepatotoksičnost predviđaju je li spoj može uzrokovati ili ne povećanje razine jetrenih enzima, odnosno alkalne fosfataze AP (*Ser_AlkPhos*), aspartat aminotransferaze AST (*Ser_AST*), alanin aminotransferaze ALT (*Ser_ALT*), gama-glutamil transpeptidaze GGT (*Ser_GGT*) i laktat dehidrogenaze LDH (*Ser_LDH*) u serumu. Ovi enzimi su dijagnostički biomarkeri oštećenja jetre.²⁰¹ Povećanje razine ovih enzima ukazuje na hepatotoksičnost tj. na oštećenje jetre kod ljudi. Program predviđa da ezetimib, njegovi amidni analozi **TD1-6**, te većina *trans*- β -laktamskih urea i hidantoina dovodi do povećanja razine jetrenih enzima AP, AST, ALT i GGT. Jedino je za β -laktamske i hidantoinne derivate s 3-klor-4-metilfenilnom skupinom (**1p**, **2p**, **4p**) predviđena hepatotoksičnost (*Ser_AST* = povišen i *Ser_ALT* = povišen i *Ser_LDH* = povišen). Za ezetimib je predviđeno androgensko i estrogensko djelovanje, dok se za parazoantinske spojeve **5a-l** može očekivati da ne izazivaju hormonalne učinke. Za ostale derivate moguć je androgenski učinak.

Parametri *Tox_Risk* i *Tox_Code* sumiraju moguće toksične učinke, Tablica 19. Za referentni lijek ezetimib predviđena je kardiotoksičnost (inhibicija hERG kalcijevih kanala). Amidni analozi ezetimiba ističu se kako spojevi s *Tox* rizikom jednakim nula što ukazuje na njihov terapijski potencijal.

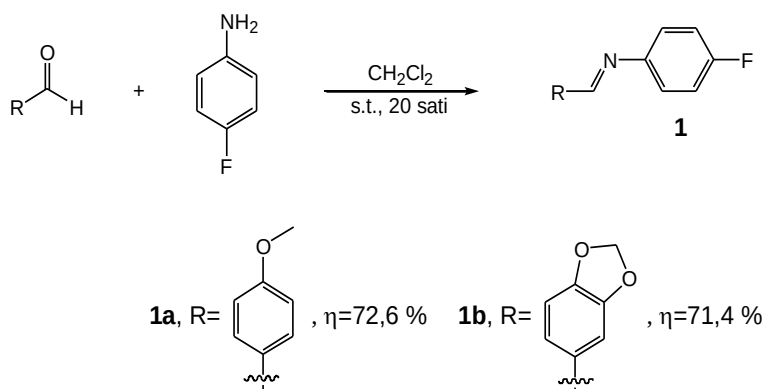
Međutim, parazoantinima je predviđena kancerogenost u štakora (**5a-g**, **5i-l**) i mutagenost (*MUT* > 1) na soju *S. typhimurium* bakterije TA97 i/ili TA1537 i soju *E. coli* bakterije WP2 uvrA (**5a-j**). Akutna toksičnost u štakora predviđena je za parazoantin I **5i**. Za neke ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree (**1e**, **1h**, **1i**, **1s**, **1v**, **2e**, **2o**, **2s-v**) i hidantoinne (**3e**, **3s**, **4s**, **4v**) predviđena je kancerogenost u štakora.

4.2. Priprava 3-amino- β -laktama

3-Amino- β -laktami **3** i **4** dobiveni su reakcijom ciklokondenzacije metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina i odgovarajućih imina **1a** i **1b**, Shema 34.^{202,203} 3-Amino- β -laktam **3** dobiven je i reakcijom ciklokondenzacije metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **8a,b** i imina **1a**²⁰² te Staudingerovom reakcijom, (2+2) ciklokondenzacijom, između *in situ* generiranog ketena i imina **1a**, Sheme 36 i 39. Reakcijom ciklokondenzacije metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **8a,b** i imina **1a** dobiveni su diastereomerno i enantiomerno čisti *trans*-3-amino- β -laktami **3c** i **3d**, Shema 36. Ciklokondenzacijom metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **2** i imina **1a** i **1b** dobivena je diastereomerna racemična smjesa *cis*- i *trans*-3-amino- β -laktama **3** i **4**, Shema 34.²⁰² Staudingerovom reakcijom ciklokondenzacije *N*-ftaloilglicina aktiviranog 2-klor-1-metilpiridin-jodidom i imina **1a** dobivena je racemična smjesa *cis*- i *trans*-izomera 3-ftalimido- β -laktama **9** i **10**, Shema 37. Racemična smjesa *trans*-3-amino- β -laktama **3e** dobivena je iz spoja *trans*-**10** uklanjanjem ftalimido zaštite pomoću etilendiamina u etanolu, Shema 39.

4.2.1. Priprava imina **1a,b**

Prvi korak u sintezi 3-amino- β -laktama bila je priprava Shiffovih baza, imina **1a** i **1b**, prema Shemi 33.



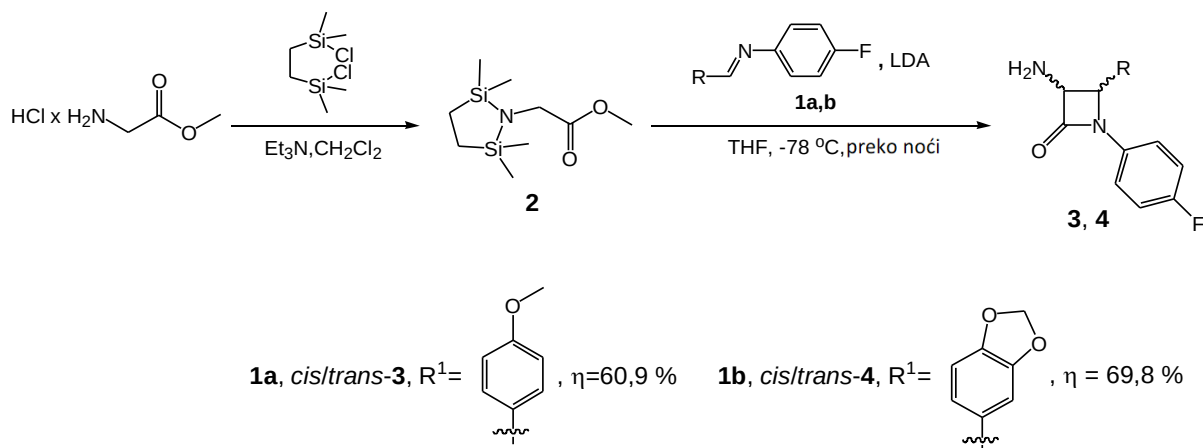
Shema 33. Priprava imina **1a** i **1b**

Imini **1a,b** pripravljeni su reakcijama kondenzacije između 4-fluoranilina i odgovarajućeg aldehida, 4-metoksibenzaldehida ili piperonala (heliotropina), u bezvodnom diklormetanu uz dodatak aktiviranih molekulskih sita (4Å) pri sobnoj temperaturi u trajanju od 20 sati. Nakon uparavanja diklormetana pri sniženom tlaku na rotacijskom vakuumskom uparivaču, dobiveni

su produkti **1a,b** koji su dalje pročišćeni prekrizacijom iz smjese etil-acetata i heksana. Imin **1a** dobiven je u 72,6 %-tnom iskorištenju, a imin **1b** u 71,4 %-tnom iskorištenju.²⁰²

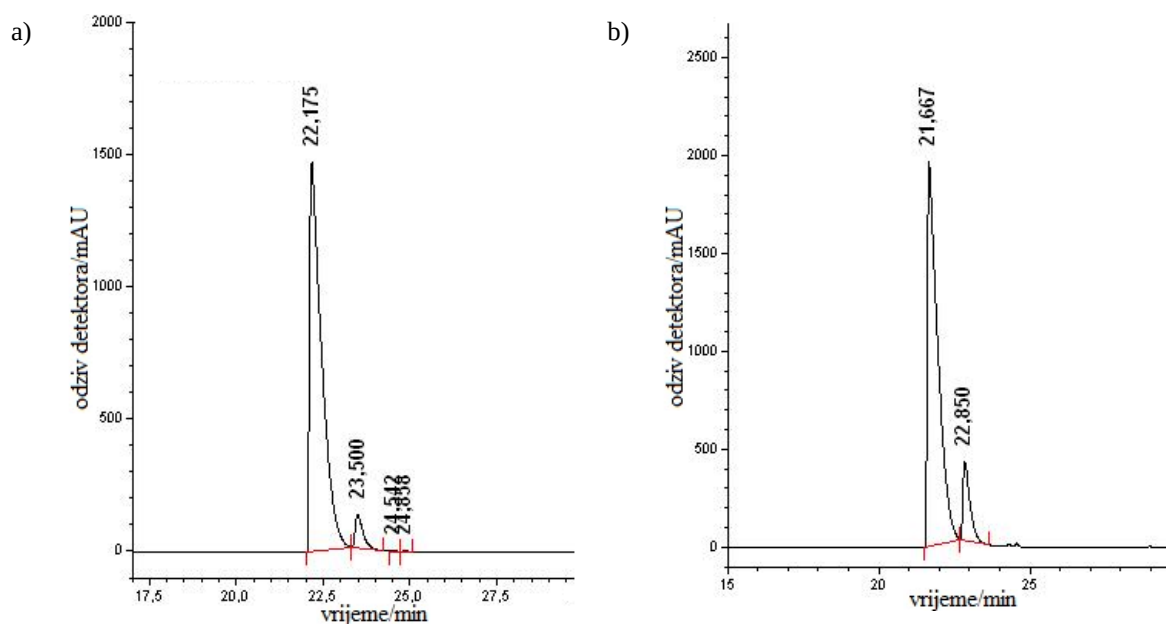
4.2.2. Priprava cis/trans-3-amino-β-laktama **3** i **4**

3-Amino-β-laktami **3** i **4** pripravljeni su prema Shemi 34.



Shema 34. Sintaza 3-amino-β-laktama **3** i **4**

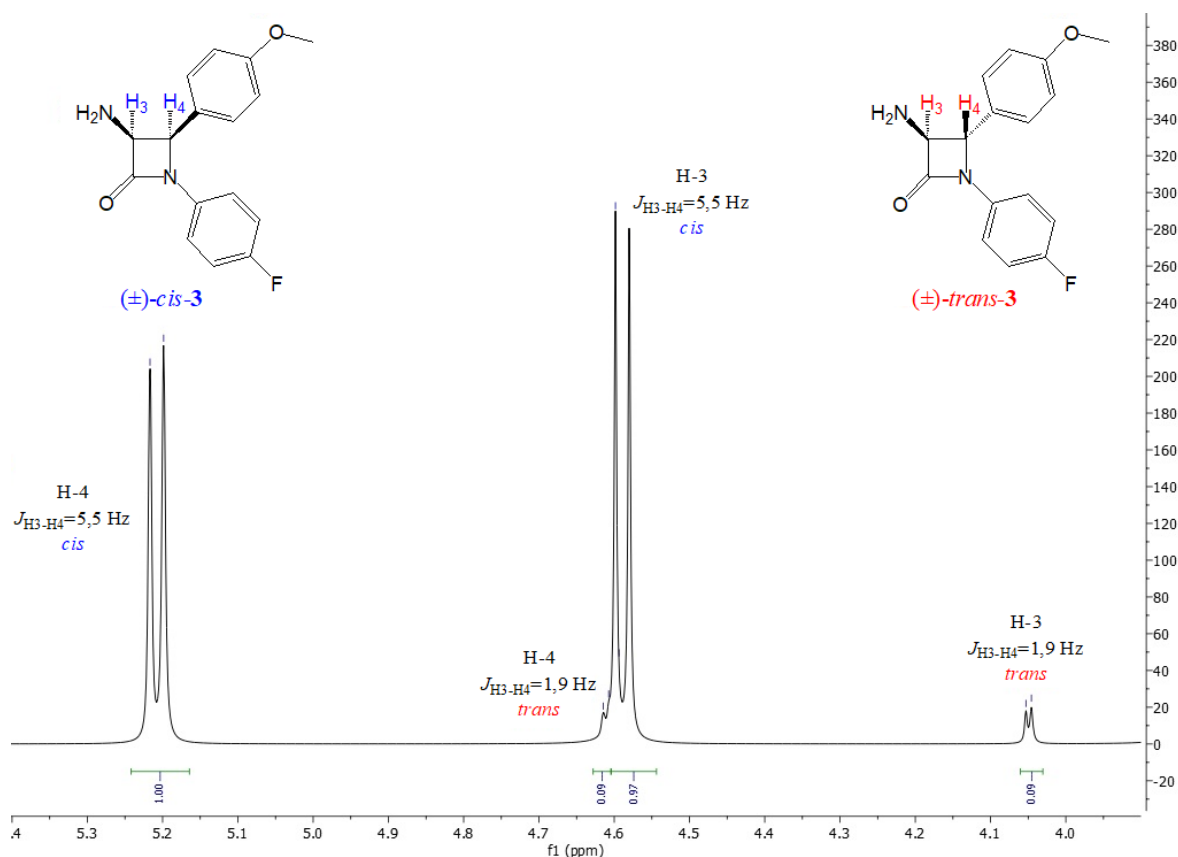
U prvom koraku, amino skupina metilnog estera glicin hidroklorida zaštićena je 2,5-diklor-2,5-dimetil-2,5-disilaheksanom. Reakcija je provedena u diklormetanu uz dodatak trietilamina kao baze. Produkt **2** izoliran je u 99 %-tnom iskorištenju (s oko 10% početnog reagensa), te je izravno korišten u sljedećem stupnju reakcije. 3-Amino-β-laktami **3** i **4** pripravljeni su reakcijom ciklokondenzacije enolata metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **2** i odgovarajućeg imina **1a** i **1b** pomoću litijevog diizopropilamida. Reakcija se odvijala u THF-u na -78 °C u atmosferi argona preko noći, pri čemu su spojevi **3** i **4** izolirani u iskorištenju od 60,9 % i 69,8 %. Primjenom enolata metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina **2** dolazi do nastajanje smjese *cis*- i *trans*-izomera što je uočljivo iz udvostručenih signala u ¹H i ¹³C NMR spektrima. Omjer *cis*- i *trans*-izomera utvrđen je ¹H NMR spektroskopijom i HPLC analizom na koloni Hypersil BDS C18.²⁰² HPLC analizom utvrđeno je da je u reakciji imina **1a** s enolatom **2** dobiveno 95:5 (*cis:trans*)-izomera, a u reakciji imina **1b** s enolatom dobiveno je 88:12 (*cis:trans*)-izomera.^{202,203} Rezultati provedenih HPLC analiza u suglasnosti su s rezultatima analiza dobivenih primjenom NMR spektroskopije.



Slika 28. RP-HPLC kromatogrami 3-amino- β -laktama: a) **3** (*cis*-izomer $t_R = 22,2$ min, *trans*-izomer $t_R = 23,5$ min) i b) **4** ($t_{R(\text{cis-3})} = 21,7$ min, $t_{R(\text{trans-4})} = 22,9$ min) na Hypersil BDS koloni. Mobilna faza A: voda/metanol (90:10, v/v) uz dodatak 0,5 % fosforne kiseline, mobilna faza B: metanol, gradijent 0–5 min 100 % A, 5–30 min 0–100 % B, protok: 1 mL min⁻¹, UV detektor: 254 nm, temperatura kolone: 30 °C, volumen injektiranja: 30 μ L

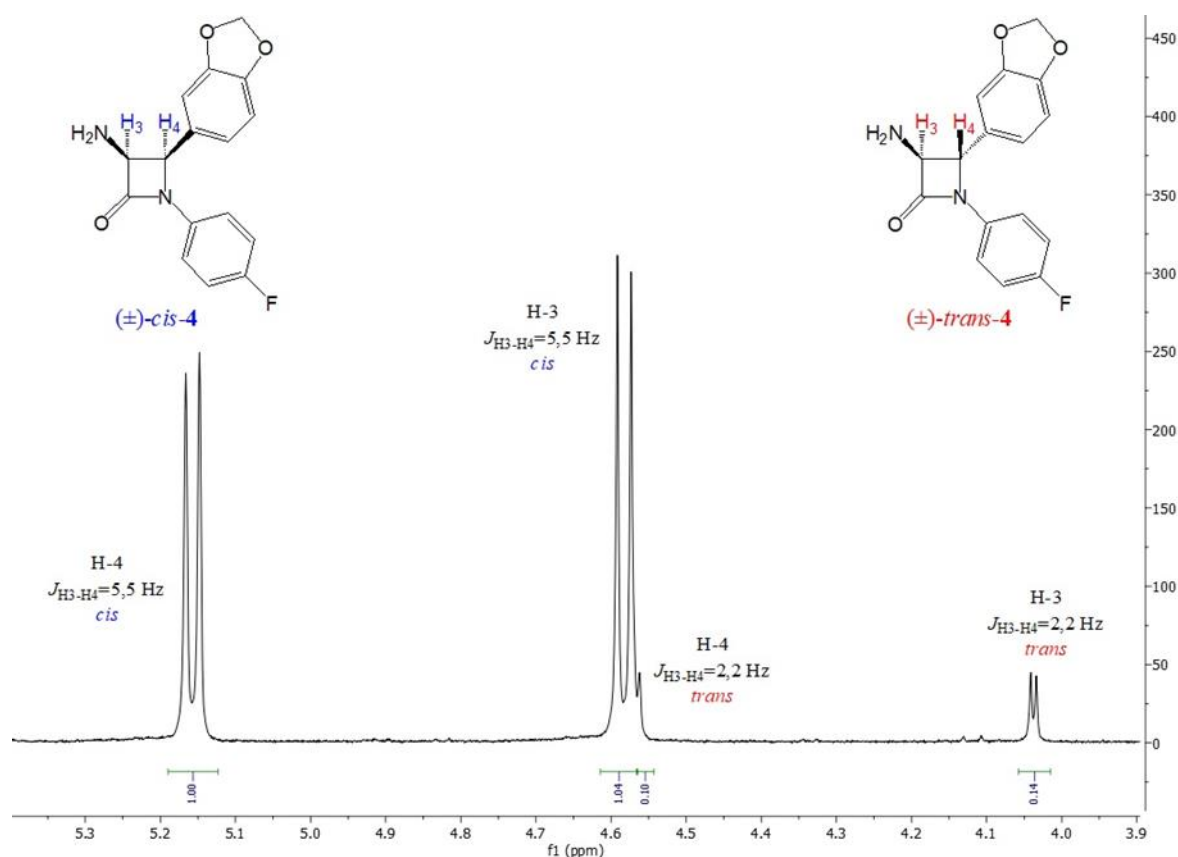
Analizom ¹H NMR spektara 3-amino- β -laktama **3** i **4** utvrđeno je da pretežno nastaje *cis*-izomer. Konstante sprege J za signale vicinalnih protona na C-3 i C-4 položajima β -laktamskog prstena iznose 5,5 Hz za *cis*-**3** i *cis*-**4**, a 1,9 Hz za *trans*-izomer spoja **3** i 2,2 Hz za *trans*-**4**. Analizom ¹H NMR spektara spojeva **3** i **4** utvrđeno je da pretežito nastaju *cis*-izomeri, što znači da su produkti nastali preko (*E*)-litijevog enolata, Shema 35.

Na Slikama 29 i 30 prikazani su dijelovi ¹H NMR spektra u kojem se nalaze karakteristični signali za vicinalne protone *cis*- i *trans*-izomera spojeva **3** i **4**.



Slika 29. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 300 MHz) protona H-3 i H-4 na kiralnim centrima smjese β -laktama *cis/trans*-3

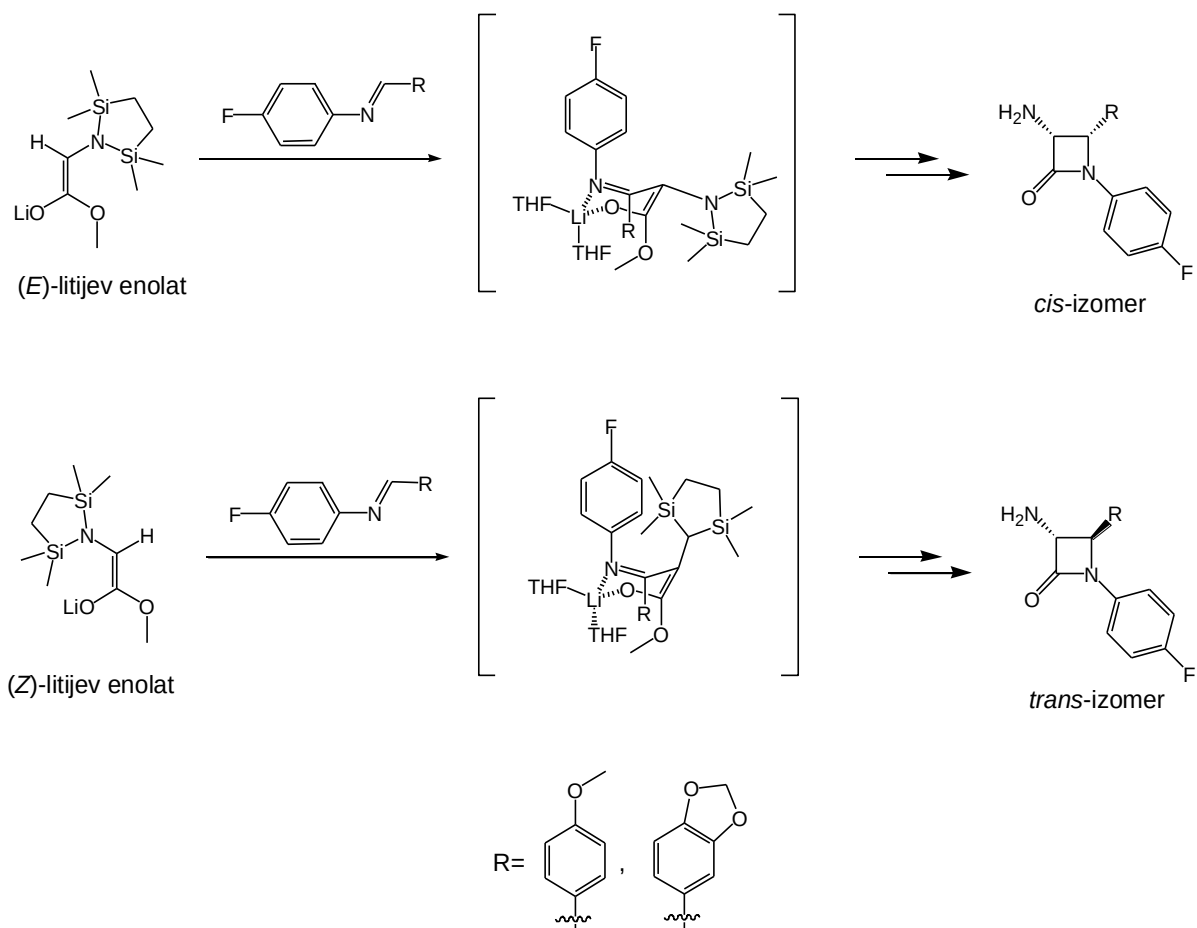
Za *trans*-3 izomer vidljiv je dublet na 4,05 ppm s konstantom sprege od $J = 1,9$ Hz, koji se pripisuje protonu na C-3 položaju β -laktamskog prstena, Slika 29. Isti proton kod *cis*-3 izomera nalazi se na 4,58 ppm s konstantom sprege od $J = 5,5$ Hz, dakle pomaknut je u niže magnetsko polje. Nadalje na 4,61 ppm vidljiv je dublet s konstantom sprege od $J = 1,9$ Hz koji se pripisuje vicinalnom protonu na C-4 položaju β -laktamskog prstena. Isti proton kod *cis*-izomera **3** nalazi se na 5,20 ppm sa spregom od $J = 5,5$ Hz. Konstante sprege od $J = 5,5$ Hz odgovaraju *cis*-konfiguraciji i to je bio način razlikovanja pomoću kojeg je utvrđeno da pretežito nastaje *cis*-izomer.



Slika 30. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 300 MHz) protona H-3 i H-4 na kiralnim centrima smjese β -laktama *cis/trans*-4

Za *trans*-4 izomer vidljiv je dublet na 4,03 ppm s konstantom sprege od 2,2 Hz, koji se pripisuje protonu na C-3 položaju β -laktamskog prstena, Slika 30. Isti proton kod *cis*-4 izomera pomaknut je u niže magnetsko polje i nalazi se na 4,58 ppm sa konstantom sprege od $J = 5,5$ Hz. Nadalje na 4,57 ppm vidljiv je dublet s konstantom sprege od $J = 2,2$ Hz koji se pripisuje vicinalnom protonu na C-4 položaju β -laktamskog prstena *trans*-izomera. Isti proton kod *cis*-izomera 4 nalazi se na 5,15 ppm sa spregom od $J = 5,5$ Hz. Konstante sprege od $J = 5,5$ Hz karakteristične su za *cis*-izomer navedenog spoja.

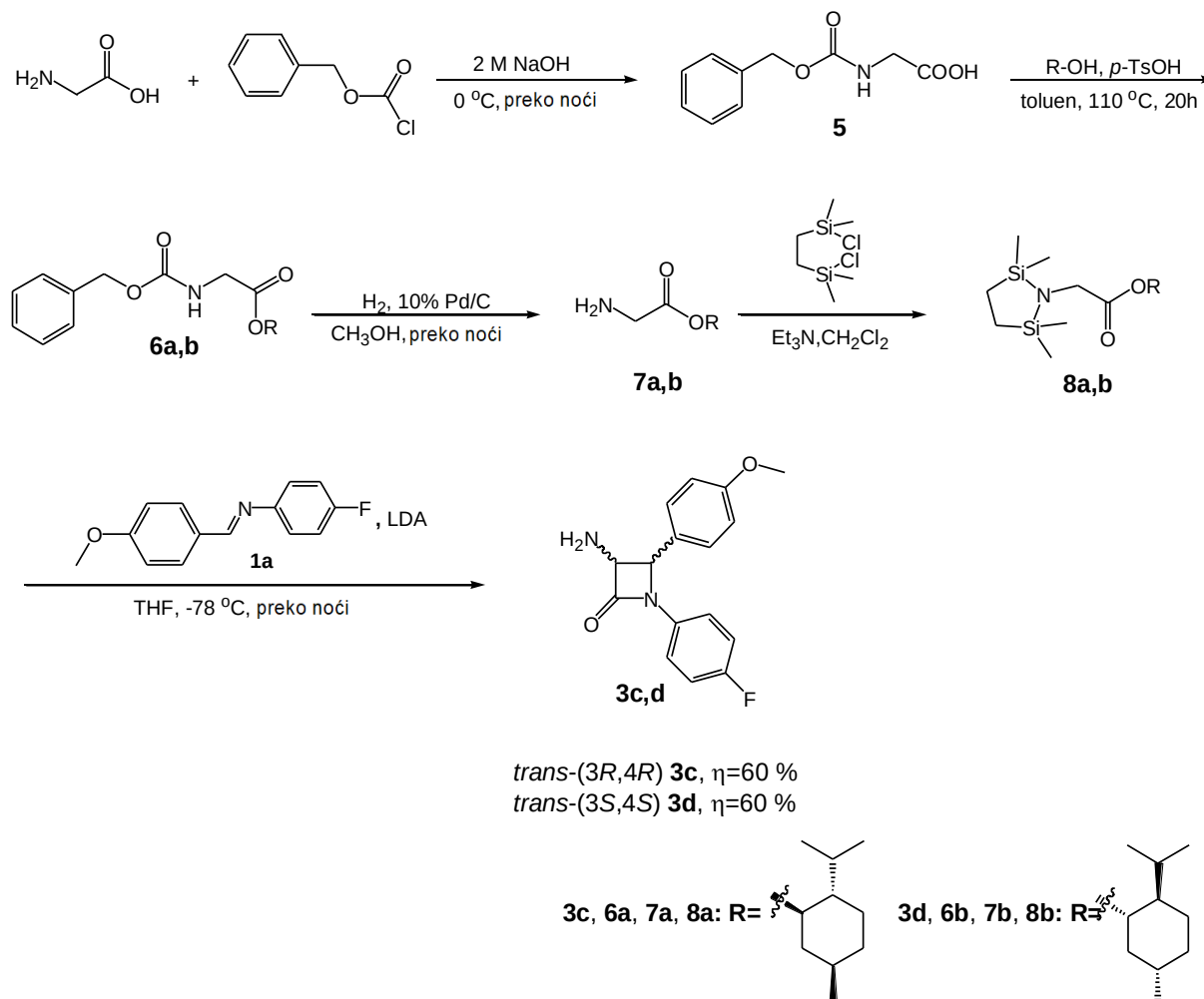
Nadalje, enantiomerni višak *cis*-izomera spojeva 3 i 4 određen je HPLC-kromatografijom upotrebom kolona s kiralnim nepokretnim fazama (Chirallica PST-2 za spoj 3 i Chirallica PST-1 za spoj 4) uz $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70:30, v/v) kao pokretnu fazu i uz protok od 1 mL min^{-1} . Primjenom kiralne HPLC analize utvrđeno je da su spojevi *cis*-3 i *cis*-4 praktički racemične smjese s omjerom enantiomera 48:52 za *cis*-3 i 54:46 za *cis*-4. Kada se koristi enolat metilnog estera *N,N*-bis(silil)glicina 2, prilaz imina 1a i 1b litijevom enolatu jednako je vjerojatan s *Re* (*pro-R*) i *Si* (*pro-S*) strane enolata, što dovodi do nastanka približno ekvimolarnih količina (+)- i (-)-enantiomera *cis*-3-amino- β -laktama 3 i 4, Shema 35.²⁰²



Shema 35. Mehanizam nastajanja *cis*- i *trans*-3-amino- β -laktama. Prikazan je prilaz imina s *Re* strane litijevog enolata pri čemu nastaje (3*R*,4*S*)-*cis* i (3*R*,4*R*)-*trans*-3-amino- β -laktam

4.2.3. Stereoselektivna sinteza *trans*-3-amino- β -laktama **3c,d**

Enantiomerno čisti 3-amino- β -laktami **3c,d** pripremljeni su prema Shemi 36.



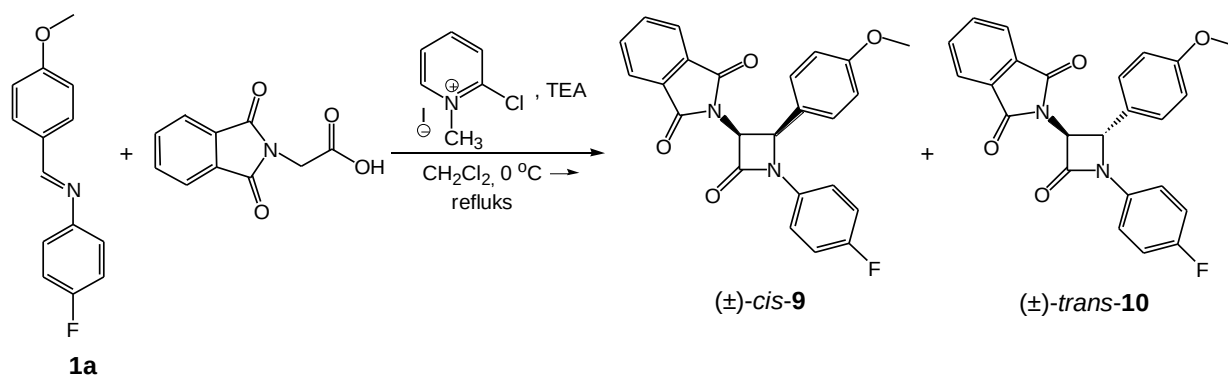
Shema 36. Priprava 3-amino- β -laktama **3c,d**

N-benzoksikarbonilglicin **5** pripremljen je dokapavajem benzoksikarbonil-klorida u otopinu glicina u 2 M natrijevoj lužini pri 0 °C. Nakon zakiseljavanja reakcijske smjese do pH = 2,0, produkt **5** je ekstrahiran etil-acetatom, a otapalo upareno do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Produkt **5** dobiven je u 70 %-tnom iskorištenju. Esterifikacijom Cbz-zaštićenog glicina **5** s (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentolom ili (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentolom uz *p*-toluensulfonsku kiselinu kao kazalizator u refluksirajućem toluenu nastaje (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-mentilni ester *N*-benzoksikarbonilglicina **6a**, odnosno (1*S*,2*R*,5*S*)-(+)-mentilni ester *N*-benzoksikarbonilglicina **6b**. Spojevi **6a** i **6b** izolirani su u vrlo sličnim iskorištenjima od 85,5 % i 87,2 %. Mentilni esteri glicina **7a,b** dobiveni su katalitičkom hidrogenolizom spojeva **6a,b** uz 10 %-tni paladij na ugljiku kao katalizator u metanolu pri sobnoj temperaturi u trajanju od 20 sati. Hidrogenolizom

je uklonjena benzoksikarbonilna skupina. Produkt **7a** izoliran je u 80,8 %-tnom iskorištenju, produkt **7b** u 84,7 %-tnom iskorištenju. U sljedećem reakcijskom koraku, zaštićena je slobodna amino skupina mentilnog estera glicina **7a,b** s 2,5-diklor-2,5-dimetil-2,5-disilaheksanom. Reakcija je provedena u bezvodnom diklormetanu u prisutnosti trietilamina kao baze, pri čemu je spoj **8a** dobiven u 97,1 %-tnom iskorištenju, a spoj **8b** u 96,5 %-tnom iskorištenju. U zadnjem reakcijskom koraku *trans*-3-amino- β -laktami **3c,d** pripravljeni su ciklokondenzacijom imina **1a** i enolata mentilnih estera *N,N*-bis(silil)glicina **8a,b** pomoću litijevog diizopropilamida, koji je generiran *in situ* iz diizopropilamina i *n*-butillitija. Reakcija se odvijala u atmosferi argona i u bezvodnom THF-u pri $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći. Dobiveni 3-amino- β -laktami **3c,d** izolirani su u dobrom iskorištenju, **3c** u 52,9 %-tnom iskorištenju, a **3d** u iskorištenju od 61,2 %. Analizom ^1H NMR spektara 3-amino- β -laktama **3c,d** utvrđeno je da isključivo nastaju *trans*-izomeri, jer se konstante sprege *J* za signale vicinalnih protona na C-3 i C-4 položajima kreću oko 2 Hz, što upućuje da su produkti nastali preko (*Z*)-litijevog enolata, Shema 35.

4.2.4. Priprava *cis/trans*-3-ftalimido- β -laktami **9** i **10**

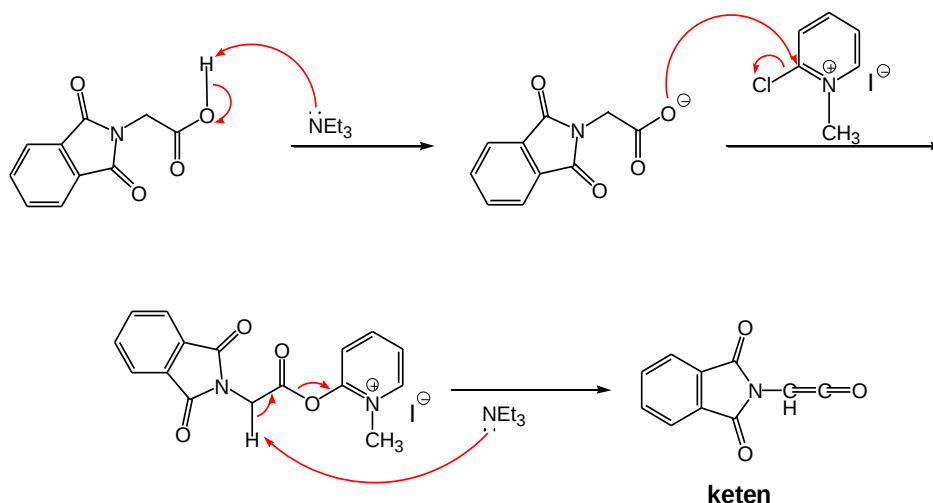
Tijekom izrade ove doktorske disertacije, također je pokušana priprava 3-amino- β -laktama Staudingerovom reakcijom, [2+2] keten-imin ciklokondenzacijom. Na taj način pripravljeni su 3-ftalimido- β -laktami **9** i **10**, Shema 37.⁴¹



Shema 37. Priprava *cis*- i *trans*-3-ftalimido- β -laktama **9** i **10**

Monosupstituirani keten pripravljen je *in situ* iz *N*-ftaloilglicina i 2-klor-1-metilpiridinijevog jodida (Mukaiyama reagens) uz prisutnost trietilamina kao baze u atmosferi argona i bezvodnom diklormetanu pri $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 2 sata, Shema 38. Mukaiyama reagens u ovoj reakciji služi kao aktivator karboksilne kiseline. Reakcijom *N*-ftaloilglicina s trietilaminom nastaje karboksilat anion, koji potom reagira s Mukaiyama reagensom i nastaje ester, reaktivniji

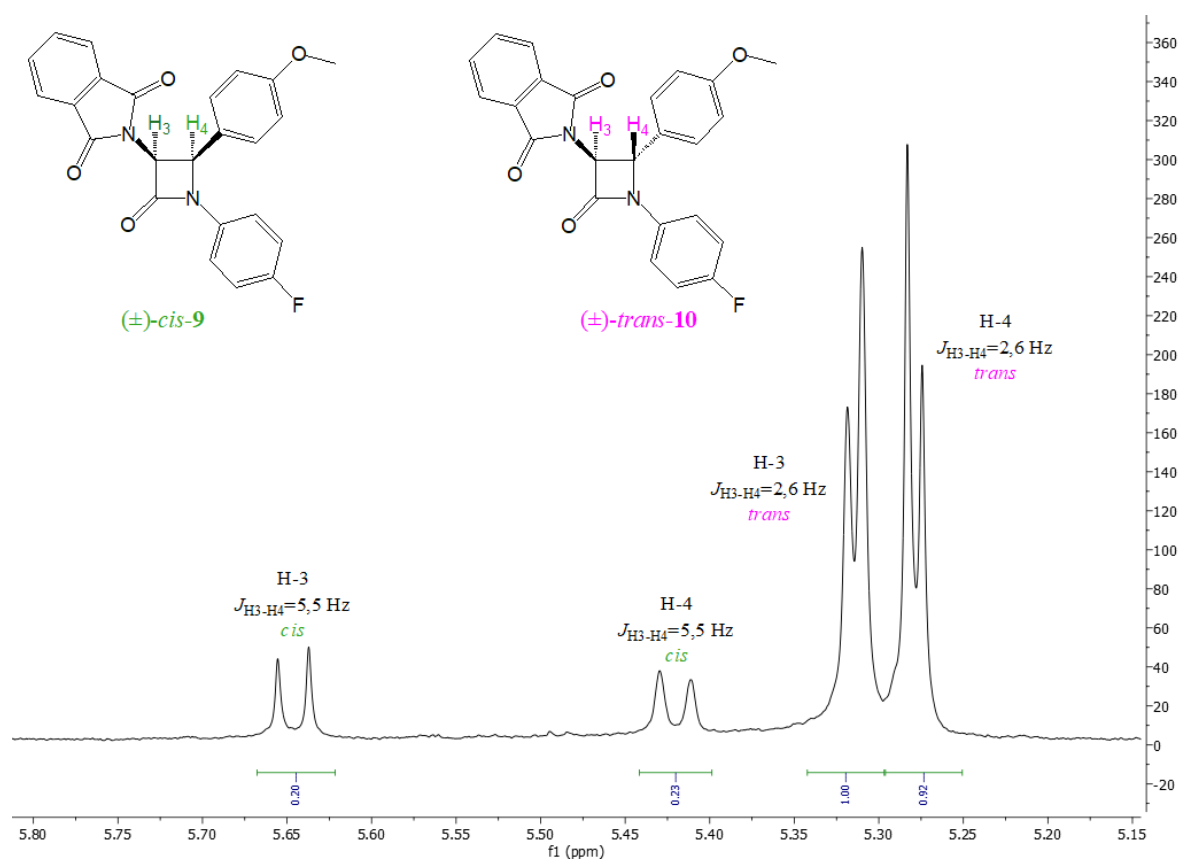
derivat karboksilne kiseline. Nastali ester potom reagira s trietilaminom i nastaje monosupstituirani keten, kako je prikazano na Shemi 38.⁴¹



Shema 38. Mehanizam nastajanja monosupstituiranog ketena iz *N*-ftaloilglicina

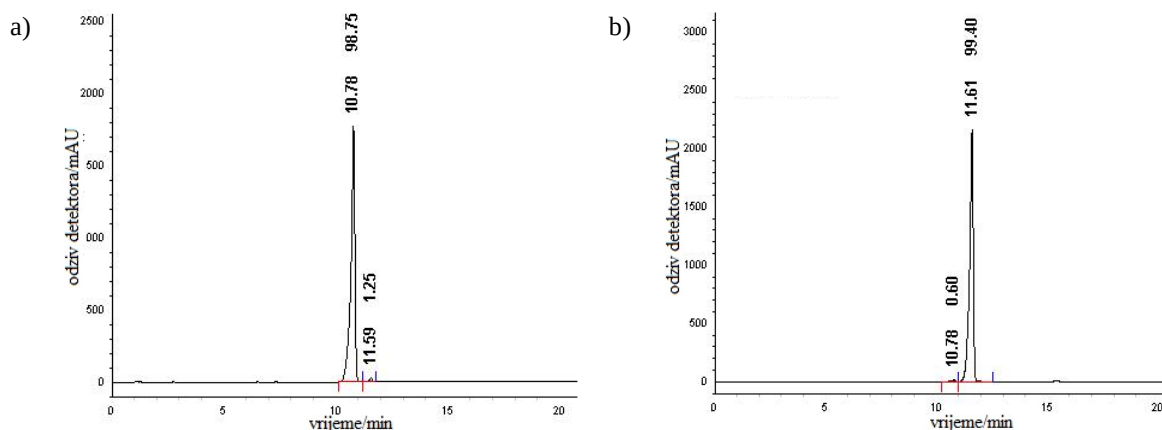
U reakciji ketena i imina dolazi do nukleofilnog napada dušikovog atoma imina **1a** na karbonilnu skupinu ketena pri čemu nastaje β -laktamski prsten kao smjesa *cis*- i *trans*-izomera **9** i **10**. Mehanizam Staudingerove (2+2) ketem-imin cikloadicije prikazan je u poglavlju 2.1.1.1. na Shemi 3.

Stereokemija pripravljenog 3-ftalimido- β -laktama **9** i **10** određena je ^1H NMR spektroskopijom usporedbom konstanti sprege za vicinalne protone na C-3 i C-4 položajima β -laktamskog prstena, Slika 31. Sirova reakcijska smjesa identificirana je ^1H NMR-om kao smjesa *cis* i *trans* izomera u omjeru 1:4, te su izračunate konstante sprege za β -laktamske protone na C-3 i C-4 položajima. Signal za proton vezan na C-4 položaj β -laktamskog prstena javlja se na 5,42 ppm kao dublet s konstantom sprege $J_{\text{H3-H4}}=5,5$ Hz za *cis*-izomer i na 5,28 ppm kao dublet s konstantom sprege $J_{\text{H3-H4}}=2,6$ Hz za *trans*-izomer. Konstanta sprege, $J_{\text{H3-H4}}$, za signale protona vezane na ugljikov atom na položaju C-3 β -laktama iznose 2,6 Hz za *trans*-izomer i 5,5 Hz za *cis*-izomer. Različite konstante sprege omogućuju jednostavno razlikovanje *cis*- ili *trans*- diastereoizomera korištenjem ^1H NMR spektroskopije. Viša vrijednost konstante sprege J odgovara *cis*-izomeru, a niža vrijednost J odgovara *trans*-izomeru.



Slika 31. ^1H NMR spektar (CDCl_3 , 300 MHz) β -laktamskih protona H_3 i H_4 diastereoizomerne smjese $(\pm)$ -*cis*-**9** i $(\pm)$ -*trans*-**10**

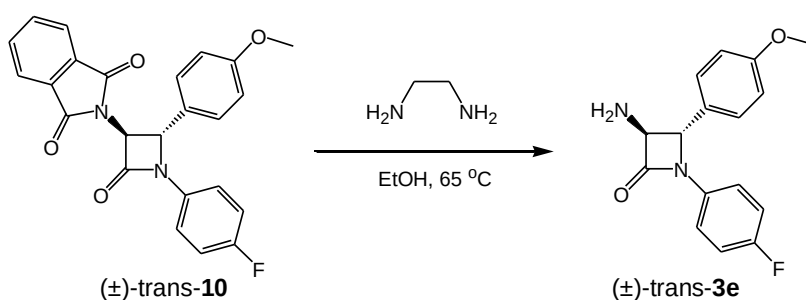
Sirovi reakcijski produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz smjesu otapala kloroform/diklormetan/etilacetat u omjeru 7:1:1. Izolirani su $(\pm)$ -*cis*-3-ftalimido- β -laktam **9** u iskorištenju od 11,0 % i $(\pm)$ -*trans*-3-ftalimido- β -laktam **10** u iskorištenju od 75,2 %. Na temelju RP-HPLC analize utvrđeno je da spoj $(\pm)$ -*cis*-**9** sadrži i 1,32 % *trans*-izomera **10**, a spoj $(\pm)$ -*trans*-**10** sadrži 0,65 % *cis*-izomera **9**. Na Slici 32 prikazani su RP-HPLC kromatogrami $(\pm)$ -*cis*-3-ftalimido- β -laktama **9** i $(\pm)$ -*cis*-3-ftalimido- β -laktama **10** na LiChrospher 100 CN koloni.



Slika 32. RP-HPLC kromatogrami: a) $(\pm)$ -*cis*-3-ftalimido- β -laktama **9** i b) $(\pm)$ -*trans*-3-ftalimido- β -laktama **10** na LiChrospher 100 CN koloni. Mobilna faza A: H_2O , mobilna faza B: ACN, gradijent 0-15 min 30-70 % B, protok: 1 mL min^{-1} , MWD detektor: 254 nm, temperatura kolone: 30°C , koncentracija uzorka: $0,5 \text{ mg/mL}$, volumen injektiranja: $20 \mu\text{L}$

4.2.5. Priprava $(\pm)$ -*trans*-3-amino- β -laktama **3e**

Nakon kromatografskog odjeljivanja ftalimido derivata 3-amino- β -laktama **10** krenulo se na uklanjanje ftalimidne skupine i dobivanje slobodne amino skupine. Tako je $(\pm)$ -*trans*-3-amino- β -laktam **3e** pripravljen reakcijom *trans*-3-ftalimido- β -laktama **10** s etilendiaminom u bezvodnom etanolu, Shema 39. Reakcijska smjesa grijana je na 65°C tijekom 1 sata. U reakciji dolazi do uklanjanja zaštitne ftalimido skupine pri čemu nastaje primarna amino skupina na C-3 položaju β -laktama **3e**. $(\pm)$ -*trans*-3-amino- β -laktam **3e** izoliran je u 66,5 %-tnom iskorištenju.

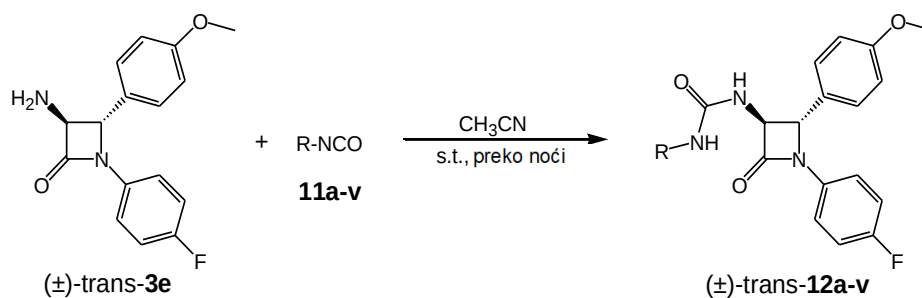


Shema 39. Priprava $(\pm)$ -*trans*-3-amino- β -laktama **3e**

4.3. Priprava ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

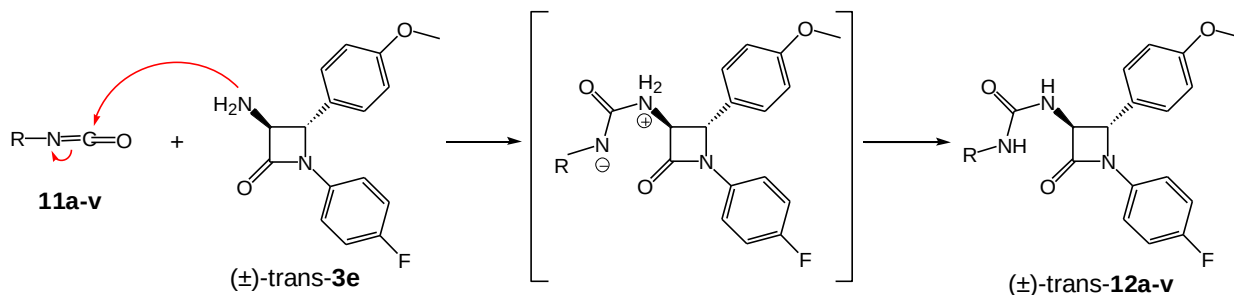
U ovom je radu prikazana priprava novih, do sada u literaturi neistraženih, ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** s različitim supstituentima na C-3 položaju β -laktamskog prstena. β -Laktamske uree **12a-v** pripravljene su reakcijom ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama **3e** i odgovarajućih alkilnih i arilnih izocijanata **11a-v** u acetonitrilu u trajanju reakcije od 20 sati, Tablica 20. Nakon kromatografije produkti **12a-v** su izolirani u obliku ulja, a potom je dobiveno ulje trituirano s heksanom. ($\pm$)-*trans*- β -Laktamske uree **12a-v** izolirane su u dobrom do odličnom iskorištenju, od 68,5 do 93,5 %.

Tablica 20. Priprava ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** iz ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama **4e** i odgovarajućih izocijanata **11a-v**



Unos	Izocijanat	β -laktamska urea	R	η (%)
1	11a	12a	alil	89,9
2	11b	12b	heksil	88,8
3	11c	12c	ciklopentil	85,5
4	11d	12d	cikloheksil	84,0
5	11e	12e	4-fenilbutil	78,8
6	11f	12f	furfuril	89,9
7	11g	12g	fenil	93,5
8	11h	12h	benzil	89,8
9	11i	12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	68,5
10	11j	12j	benzoi	90,4
11	11k	12k	2-klorfenil	87,9
12	11l	12l	3-klorfenil	82,1
13	11m	12m	4-klorfenil	88,7
14	11n	12n	4-metoksifenil	93,0
15	11o	12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	91,2
16	11p	12p	3-klor-4-metilfenil	87,0
17	11r	12r	3,5-dimetilfenil	90,0
18	11s	12s	3,5-bis(trifluormetil)fenil	75,3
19	11t	12t	2,6-dimetilfenil	88,5
20	11u	12u	2,6-diizopropilfenil	82,8
21	11v	12v	1-naftil	84,2

Mehanizam priprave β -laktamskih urea prikazan je na Shemi 40.

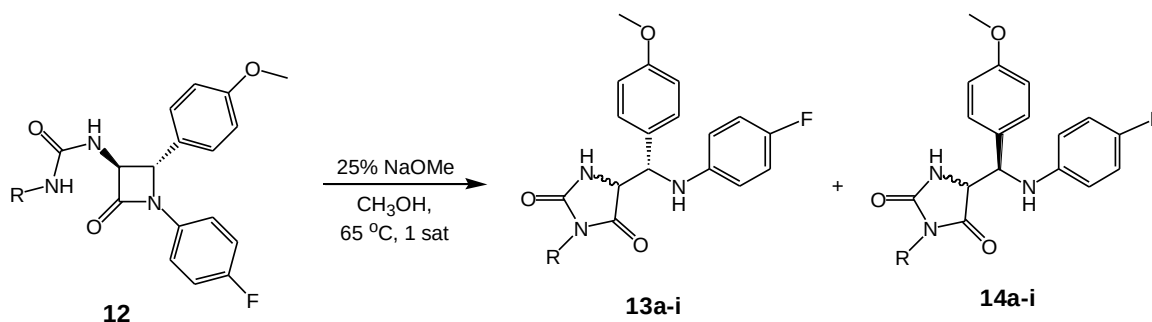


Shema 40. Mehanizam nastajanja β -laktamskih urea **12a-v**

4.4. Sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**

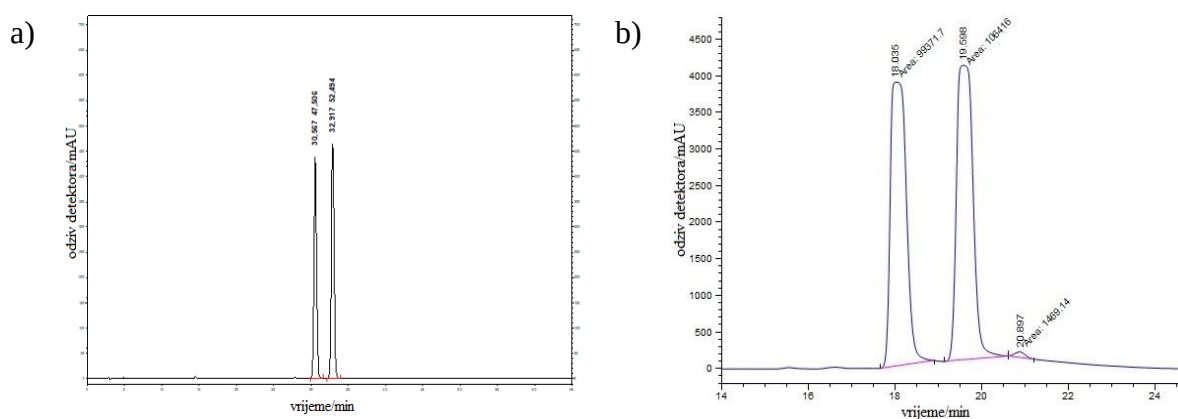
U nastavku istraživanja pripremljeni su novi hidantoini **13a-i** i **14a-i** intramolekulskom transformacijom iz različito supstituiranih $(\pm)\text{-trans-}\beta$ -laktamskih urea **12a-c**, **12f**, **12h**, **12o-p**, **12t** u prisustvo baze natrijevog metoksida u metanolu, Tablica 21.

Tablica 21. Priprava $(\pm)\text{-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i}$ iz $(\pm)\text{-trans-}\beta$ -laktamskih urea **12a-c**, **12f**, **12h**, **12o-p**, **12t**



Unos	β -laktamska urea	Hidantoin	R	η (%)	13:14
1	12a	13a:14a	alil	85,8	47,5:52,5
2	12b	13b:14b	heksil	91,8	46,9:53,1
3	12c	13c:14c	ciklopentil	79,5	48,2:51,8
4	12f	13d:14d	furfuril	81,5	47,4:52,6
5	12h	13e:14e	benzil	86,4	44,1:55,9
6	12o	13f:14f	4-tert-butilfenil	88,8	44,5:54,5
7	12p	13g:14g	3-klor-4-metilfenil	75,3	50:50
8	12r	13h:14h	3,5-dimetilfenil	58,8	51,0:49,0
9	12t	13i:14i	2,6-dimetilfenil	75,8	46,9:53,1

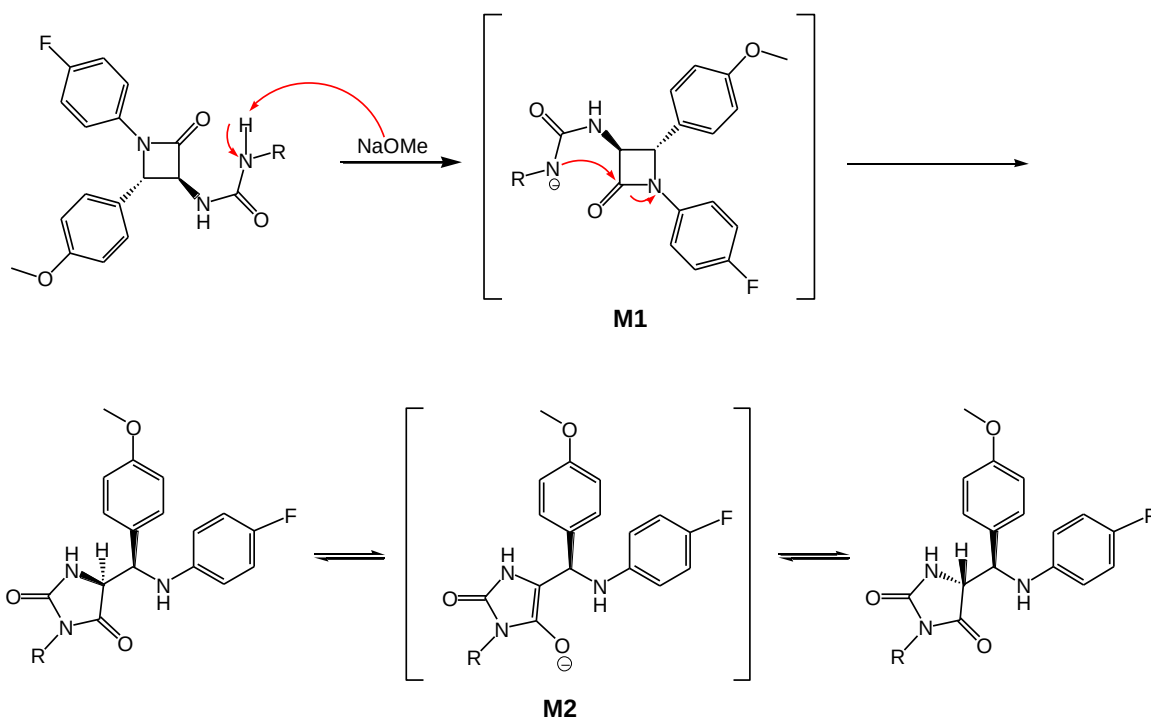
Pripravljeni sirovi hidantoini pročišćeni su kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz smjesu otapala kloroforma i etil-acetata u omjeru 2:1 ili 4:1. Produkti **13a-i/14a-i** izolirani su u dobrom do odličnom iskorištenju, od 58,8 do 91,8 %. U svim reakcija dolazi do očekivanog nastajanja dva diastereomera hidantoina što je uočljivo iz udvostručenih signala u ^1H i ^{13}C NMR spektrima. Omjer diastereomera u svim reakcijama određen je pomoću ^1H NMR spektroskopije i HPLC analize. Prilikom analize smjese s ^1H NMR spektroskopijom uspoređen je odnosa signala karakterističnog protona na C-5 položaju hidantoiniskog prstena. Kod HPLC analize na Zorbax Extend-C18 koloni korišten je gradijent pokretne faze A (voda uz dodatak 0,2 % TFA) i pokretne faze B (acetonitril uz dodatak 0,1 % TFA), vrijeme analize 60 min, protok $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, pri UV detekciji od 254 nm, Slika 34. U svim slučajevima, reakcije su pokazale nisku diastereoselektivnost, a jedini izuzetak je spoj **13h:14h** u kojem nastaje ekvimolarna količina diastereomera. Na Slici 33 prikazani su HPLC kromatogrami diastereomerne smjese hidantoina **13a/14a** na analitičkoj i preparativnoj koloni.



Slika 33. RP-HPLC kromatogrami diastereomerne smjese hidantoina **13a/14a** na: a) analitičkoj koloni Zorbax Extend-C18, (250 mm x 4,6 mm), $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, pokretna faza A (voda uz dodatak 0,2% TFA), pokretna faza B (acetonitril uz dodatak 0,1% TFA i b) na preparativnoj koloni Zorbax Extend C-18 PrepHT (150 mm x 21,2 mm), 17 mL min^{-1} , pokretna faza A (voda), pokretna faza B (acetonitril)

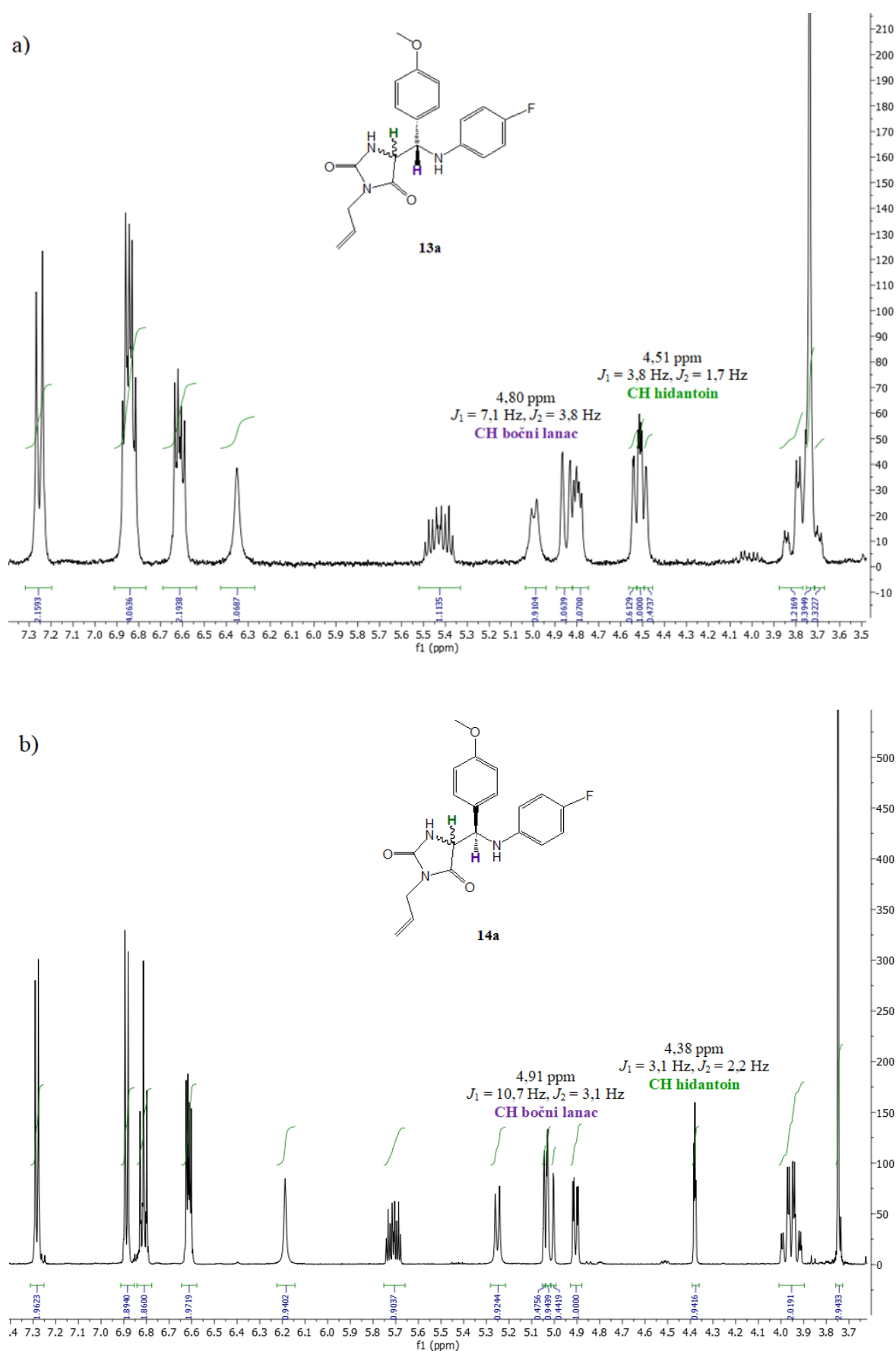
Mehanizam nastajanja hidantoiniskog prstena iz β -laktama prikazan je na Shemi 41, a odvija se tako da u prvom koraku baza (natrijev metoksid) deprotonira amino skupinu bočnog lanca pri čemu nastaje međuprodukt **M1**. Nastali ureido anion **M1** nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom β -laktamskog prstena što dovodi do cijepanja N1-C2 veze (intramolekulska amidoliza) i intramolekulske ciklizacije što rezultira stvaranjem hidantoiniskog prstena. U bazičnoj sredini optički aktivni hidantoini lako tautomeriziraju što ukazuje na postojanje enol-hidantoiniskog tautomera. Budući da su se za pripravu 3,5-disupstituiranih hidantoina koristile

racemične *trans*- β -laktamske uree dobivena je diastereomerna smjesa racemičnih hidantoina *cis*-**13a-i** i *trans*-**14a-i**.



Shema 41. Mehanizam nastajanja hidantoina iz β -laktamskih urea

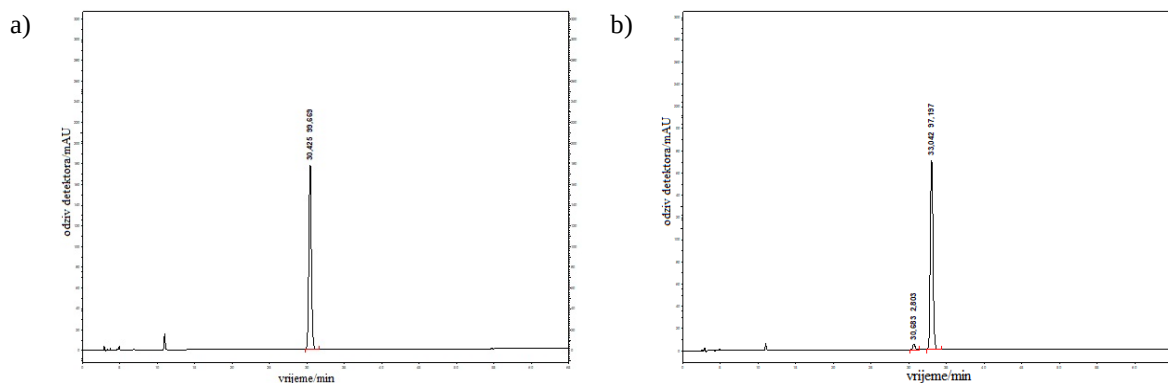
Dobivene diastereomerne smjese hidantoina **13a-i/14a-i** odvojene su primjenom preparativne HPLC-kromatografije na Zorbax Extend-C18 PrepHT koloni (metoda E-H, pokretna faza A - voda uz dodatak 0,2% TFA i B - acetonitril uz dodatak 0,1% TFA, vrijeme analize 50,18 min, protok 17 mL min⁻¹, λ =254 nm,). Sakupljene frakcije čistih *cis*- i *trans*-izomera ekstrahirane su s kloroformom (3 x 20 mL). Spojeni organski slojevi su osušeni nad bezvodnim magnezijevim sulfatom, profiltrirani i upareni do suha na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Na Slici 34 prikazani su ¹H NMR spektri *cis*- i *trans*-hidantoina **13a** i **14a**.



Slika 34. ^1H NMR spektari (CD_3CN , 600 MHz) hidantoina **13a** i **14a** s alilnim supstituentom na N-3 položaju hidantoiniskog prstena

Za *cis*-hidantoin **13a** vidljiv je singlet na 3,74 ppm koji se pripisuje protonima metoksi skupine. Nadalje, vidljiv je multiplet od 3,67–3,86 ppm koji se pripisuje protonima alilne CH₂ skupine vezane na N-3 položaj hidantoinskog prstena. Signali protona CH₂= skupine javljaju se na 4,48 ppm kao dublet s konstantom sprege $J = 3,1$ Hz, na 4,51 ppm s konstantom sprege od $J = 3,8$ Hz i na 4,85 ppm kao dublet dubleta s konstantama sprege od $J_1 = 10,4$ Hz i $J_2 = 1,4$ Hz. Signal za proton vezan na C-5 položaj hidantoinskog prstena javlja se na 4,51 ppm kao dublet dubleta s konstantama sprege od $J_1 = 3,8$ Hz i $J_2 = 1,7$ Hz. Signal protona vezanog na N-1 položaj hidantoinkog prstena javlja se na 6,35 ppm kao singlet, dok se signal protona NH skupine u bočnom lancu javlja na 4,99 ppm kao dublet s konstantom sprege od $J = 7,4$ Hz. Signal protona vezanog na kiralni ugljikov atom u bočnom lancu javlja se na 4,80 ppm kao dublet dubleta s konstantama sprege od $J_1 = 7,1$ Hz i $J_2 = 3,8$ Hz. Signal alilne CH skupine vidljiv je kao dublet dublet tripleta s konstantama sprege od $J_1 = 17,2$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz i $J_3 = 5,0$ Hz. Signal aromatskih protona javlja se u području od 6,56–7,36 ppm.

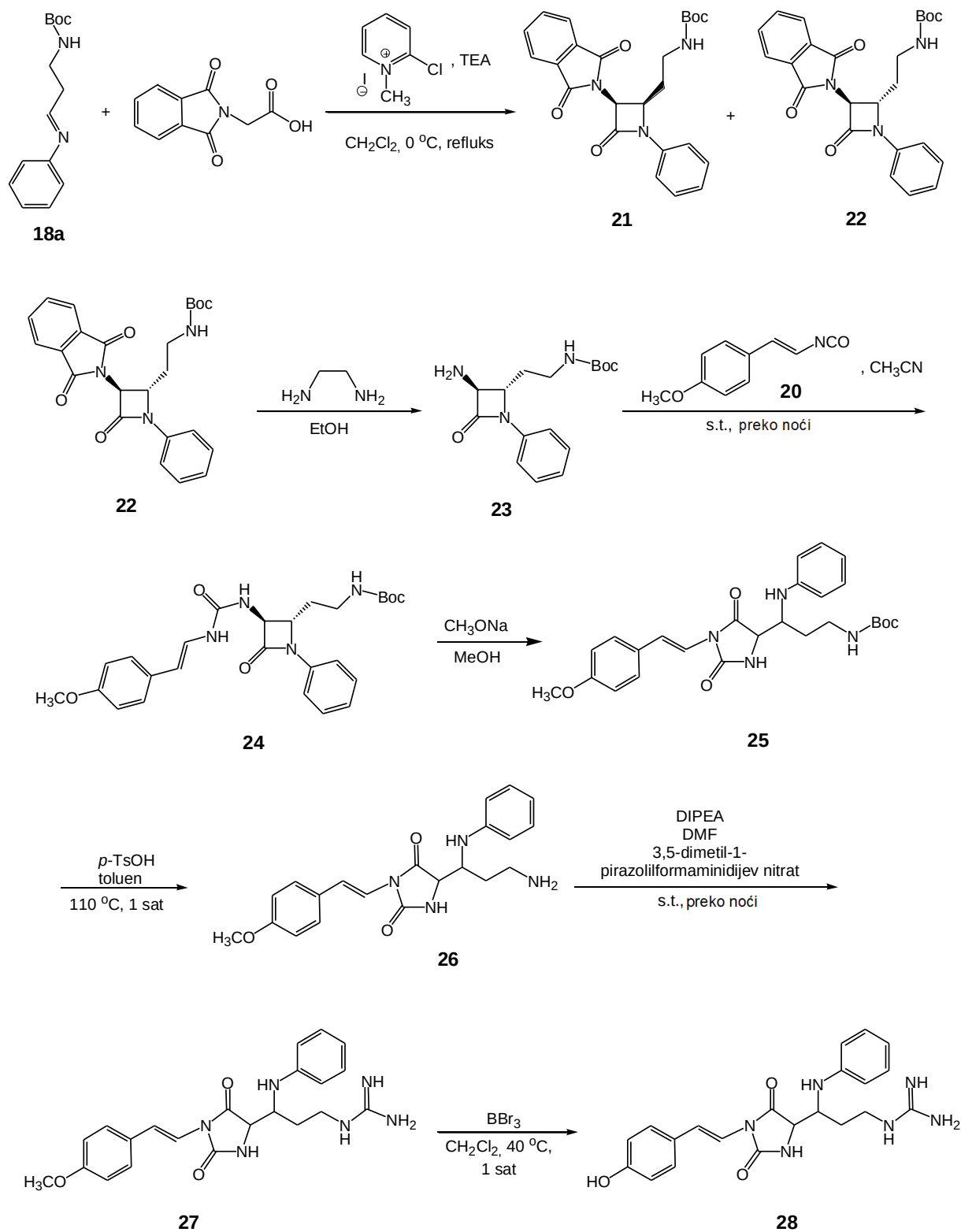
Za *trans*-hidantoin **14a** vidljiv je singlet na 3,75 ppm koji se pripisuje protonima metoksi skupine. Nadalje, vidljiv je multiplet od 3,95–4,05 ppm koji se pripisuje protonima alilne CH₂ skupine vezane na N-3 položaj hidantoinskog prstena. Signali protona CH₂= skupine vidljivi su kao dublet dubleta na 5,00 ppm s konstantama sprege od $J_1 = 9,2$ Hz i $J_2 = 1,5$ Hz i kao dublet na 5,05 ppm s konstantom sprege od $J = 3,1$ Hz. Signal za proton vezan na C-5 položaj hidantoinskog prstena javlja se na 4,38 ppm kao dublet dubleta s konstantama sprege od $J_1 = 3,1$ Hz i $J_2 = 2,2$ Hz. Signal protona vezanog na N-1 položaj hidantoinkog prstena javlja se na 6,18 ppm kao singlet, dok se signal protona NH skupine u bočnom lancu javlja na 5,25 ppm kao dublet s konstantom sprege od $J = 10,8$ Hz. Signal protona vezanog na kiralni ugljikov atom u bočnom lancu javlja se na 4,91 ppm kao dublet dubleta s konstantama sprege od $J_1 = 10,7$ Hz i $J_2 = 3,1$ Hz. Signal alilne CH skupine vidljiv je kao dublet dublet tripleta na 5,71 ppm s konstantama sprege od $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 9,9$ Hz i $J_3 = 5,0$ Hz. Signal aromatskih protona vezanih na C-2 i C-6 položaj 4-fluorfenila javlja se u području od 6,55–6,68 ppm, signal protona vezanih na C-3 i C-5 položaj 4-fluorfenilne skupine vidljiv je na 6,81 ppm kao triplet s konstantom sprege od $J = 8,7$ Hz. Signal protona vezanih na C-3 i C-5 položaju 4-metoksifenilne skupine vidljiv je kao dublet na 6,89 ppm s konstantom sprege od $J = 8,7$ Hz, a signal protona vezanih na C-2 i C-6 položaju vidljiv je kao dublet na 7,28 ppm s konstantom sprege od $J = 8,7$ Hz. Na Slici 36 prikazani su HPLC kromatogrami čistih diastereomera *cis*-**13a** i *trans*-**14a** na koloni Zorbax Extend C18.



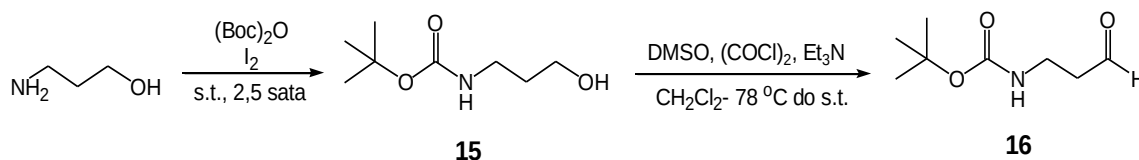
Slika 35. RP-HPLC kromatogrami: a) *syn*-**13a** i *anti*-**14a** hidantoina s alilnim supstituentom na N-3 položaju hidantoinanskog prstena. Kolona Zorbax Extend-C18, pokretna faza A (voda uz dodatak 0,2% TFA), pokretna faza B (acetonitril uz dodatak 0,1% TFA), gradijent 0-60 min 35-48 %B, 60-63 min 48 %B, 63,01-67 min 35 %B, protok 0,8 mL min⁻¹, UV detektor pri 254 nm, temperatura kolone 25 °C, volumen injektiranja 20 µL

4.5. Sinteza fenilamino-derivata parazoantina A **28** i F **27**

U ovom radu pokušana je priprava fenilamino-derivata parazoantina A **28** i F **27** istom metodologijom kojom su pripremljeni hidantoini **13a-i/14a-i**, odnosno intramolekulskom transformacijom β-laktamske uree **24** u prisustvu natrijevog metoksida kao baze. Uklanjanjem Boc zaštite i gvaniliranjem amino skupine predviđa se priprava fenilamino-derivata parazoantina F **27**, a daljnjim demetiliranjem **27** konačna priprava fenilamino-derivata parazoantina A **28**. Predloženi sintetski put prikazan je na Shemi 42.

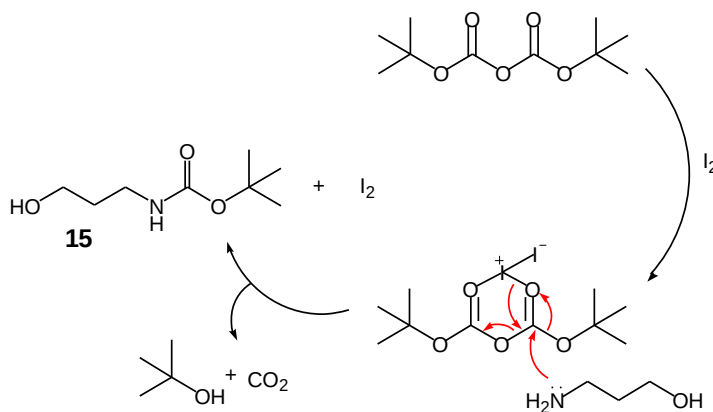


Shema 42. Sintetski put priprave fenilamino-derivata parazoantina F **27** i A **28**



Shema 43. Priprava *N*-Boc-3-aminopropanala **16**

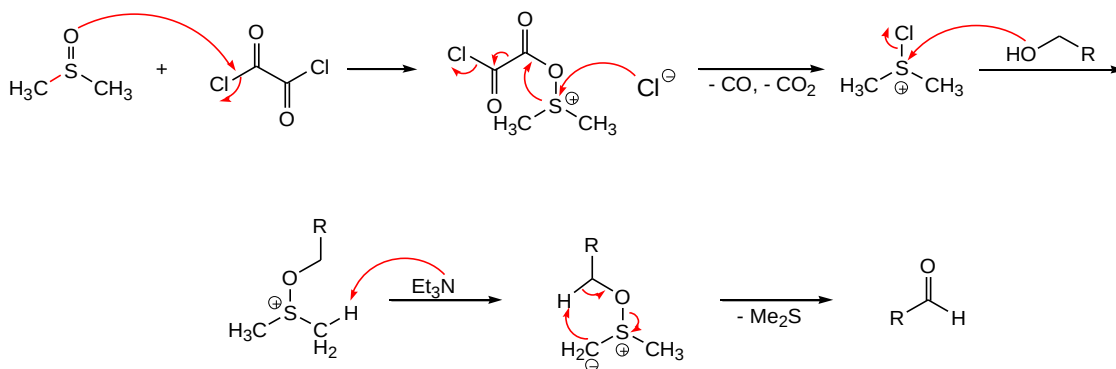
Aldehid **16** priređen je u dva reakcijska koraka polazeći od 3-aminopropanola, Shema 43. U prvom koraku reakcijom 3-aminopropan-1-ola s di-*tert*-butil-dikarbonata i katalitičkom količinom joda (10 mol%) bez dodatka otapala pri sobnoj temperaturi u trajanju od 2,5 sata pripremljen je *N*-Boc-3-aminopropan-1-ol **15**. Dobiveni aminoalkohol **15** izoliran je ekstrakcijom te pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat 1:1. Produkt **15** izoliran je u 78 %-tnom iskorištenju. Na Shemi 44 prikazan je mehanizam nastajanja *N*-Boc-aminoalkohola. Zanimljivo je primjetiti da se oba karbonilna kisikova atoma $(\text{Boc})_2\text{O}$ aktiviraju se jodom, što karbonilnu skupinu čini osjetljivijom na nukleofilni napad primarne amino skupine 3-amino-propan-1-ola.²⁰⁴ U drugom koraku dolazi do oslobađanja *tert*-butanola i ugljikovog(IV) oksida, što dovodi do nastajanja konačnog produkta, *N*-Boc-zaštićenog aminoalkohola **15**.



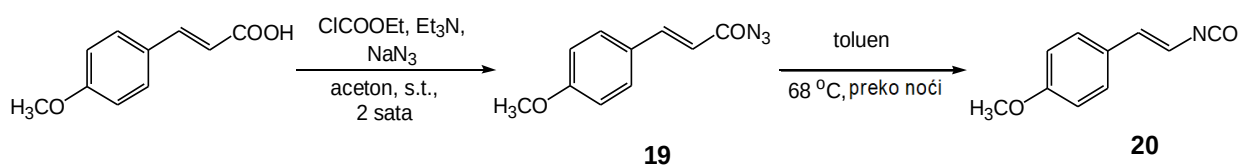
Shema 44. Mehanizam Boc zaštite s I_2

U drugom koraku sinteze, alkoholna skupina spoja **15** je Swern-ovom oksidacijom prevedena u aldehidnu skupinu.²⁰⁵ Reakcija se odvijala u atmosferi argona i u bezvodnom diklormetanu. Produkt **16** izoliran je u 95,8 %-tnom iskorištenju, te je izravno korišten u sljedećem stupnju reakcije. Swernova oksidacija (oksidacija alkohola pomoću aktiviranog DMSO-a)²⁰⁶ omogućuje selektivnu oksidaciju alkohola u aldehid bez upotrebe toksičnih reagensa poput piridinijeva klorokromata u blagim uvjetima. Reakcija dimetilsulfoksida i oksalil-klorida generira dimetilklorsulfonijev kation iz kojeg nukleofilnim napadom alkohola nastaje

dimetilalkoksisulfonijev kation. Nakon deptotoniranja dimetilalkoksisulfonijeva kationa nastali ilid se raspada na dimetil-sulfid i aldehid/keton, Shema 45. Swernova oksidacija koristi se za oksidaciju primarnih alkohola do aldehida i sekundarnih alkohola do ketona. Reakcija se provodi u bezvodnom otapalu jer se oksalil-klorid raspada u dodiru s vlagom i stvara otrovne i opasne plinove.²⁰⁷

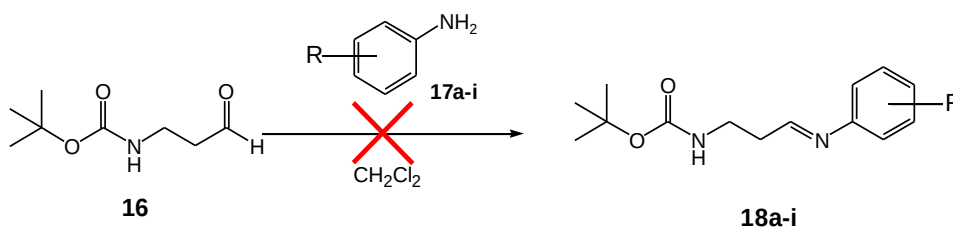


Shema 45. Mehanizam Swernove reakcije



Shema 46. Priprava izocijanata **20**

Sljedeći sinton, izocijanat **20** priređen je u dva sintetska koraka polazeći od 4-metoksicimetne kiseline, Shema 46. U prvom koraku, kiselina je djelovanjem smjese Et₃N/ClCOOEt uz naknadni dodatak vodene otopine NaN₃ prevedena u odgovarajući acil-azid **19**. Dobiveni produkt izoliran je ekstrakcijom te pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala heksan/etil-acetat 1:1. Acil-azid **19** izoliran je u 70%-tnom iskorištenju. Dobiven acil-azid **19** potom je podvrgnut Curtius-ovoj pregradnji u toluenu na 68 °C preko noći pri čemu nastaje izocijanat **20**. Curtius-ova pregradnja inače se koristi za pretvorbu acil-azida do izocijanata uz zagrijavanje.¹¹⁵



17a, 18a, R=H

17b, 18b, R=2-*i*Pr

17c, 18c, R=3-CH₃O

17d, 18d, R=4-Cl

17e, 18e, R=4-F

17f, 18f, R=4-(CH₂)₃CH₃

17g, 18g, R=2,6-(CH₃)₂

17h, 18h, R=3,5-(CH₃)₂

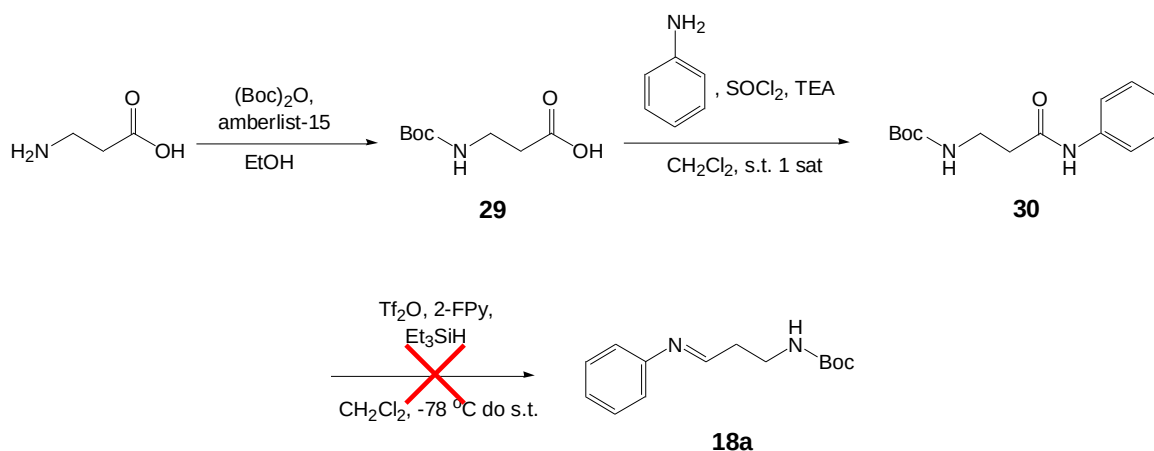
17i, 18i, R=3,5-(CH₃O)₂

Shema 47. Priprava imina **18a-i**

Polazeći od sintetiziranog *N*-Boc-aminopropanala **16** pokušana je priprava imina **18a** u reakciji s anilinom, Shema 47. Reakcija je provedena pri različitim reakcijskim uvjetima (0 °C, sobna temperatura i refluks), a kao otapala korišteni su diklormetan, etanol i toluen i uz aktivirana molekulska sita 4Å, međutim reakcija kondenzacije opetovano nije išla. Nadalje, reakcija kondenzacije aldehida **16** i anilina pokušana je dodatkom različitih promotora: amberlist 15, Al₂O₃ aktiviteta 0, celit i silikagel.²⁰⁸ Reakcije su provedene konvencionalnom i ultrazvučnom sintetskom metodom, međutim ciljani spoj **18a** nije izoliran. Također, isprobane su sinteze imina **18b-i** kondenzacijom aldehida **16** i različito supstituiranih anilina. Korišteni su: 2-izopropilanilin, 3-metoksianilin, 4-kloranilin, 4-fluoranilin, 4-butilanilin, 2,6-dimetilanilin, 3,5-dimetilanilin, 3,5-dimetoksianilin, a kao otapalo korišten je bezvodni diklormetan uz magnezijev sulfat kao sredstvo za vezanje vode, ali niti u ovim slučajevima imin nije detektiran i izoliran.

Nadalje, isprobana je i priprava imina **18a** redukcijom sekundarnog amida **30**, no reakcija nije polučila uspjeh, Shema 48. U prvom koraku, reakcijom β-alanina s (Boc)₂O i uz katalitičku količinu amberlista 15 (10 mol%) u etanolu pri 45 °C pripravljen je *N*-Boc-β-alanin **29**.²⁰⁹ Dobiveni produkt **29** izoliran je ekstrakcijom s diklormetanom i izoliran je u 88 %-tnom iskorištenju. U drugom koraku pripravljen je amid **30** iz *N*-Boc-β-alanina **29** u prisustvu trietilamina kao baze i tionil-klorida kao "coupling" reagensa i anilina u diklormetanu pri sobnoj temperaturi.²¹⁰ Produkt **30** izoliran je u 60 %-tnom iskorištenju. U sljedećem reakcijskom koraku, pokušana je redukcija sekundarnog amida **30** do imina **18a** u prisustvu

Tf₂O kao baze i uz 2-fluorpiridin i trietilsilan u diklormetanu.²¹¹ Na temelju dobivenog ¹H NMR spektra utvrđeno je da reakcija redukcije nije uspjela.



Shema 48. Priprava imina **18a** redukcijom sekundarnog amida

4.6. Enantioseparacija (±)-*trans*-β-laktamskih urea **12a-v** i (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i superkritične fluidne kromatografije

Odjeljivanje enantiomera (±)-*trans*-β-laktamskih urea **12a-v** i (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** ispitano je na različitim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, odnosno na *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamoil) amiloznoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj i imobiliziranoj), *tris*-(*S*)-α-metilbenzilkarbammat amiloznoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj), *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamoil) celuloznoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj i imobiliziranoj), *tris*-(4-metilbenzoil) celuloznoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj), *tris*-(4-metilfenilkarbamoil) celuloznoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj), *tris*-(3,5-diklorfenilkarbamoil) celuloznoj nepokretnoj fazi (imobiliziranoj), *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamoil) levanskoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj), *tris*-(4-metilfenilkarbamoil) levanskoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj) te *tris*-(1-naftilkarbamoil) levanskoj nepokretnoj fazi (adsorbiranoj) (Tablica 22). U daljnjem će tekstu navedene nepokretne faze biti redom označavane radnim nazivima: Chiralpak AD-3, Chiralpak IA, Chiralcel OD-3, Chiralpak IB, Chiralcel OJ, Chirallica PST-10, Chiralpak IC, Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9. Ispitivanja su provedena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i superkritičnom fluidnom kromatografijom.

Sintetizirane (±)-*trans*-β-laktamske uree **12a-v** imaju različite supstituente na N1-položaju ureido skupine, koja je preko N3-atoma vezana na C-3 položaj β-laktamskog prstena. Na N1-

položaj vezane su različite alkilne i arilne skupine, Slika 19. Kod svih urea je na C4-položaj β -laktamskog prstena vezana 4-metoksifenilna skupina, a na N-1 položaj vezana je 4-fluorfenilna skupina.

Za svaki su spoj navedene vrijednosti faktora zadržavanja k_1 i k_2 , separacijskog faktora (faktora odjeljivanja) α te razlučivanja R_s enantiomera postignutih na pojedinoj koloni uz određeni sastav pokretne faze. Pritom valja imati na umu kako i strukturne razlike između amilozne, celulozne i levanske nepokretne faze, ali i razlike između adsorbirane i imobilizirane amilozne i celulozne nepokretne faze mogu pridonijeti drugačijem kiralnom prepoznavanju enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**. Na temelju rezultata analize odredit će se koji selektor pokazuje najbolje kiralno prepoznavanje za većinu sintetiziranih β -laktamskih urea **12a-v**. Nadalje, pokušat će se objasniti mehanizam kiralnog prepoznavanja između sintetiziranih spojeva i selektora.

Faktor zadržavanja pojedinih enantiomera izračunan je jednadžbama:

$$k_1 = \frac{t_{R1} - t_0}{t_0} \quad (1.2)$$

$$k_2 = \frac{t_{R2} - t_0}{t_0} \quad (1.3)$$

Kod HPLC analiza vrijeme zadržavanja mobilne faze (t_0) određeno je kao vrijeme zadržavanja 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzena, tvari koja kroz kolonu prolazi bez ikakvog nekovalentnog međudjelovanja s kiralnom nepokretnom fazom. Kod SFC analiza, fronta otapala uzeta je kao vrijeme zadržavanja mobilne faze (t_0).

Relativno zadržavanje enantiomera izračunano je jednadžbom:

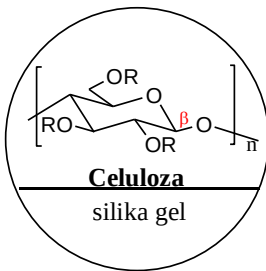
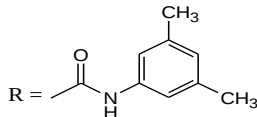
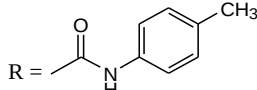
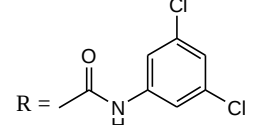
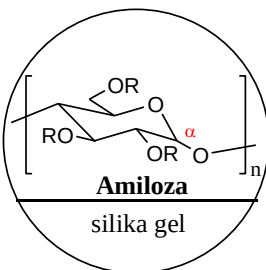
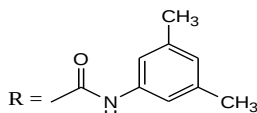
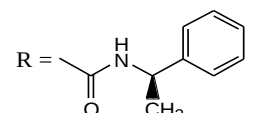
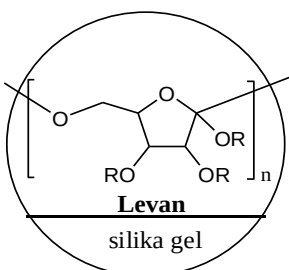
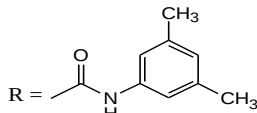
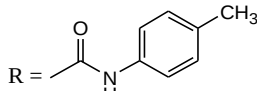
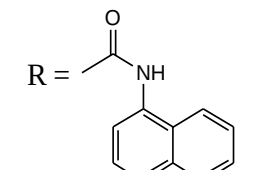
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.4)$$

Razlučivanje enantiomera izračunano je jednadžbom:

$$R_s = 1,18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1.5)$$

gdje je w_{b1} , odnosno w_{b2} širina pika prvog, odnosno drugog enantiomera na polovini visine pika.

Tablica 22. Prikaz adsorbiranih i imobiliziranih polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza utemeljenih na derivatima celuloze, amiloze i levana

Kiralni selektor	Struktura kiralnog selektora	Komercijalni naziv kolone		
		Adsorbiran KS	Imobiliziran KS	
Celuloza tris-(3,5-dimetilfenilkarbammat)	 Celuloza silika gel	R = 	Chiralcel OD-3	Chiralpak IB
Celuloza tris-(4-metilfenilkarbammat)		R = 	Chirallica PST-10	
Celuloza tris-(3,5-diklorfenilkarbammat)		R = 		Chiralpak IC
Amiloza tris-(3,5-dimetilfenilkarbammat)	 Amiloza silika gel	R = 	Chiralpak AD-3	Chiralpak IA
Amiloza tris-((S)-a-metilbenzilkarbammat)		R = 	Chiralpak AS-3	
Levan tris-(3,5-dimetilfenilkarbammat)	 Levan silika gel	R = 	Chirallica PST-7	
Levan tris-(4-metilfenilkarbammat)		R = 	Chirallica PST-8	
Levan tris-(1-naftilkarbammat)		R = 	Chirallica PST-9	

4.6.1. *Enantioseparacija ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti*

4.6.1.1. *Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti*

Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** ispitano je na deset odabranih polisaharidnih nepokretnih faza koje su utemeljene na derivatima amiloze, celuloze i levana (kolone Chiralpak AD-3, Chiralpak IA, Chiralcel OD-3, Chiralpak IB, Chiralcel OJ, Chirallica PST-10, Chiralpak IC, Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9). Ispitivanja su provedena uz metanol kao pokretnu fazu.

Rezultati odjeljivanja enantiomera β -laktamskih urea **12a-v** na različitim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama uz metanol kao pokretnu fazu prikazani su u Tablici P1.1 u *Prilogu 1*. Na temelju podataka prikazanih u *Prilogu 1* u Tablici P1.1, može se zaključiti da kiralno prepoznavanje enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** na ispitivanim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama ovisi o vrsti kiralnog selektora i vrsti supstituenta na N1-atomu ureido skupine. Enantioprepoznavanje ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea temelji se na stvaranju vodikovih veza, π - π interakcija i dipol-dipol interakcija. Osim toga, važna je i podudarnost veličine i oblika, odnosno prostorna sukladnost enantiomera sa selektorom kiralne nepokretne faze.

Usporedbom rezultata odjeljivanje enantiomera spojeva **12a**, **12b** i **12e** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, vidljivo je da se enantiomeri spoja **12e** s 4-fenilbutilnom skupinom dulje zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama, ali ostvaruju niži stupanj enantioprepoznavanja od spoja **12a** s alilnom skupinom i od spoja **12b** s heksilnom skupinom. Jedina iznimka su levanske kolone Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 na kojima spoj **12e** pokazuje viši stupanj enantioselektivnosti od spojeva **12a** i **12b**. Dulje zadržavanje enantiomera spoja **12e** na ispitivanim kolonama, uzrokuju π - π interakcije između fenilnog prstena i aromatske jezgre kiralnih selektora nepokretnih faza, koje dodatno stabiliziraju nastali diastereomerni kompleks, ali zbog same veličine 4-fenilbutilne skupine i nepravilnog smještanja u kiralnu šupljinu, slabije je enantioselektivno prepoznavanje enantiomera spoja **12e** sa selektorom amiloznih i celuloznih nepokretnih faza. Na levanskim nepokretnim fazama, odnosno na kolonama Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12a** i **12b**, dok je prepoznavanje enantiomera spoja **12e** zadovoljavajuće. Enantioprepoznavanje enantiomera spoja **12b** na koloni Chiralpak IC je vrlo slabo ($\alpha = 1,13$), odnosno enantiomeri se razdvajaju samo djelomično, dok se enantiomeri spojeva **12a** i **12e** uopće ne odjeljuju. Primjenom kolone Chiralpak AD-3 znatno je bolje

enantioprepoznavanje enantiomera spoja **12b** nego enantiomera spoja **12a**, a enantiomeri spoja **12e** ne odvajaju se na ovoj koloni. Primjenom kolona Chiralpak IC i Chiralpak AD-3 enantiomeri spoja **12b** postižu viši stupanj enantioselektivnosti i bolje razlučivanje od ostala dva spoja. U odnosu na spojeve **12b** i **12e**, na kolonama Chiralpak IA i Chirallica PST-7 je najbolja enantioselektivnost spoja **12a**. Nadalje, može se uočiti da spojevi **12a** i **12b** imaju slične α -vrijednosti na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10 i Chiralpak IB te na amiloznoj koloni Chiralpak AS-3. Njihova vrijednost je viša nego α -vrijednost za enantiomere spoja **12e**. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnu nepokretnu fazu ima pozitivan utjecaj na kiralno prepoznavanje sva tri spoja, što potvrđuju više α -vrijednosti postignute na koloni Chiralpak IB u odnosu na kolonu Chiralpak OD-3. Osim toga, imobilizacija ima pozitivan utjecaj i na razlučivanje enantiomera spoja **12a**. Imobilizacija amiloznog kiralnog selektora različito utječe na kiralna prepoznavanja enantiomera spojeva **12a**, **12b** i **12e**, odnosno imobilizacija ima pozitivan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spojeva **12a** i **12e**, dok negativan utjecaj ima na kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12b**. Razlučivanje enantiomera spoja **12e** na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10 i Chiralpak IB je veće nego razlučivanja enantiomera spoja **12a** i **12b**, dok je na koloni Chiralpak IC najbolje razlučivanje enantiomera spoja **12b**. Nadalje, razlučivanje enantiomera spoja **12e** na levanskim kolonama Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 te na amiloznoj koloni Chiralpak AS-3 je veće od razlučivanja enantiomera ostala dva spoja. Na koloni Chiralpak IA može se uočiti najbolje razlučivanje enantiomera spoja **12a** s alilnom skupinom. Enantiomeri sva tri spoja se samo djelomično odjeljuju na koloni Chirallica PST-7 sa selektorom *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamat) levana uz metanol kao pokretnu fazu, a najbolje razlučivanje enantiomera svih triju spojeva postignuto je na celuloznoj koloni Chirallica PST-10.

Ispitano je kako veličina cikloalkilnog prstena utječe na mehanizam kiralnog prepoznavanja na amiloznim, celuloznim i levanskim kolonama. Iz Tablice P1.1 u *Prilogu 1* je vidljivo da se enantiomeri spoja **12c** s ciklopentilnom skupinom kraće zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama u odnosu na enantiomere spoja **12d** s cikloheksilnom skupinom, neovisno o primijenjenim nepokretnim fazama. Enantiomeri spoja **12d** stvaraju veći broj interakcija zbog čega se dulje zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama. Takvim je interakcijama nastali diastereomerni kompleks između spoja **12d** i kiralnog selektora dobro stabiliziran, a rezultat toga je bolje enantioprepoznavanje sa selektorom većine ispitivanih nepokretnih faza. U slučaju derivata **12c** s ciklopentilnom skupinom, α -vrijednosti na kolonama Chiralcel OD-3 i Chiralpak AS-3 su više u usporedbi s α -vrijednostima za spoj **12d**, unatoč tome što se kraće zadržava u

kontakta s nepokretnom fazom. Na levanskim kolonama Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera obaju spojeva. Na trećoj levanskoj koloni Chirallica PST-7, enantiomeri obaju spojeva pokazuju zadovoljavajuće stupanjeve enantioprepoznavanja ($\alpha = 2,8$ za spoj **12c** i $\alpha = 3,0$ za spoj **12d**), ali ne i razlučivanje do osnovne linije. Primjenom kolone Chiralpak AS-3 enantiomeri spojeva **12c** i **12d** samo se djelomično odjeljuju, a vrijednosti separacijskog faktora i razlučivanja enantiomera spoja **12c** su više u odnosu na spoj **12d**, dok ostale kiralne nepokretne faze bolje odjeljuju enantiomere spoja **12d**. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da veličina cikloalkilnog prstena utječe na mehanizam kiralnog prepoznavanja na polisaharidnim nepokretnim fazama. Možemo zaključiti da u mehanizmu kiralnog prepoznavanja ovih spojeva veliki doprinos ima i smještanje diastereomernog kompleksa u kiralnu šupljinu nepokretne faze. Moguće je da se šesteročlani prsten spoja **12d** bolje prilagođava šupljinama kiralnih nepokretnih faza, nego sterički rigidan peteročlani prsten spoja **12c**. Uočava se da je razlučivanja enantiomera spojeva **12c** i **12d** najbolje na koloni Chirallica PST-10 s kiralnim selektorom celuloza *tris*-(4-metilfenilkarbamatom).

Usporedbom rezultata odjeljivanje enantiomera spojeva **12f** i **12h** na odabranim amiloznim, celuloznim i levanskim nepokretnim fazama, vidljivo je da se enantiomeri spoja **12h** duže zadržavaju u odnosu na enantiomere spoja **12f**. Spojevi **12f** i **12h** razlikuju se u vrsti aromatskog prstena koji je preko metilenske grupe vezan za N1-atom ureido skupine. Spoj **12f** sadrži aromatski heterociklički furanski prsten, a spoj **12h** benzenski prsten. Uočava se da je kiralno prepoznavanje spoja **12h** na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10 i Chiralpak IB nešto lošije u odnosu na spoj **12f**. Međutim, na amiloznim kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA enantiomeri spoja **12h** pokazuju bolju enantioselektivnost od enantiomera spoja **12f**. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnu nepokretnu fazu ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera spojeva **12f** i **12h**. Na koloni Chiralpak IB postiže se kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera, ali je ono lošije u odnosu na kolonu Chiralcel OD-3. Dok imobilizacija amilozne nepokretne faze, odnosno promjena njene više strukture, pogoduje enantioprepoznavanju enantiomera spojeva **12f** i **12h**, ali ne i razlučivanju enantiomera obaju spojeva. Na levanskim kolonama Chirallica PST-7 i Chirallica PST-8 te na celuloznoj koloni Chiralpak IC izostaje enantioprepoznavanje enantiomera obaju spojeva. Razlučivanje enantiomera spoja **12h** na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10 i Chiralpak IB te na amiloznoj koloni Chiralpak AS-3 je veće nego razlučivanje enantiomera spoja **12f**. Na preostalim amiloznim kiralnim nepokretnim fazama, odnosno kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA, dolazi do boljeg razlučivanja enantiomera spoja **12f**. Na

celuloznoj koloni Chirallica PST-10 postignuto je najbolje razlučivanje enantiomera spojeva **12f** i **12h**, dok je najbolje kiralno prepoznavanje postignuto na levanskoj koloni Chirallica PST-7. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da mehanizam kiralnog prepoznavanja enantiomera spojeva **12f** i **12h** ovisi o vrsti prstena vezanog preko metilenske skupine na N1-atom ureido skupine β -laktamskog prstena i vrsti kiralne nepokretne faze.

Usporedbom rezultata odjeljivanje enantiomera spojeva **12g** i **12v** na odabranim polisaharidnim nepokretnim fazama, vidljivo je da se na amiloznim Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA nepokretnim fazama enantiomeri spoja **12g** s fenilnom skupinom dulje zadržavaju u odnosu na enantiomere spoja **12v** s naftilnom skupinom, dok se na preostalim nepokretnim fazama dulje zadržavaju enantiomeri spoja **12v**. Na kolonama Chiralpak IC i Chiralpak AS-3 izostaje odjeljivanje enantiomera spoja **12v**, dok na koloni Chirallica PST-9 izostaje odjeljivanje enantiomera obaju spojeva. Uočava se da je enantioselektivnost spoja **12g** na kolonama Chiralpak IA i Chirallica PST-8 znatno lošija u odnosu na enantioselektivnost spoja **12v**. Međutim, na preostalim kolonama enantiomeri spoja **12g** pokazuju bolju enantioselektivnost od enantiomera spoja **12v**. Iz prikazanih podataka vidljivo je da su enantioselektivnost i razlučivanje enantiomera spoja **12v**, veći na koloni Chiralpak IB nego na njenoj adsorbiranoj inačici, koloni Chiralcel OD-3. Dakle, imobilizacija celulozne kiralne nepokretne faze pogoduje razdvajanju enantiomera spoja **12v**, a u slučaju spoja **12g** imobilizacija pogoduje razdavanju enantiomera, ali ne i kiralnom prepoznavanju enantiomera. Za spoj **12v**, enantioselektivnost i razlučivanje na koloni Chiralpak IA bolji su u odnosu na kolonu Chiralpak AD-3 što upućuje da utjecaj imobilizacije kiralnog selektora na njegovu višu strukturu pogoduje razdvajanju enantiomera spoja **12v**. Međutim, za spoj **12g**, enantioselektivnost i razlučivanje na koloni Chiralpak AD-3 bolji su u odnosu na njenu imobiliziranu inačicu, kolonu Chiralpak IA, što pokazuje da imobilizacija kiralnog selektora ne pogoduje razdvajanju enantiomera spoja **12g**. Najbolje kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12g** i **12v** može se uočiti na koloni Chirallica PST-7. Razlučivanje enantiomera spoja **12g** na celuloznim kolonama te na amiloznoj koloni Chiralpak AS-3 je veće nego razlučivanja enantiomera spoja **12v**. Na preostalim amiloznim i levanskim kiralnim nepokretnim fazama dolazi do boljeg razlučivanja enantiomera spoja **12v**. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da mehanizam kiralnog prepoznavanja enantiomera spojeva **12g** i **12v** ovisi o veličini aromatskog sustava vezanog na ureido skupinu.

Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih i drugoizlazećih enantiomera spojeva **12h**, **12i** i **12j** uočava se da se prvoizlazeći i drugoizlazeći enantiomeri spoja **12j** s benzoilnom skupinom dulje zadržavaju u kontaktu s amiloznim i celuloznim nepokretnim fazama u odnosu na enantiomere ostala dva spoja, odnosno imaju veće faktore zadržavanja k_1 i k_2 . Dulje

zadržavanje enantiomera spoja **12j** posebno je izraženo na koloni Chiralpak AD-3. Dulje zadržavanje enantiomera spoja **12j** uzrokuju dipol-dipol interakcije i vodikove veze. Na levanskim kolonama enantiomeri spoja **12h** s benzilnom skupinom dulje se zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama, a jedina iznimka je kolona Chirallica PST-7 na kojoj je se dulje zadržavaju enantiomeri spoja **12j**. Usporedbom separacijskih faktora enantiomera svih triju spojeva, primjenom celuloznih i amiloznih nepokretnih faza, uočava se da spoj **12i** s (S)-(-)- α -metilbenzilnom skupinom, pokazuje viši stupanj enantioselektivnosti nego ostala dva spoja, a iznimka su kolone Chiralpak IC i Chiralpak AS-3 na kojima je enantioselektivnost spoja **12j** znatno bolja u odnosu na enantioselektivnost spojeva **12h** i **12i**. Na koloni Chiralpak IC izostaje enantiprepoznavanje enantiomera spoja **12h**, dok na kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA izostaje prepoznavanje enantiomera spoja **12j**. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnoj nepokretnoj fazi ima negativan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera svih triju spojeva, što potvrđuju više vrijednosti α i R_s postignute na koloni Chiralcel OD-3 u odnosu na imobiliziranu inačicu, kolonu Chiralpak IB. Promjena više strukture uslijed imobilizacije amiloznog kiralnog selektora pogoduje samo kiralnom prepoznavanju enantiomera spojeva **12h** i **12i**, dok u slučaju spoja **12i** imobilizacija selektora pogoduje i razdvajanju enantiomera. Primjenom levanskih kolona Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 odjeljivanje enantiomera spoja **12j** je zadovoljavajuće ($\alpha = 1,38$), dok kiralno prepoznavanje kao i razlučivanje enantiomera spojeva **12h** i **12i** izostaju. Nadalje, može se uočiti da su spojevi **12h** i **12i** pokazali izuzetno visoki stupanj enantiprepoznavanja s kiralnim selektorom levanske kolone Chirallica PST-7. Njihova vrijednost je viša nego α -vrijednost za enantiomere spoja **12j**. Isto tako, može se uočiti bolje razlučivanje enantiomera spojeva **12h** i **12i** u odnosu na spoj **12j**. Na amiloznim kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA, kao i na celuloznoj koloni Chirallica PST-10, razlučivanje enantiomera spoja **12i** je bolje u odnosu na ostala dva spoja, dok spoj **12h** postiže najdjelotovnije razlučivanje enantiomera na koloni Chirallica PST-7. No, na svim preostalim kolonama najbolje se razdvajaju enantiomeri spoja **12j**. Među spojevima **12h**, **12i** i **12j**, celulozna kolona Chirallica PST-10 pokazala je najviše uspjeha u razdvajanju enantiomera spojeva **12h** i **12i**, dok je kolona Chiralpak AS-3 pokazala najviše uspjeha u razdvajanju enantiomera spoja **12j**.

Usporedbom razlučivanja enantiomera spojeva **12k-m** koji se međusobno razlikuju samo po položaju Cl-atoma na fenilnom prstenu, vidljivo je da enantiomeri spoja **12l** s Cl-atomom u *meta*-položaju postižu bolje razlučivanje na kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10, Chiralpak IB, Chirallica PST-7 i Chirallica PST-8 u odnosu na *ortho*- i *para*-analoge. Na amiloznim nepokretnim fazama postignuto je nešto bolje kiralno prepoznavanje spoja **12k** u

odnosu na *meta*- i *para*-analoge. U slučaju analiziranih spojeva **12k-m** vidljivo je da je imobilizirana 3,5-dimetilfenilkarbamoid celulozna nepokretna faza (Chiralpak IB) pogodnija od adsorbirane, odnosno kolone Chiralcel OD-3 što pokazuje da utjecaj imobilizacije na njegovu višu strukturu pogoduje razlučivanju enantiomera spojeva **12k-m**. Na kolonama Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB postignuto je nešto bolje kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12l** u odnosu na *ortho*- i *para*-analoge. Iz prikazanih podataka vidljivo je da su enantioselektivnost i razlučivanje enantiomera spojeva **12l** i **12m** slabiji na koloni Chiralpak IC nego na ostalim celuloznim nepokretnim fazama. Nadalje, enantioselektivnost i razlučivanje na koloni Chiralpak AD-3 bolja su u odnosu na kolonu Chiralpak IA. Stoga se može zaključiti da promjena više strukture amiloznog kiralnog selektora uslijed njegove imobilizacije ne pogoduje kiralnom prepoznavanju spojeva **12k-m**. Na koloni Chiralpak AD-3 najbolje je kiralno prepoznavanje enantiomera *para*-analoge **12m**, dok je na njoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IA, najbolje kiralno prepoznavanje *ortho*-analoge **12k**.

Zamjena celulozne jedinice s levanskom, odnosno zamjena kolone Chiralcel OD-3 s kolonom Chirallica PST-7, nije poboljšala odjeljivanje enantiomera spojeva **12k-m**. Za spojeve **12k-m**, enantioselektivnost i razlučivanje na koloni Chirallica PST-7 bolji su u odnosu na kolonu Chirallica PST-8. Primjenom kolone Chirallica PST-9 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera svih triju spojeva. Rezultati odjeljivanja spojeva **12k-m** na amiloznim, celuloznim i levanskim nepokretnim fazama, ukazuju da u mehanizmu kiralnog prepoznavanja spojeva osim nekovalentnih interakcija, značajan doprinos ima i smještanje diastereomernog kompleksa u kiralnu šupljinu selektora, odnosno prostorna sukladnost enantiomera s kiralnom nepokretnom fazom.

Osim položaja Cl-atoma na benzenskom prstenu, ispitan je i utjecaj njegovog elektron odvlačećeg djelovanja, kao i djelovanje elektron donirajućih skupina, odnosno metoksi i *tert*-butilne skupine, u *para*-položaju benzenskog prstena koji je vezan na N1-atom ureido skupine na kiralno prepoznavanje spojeva **12m**, **12n** i **12o** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama uz metanol kao pokretnu fazu. Usporedbom faktora zadržavanja ovih spojeva, vidljivo je da se na koloni Chirallica PST-7 najdulje zadržavaju enantiomeri spoja **12m** s Cl-atomom u *para*-položaju, dok se na amiloznim kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak AS-3 najdulje zadržavanje enantiomeri spoja **12o** s *tert*-butilnom skupinom. Na preostalim kolonama najdulje se zadržavaju enantiomeri spoja **12n** s metoksi skupinom u *para*-položaju. No, uočava se da je enantioselektivnost spoja **12n** na većini ispitivanih nepokretnih faza lošija u odnosu na enantioselektivnost dobivenu za spojeve **12m** i **12o**. S druge strane, spojevi **12m** i **12o** imaju istu enantioselektivnost na celuloznoj koloni Chiralcel OD-3 ($\alpha = 2,27$) i na

amiloznoj koloni Chiralpak AS-3 ($\alpha = 1,45$). Na koloni Chiralpak AS-3 izostaje enantioselektivno prepoznavanje enantiomera spoja **12n**, dok na koloni Chirallica PST-9 izostaje prepoznavanje enantiomera spoja **12m**. Nadalje, uočava se da je kiralno prepoznavanje spoja **12m** na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10 i Chiralpak IB te na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3 nešto bolje u odnosu na spoj **12o**. Međutim, na levanskim kolonama Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 te na dvije amilozne kolone Chiralpak AS-3 i Chiralpak IA, enantiomeri spoja **12o** pokazuju bolju enantioselektivnost od enantiomera spoja **12m**. Osim toga, od svih ispitivanih kolona, upravo na koloni Chirallica PST-7 postignuto je najbolje kiralno prepoznavanje enantiomera svih triju spojeva. Imobilizacija amiloznog kiralnog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera svih triju spojeva, ali pogoduje razlučivanju enantiomera spoja **12o**. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora ima negativan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spojeva **12n** i **12o**, dok u slučaju spoja **12m** imobilizacija doprinosi razlučivanju enantiomera, ali ne i kiralnom prepoznavanje. Kolona Chiralpak AS-3 pokazala se lošim izborom jer se enantiomeri spojeva **12m** i **12o** razdvajaju samo djelomično, dok se enantiomeri spoja **12n** uopće ne odjeljuju. Također su loši izbor i kolone Chiralpak IA, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9. Na kolonama Chiralpak IA i Chirallica PST-8 enantiomeri svih triju spojeva tek su djelomično razdvojeni. Enantiomeri spojeva **12m** i **12o** se samo djelomično odjeljuju na koloni Chirallica PST-9, dok se enantiomeri spoja **12n** uopće ne odjeljuju na ovoj koloni. Na celuloznim kiralnim nepokretnim fazama uočava se izvrsno razlučivanje enantiomera svih triju spojeva, a najbolje razlučivanje postižu na koloni Chirallica PST-10 ($R_s \geq 8,5$). Razlučivanje enantiomera spoja **12o** na koloni Chirallica PST-7 veće je od razlučivanje enantiomera spojeva **12m** i **12n**, dok na koloni Chiralpak AD-3 najbolje razlučivanje enantiomera postiže spoj **12n**. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako kiralno prepoznavanje ovisi o elektronskim svojstvima supstituenta u *para*-položaju benzenskog prstena. Enantiomeri spoja **12n** s metoksi skupinom dulje se zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom, ali ostvaruju niži stupanj enantioprepoznavanja u odnosu na spojeve **12m** i **12o**, osim na levanskim kolonama Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9 na kojima spoj **12m** pokazuje najniži stupanj enantioselektivnosti u odnosu na ostala dva spoja.

Usporedbom rezultata ispitivanja odjeljivanja enantiomera spoja **12l** s Cl-atomom u *meta*-položaju i spoja **12p** s Cl-atom u *meta*-položaju i metilnom skupinu u *para*-položaju benzenskog prstena na odabranim amiloznim, celuloznim i levanskim nepokretnim fazama, može se uočiti da je enantioselektivnost spoja **12p** bolja u odnosu na enantioselektivnost spoja **12l**. Na koloni Chirallica PST-9 izostaje kiralno prepoznavanje, ali i razlučivanje enantiomera

spoja **12l**. Jedina iznimka su celulozna kolona Chiralpak IC i amilozna kolona Chiralpak AD-3 na kojima je postignuto bolje kiralno prepoznavanje spoja **12l**. Imobilizacija amiloznog kiralnog selektora na kiralnoj nepokretnoj fazi ima pozitivan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spoja **12p**, što potvrđuju više vrijednosti α i R_s postignute na koloni Chiralpak IA u odnosu na kolonu Chiralpak AD. Međutim, imobilizacija negativno utječe na kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12l**. Na koloni Chiralpak IB su kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera obaju spojeva lošiji od onih postignutih na koloni Chiralcel OD-3. Stoga se može zaključiti da promjena više strukture celuloznog kiralnog selektora uslijed njegove imobilizacije ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera spojeva **12l** i **12p**. Razlučivanje enantiomera spoja **12l** na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3 i levanskoj koloni Chirallica PST-7 je veće nego razlučivanje enantiomera spoja **12p**. Na preostalim kolonama bolje se odjeljuju enantiomeri spoja **12p** s Cl-atomom i metilnom skupinom na fenilnom prstenu. Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti da dodatna elektron-donirajuća metilna skupina u *para*-položaju fenilnog prstena poboljšava sposobnost kiralnog prepoznavanja testiranih kiralnih nepokretnih faza, a iznimka su kolone Chiralpak AD-3 i Chiralpak IC.

Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih i drugoizlazećih enantiomera spojeva **12r** i **12s**, na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, uočava se dulje zadržavanje enantiomera spoja **12r** s dvije metilne skupine u *meta*-položaju fenilnog prstena, neovisno o vrsti primjenjene kiralne nepokretne faze. Na koloni Chiralpak AD-3 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera obaju spojeva. Nadalje, rezultati pokazuju da i na kolonama Chiralpak AS-3 i Chirallica PST-8 izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12s** s dvije trifluormetilne skupine u *meta*-položaju benzenskog prstena. Primjenom celuloznih kolona Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB te amilozne kolone Chiralpak IA znatno je bolje enantioprepoznavanje enantiomera spoja **12s** nego spoja **12r**. Međutim, uočava se da je na preostalim nepokretnim fazama enantioselektivnost spoja **12s** znatno lošija u odnosu na enantioselektivnost spoja **12r**. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnoj nepokretnoj fazi ima negativan utjecaj, kako na kiralno prepoznavanje tako i na razlučivanje enantiomera spojeva **12r** i **12s**, što potvrđuju niže vrijednosti separacijskog faktora i razlučivanja enantiomera postignute na koloni Chiralpak IB. Suprotno tome, imobilizacija amiloznog kiralnog selektora ima pozitivan učinak na odjeljivanje enantiomera obaju spojeva. Usporedbom razlučivanja enantiomera spojeva **12r** i **12s**, uočava se da je kod spoja **12s** razdvajanje enantiomera na promatranim polisaharidnim nepokretnim fazama lošije nego razdvajanje enantiomera spoja **12r**. Jedina je iznimka kolona Chiralpak IA na kojoj je postignuto odlično kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spoja **12s**. Razlučivanje

enantiomera spojeva **12r** i **12s** na celuloznoj koloni Chirallica PST-10 ($R_s = 11,3$ spoj **12r** i $R_s = 7,32$) je zadovoljavajuće visoko. Najbolje kiralno prepoznavanje spoja **12r** može se uočiti na koloni Chirallica PST-7, a spoja **12s** na koloni Chiralcel OD-3. Iz dobivenih podataka vidljivo je kako kiralno prepoznavanje spojeva **12r** i **12s** na odabranim kiralnim nepokretnim fazama ovisi o elektronskim svojstvima supstituenta (elektron-donirajućim svojstvima metilne skupine ili elektron-odvlačećim svojstvima trifluormetilne skupine) u 3,5-položaju benzenskog prstena.

Nadalje, ispitan je utjecaj položaja dviju metilnih skupina na arilnom dijelu molekule na mehanizam kiralnog prepoznavanja spojeva **12r** i **12t** na odabranim amiloznim, celuloznim i levanskim nepokretnim fazama. Iz Tablice P1.1 u *Prilogu 1* vidljivo je da se enantiomeri spoja **12r** duže zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom nego enantiomeri spoja **12t**. Osim toga, primjećuje se rast enantioselektivnosti i razlučivanja promjenom položaja metilnih skupina u strukturi β -laktamskih urea: enantiomeri spoja **12r** s metilnim skupinama u *meta*-položaju se odjeljuju bolje nego enantiomeri spoja **12t** s metilnim skupinama u *ortho*-položaju na celuloznim i levanskim nepokretnim fazama. Vrijednosti α i R_s za enantiomere spoja **12t** su niže od spoja **12r**, što se može pripisati steričkim smetnjama koje uzrokuju metilne-skupine u *ortho*-položaju. Njihov položaj ometa ulazak enantiomera u kiralnu šupljinu celuloznih i levanskih nepokretnih faza. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnoj nepokretnoj fazi ima pozitivan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spoja **12t**, što potvrđuju veće vrijednosti α i R_s na koloni Chiralpak IB u odnosu na kolonu Chiralcel OD-3. Enantiomeri spoja **12t** ne pokazuju kiralno prepoznavanje s kiralnim selektorom kolone Chiralpak IC, a enantioprepoznavanje spoja **12r** sa selektorom navedene kolone, kao i razlučivanje enantiomera su zadovoljavajući. Enantioselektivnost i razlučivanje za spoj **12r** bolji su na adsorbiranom selektoru, odnosno na koloni Chiralcel OD-3 nego na koloni Chiralpak IB, što pokazuje da imobilizacija kiralnog selektora i njen utjecaj na višu strukturu ne pogoduju razdvajanju enantiomera spoja **12r**. Na koloni Chirallica PST-10 postignuto je najbolje kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spojeva **12r** i **12t**. Na levanskim nepokretnim fazama, odnosno na kolonama Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9, izostaje kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spoja **12t**, a enantiomeri spoja **12r** ostvaruju zadovoljavajuće enantioprepoznavanje. Međutim, amilozne kolone pokazale su se djelotvornijim u kiralnom prepoznavanju enantiomera spoja **12t** u odnosu na njegov *meta*-analog **12r**. Na koloni Chiralpak AD-3 enantiomeri spoja **12r** se uopće ne odjeljuju, dok na njenoj imobiliziranoj inačici koloni Chiralpak IA enantiomeri spoja **12t** imaju puno bolje kiralno prepoznavanje u odnosu na spoj **12r**. Kako je terciarna struktura amiloze drugačija od celulozne, za očekivati je da će i mehanizam kiralnog prepoznavanja biti različit. Pritom viša

struktura amilozne uzvojnice u ovom slučaju više pogoduje ulasku enantiomera spoja **12t** u odnosu na manje sterički zahtjevan spoj **12r**. Međutim, na koloni Chiralpak AS-3 postignuto je bolje kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12t** u odnosu na spoj **12r**, ali je razdvajanje enantiomera spoja **12r** djelotvornije od razdvajanja enantiomera spoja **12t**. Dobiveni rezultati ukazuju da kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12r** i **12t** sa selektorima ispitivanih amiloznih, celuloznih i levanskih nepokretnih faza ovisi o položaju metilnih skupina na fenilnom prstenu, ali isto tako i o supramolekularnoj strukturi nepokretne faze.

Ispitivanjem utjecaja veličine alkilnog lanca na mehanizam kiralnog prepoznavanja spojeva **12t** i **12u** na amiloznim, celuloznim i levanskim nepokretnim fazama, uočava se da se enantiomeri spoja **12t** s dvije metilne skupine u *ortho*-položaju benzenskog prstena dulje zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama nego enantiomeri spoja **12u** s dvije izopropilne skupine u *ortho*-položaju benzenskog prstena. Na celuloznoj koloni Chiralpak IC te na svim levanskim kolonama u potpunosti izostaje enantioprepoznavanje obaju spojeva. Na ostalim ispitivanim kolonama, kiralno prepoznavanje i razlučivanje spoja **12t** je bolje nego što je slučaj kod spoja **12u**. U odjeljivanju enantiomera spojeva **12t** i **12u** prevladavaju sterički efekti pri smještanju enantiomera u kiralne šupljine celuloznih i amiloznih nepokretnih faza, pri čemu su metilne skupine spoja **12t** manje sterički zahtjevne. Izopropilna skupina sterički otežava ulazak enantiomera spoja **12u** u kiralnu šupljinu, a isto tako navedena skupina ometa i nastajanje vodikovih veza između NH-protona ureido skupine i C=O skupine kiralnog selektora.

Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-c** na amiloznim, celuloznim i levanskim kiralnim nepokretnim fazama primjenom metanola kao pokretne faze, uočava se da se enantiomeri najdulje zadržavaju na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3, Slika P1.1 u *Prilogu 1*. Uz izuzetak enantiomera spojeva **12j** i **12o** koji se najdulje zadržava u kontaktu s nepokretnom fazom kolone Chiralpak IA te enantiomera spoja **12s** koji se najdulje zadržava na koloni Chirallica PST-8. Enantiomeri većine analiziranih spojeva najkraće se zadržavaju na levanskoj koloni Chirallica PST-7. Zamjena amilozne jedinice s celuloznom, u slučaju adsobiranog i imobiliziranog selektora, skraćuje vrijeme zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a-v**. Usporedbom faktora zadržavanja na četiri celulozne kolone, vidljivo je da se prvoizlazeći enantiomeri kod 12 ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12e-h**, i **12j-r** dulje zadržavaju na koloni Chirallica PST-10 nego na kolonama Chiralcel OD-3, Chiralpak IB i Chiralpak IC.

Usporedbom separacijskih faktora ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, vidljivo je da enantiomeri spoja **12c** s ciklopentilnom skupinom postižu iznimno visoki stupanj enantioprepoznavanja ($\alpha = 14,0$) na

koloni Chiralcel OD-3, Slika P1.2 u *Prilogu 1*. Nadalje, uočava se da se najlošija enantioprepoznavanja ostvaruju primjenom levanskih kolona. Na koloni Chirallica PST-9 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje kod 15 spojeva, a na koloni Chirallica PST-8 izostaje enantioprepoznavanje 9 spojeva. Od svih ispitivanih celuloznih kolona (Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10, Chiralpak IB i Chiralpak IC), kolona Chiralpak IC pokazala se najlošijom jer kiralno prepoznavanje izostaje kod 7 spojeva, dok se enantiomeri spojeva **12b**, **12c**, **12i** i **12s** samo djelomično odvajaju.

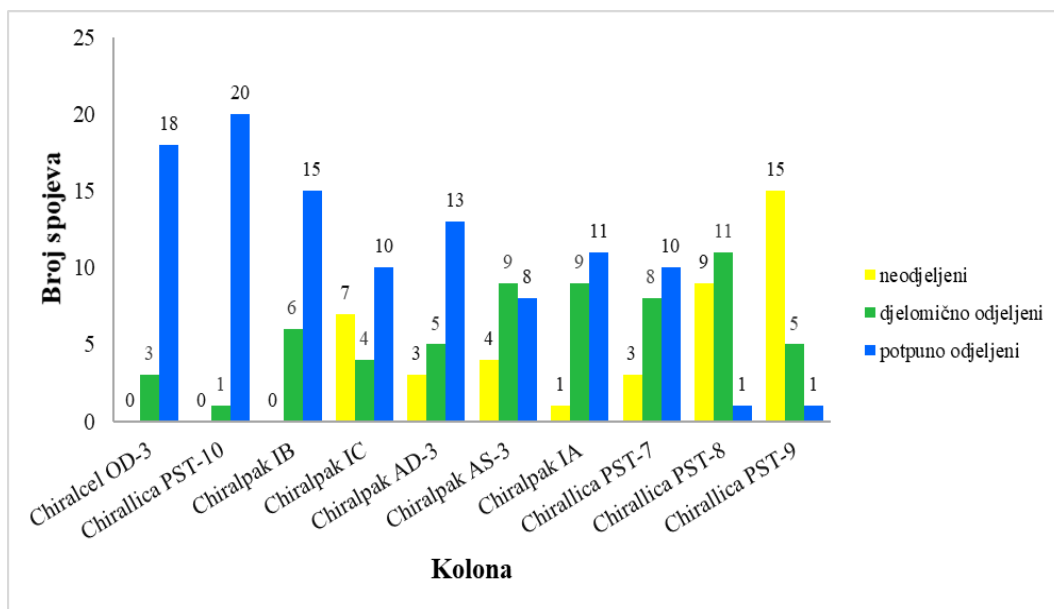
Usporedba razlučivanja enantiomera, kao mjere djelotvornosti odvajanja enantiomera, ističu se vrijednosti razlučivanja enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea na koloni Chirallica PST-10 sa selektorom *tris*-(4-metilfenilkarbamatom) celuloze, a izuzetak je spoj **12j** koji najbolje razlučivanje postiže na koloni Chiralpak IC sa selektorom *tris*-(3,5-diklorfenilkarbamatom) celuloze, Slika P1.3. u *Prilogu 1*. Na celuloznoj nepokretnoj fazi koja je preinačena s *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamatom), odnosno na koloni Chiralcel OD-3, uočava se potpuno odvajanje (do osnovne linije) enantiomera kod 18 ispitivanih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea. Nadalje, uočava se da je razlučivanje enantiomera učinkovitije na adsorbiranoj nego na imobiliziranoj fazi, koloni Chiralpak IB.

Promjena više strukture celulozne nepokretne faze uslijed imobilizacije kiralnog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea. Zamjena celulozne jedinice na kiralnoj nepokretnoj fazi s amiloznom jedinicom rezultira manjim stupnjem enantioprepoznavanja svih spojeva sa selektorom kolone Chiralpak AD-3, ali kod 13 spojeva (62 %) enantiomeri su odvojeni do osnovne linije. Uočava se da je za većinu spojeva veća R_s -vrijednost na koloni Chiralcel OD-3 nego na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3. Nadalje, na *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamatom) amiloznoj kiralnoj nepokretnoj fazi odjeljivanja enantiomera kod 11 spojeva je bilo učinkovitije na imobiliziranoj (kolona Chiralpak IA) nego na adsorbiranoj fazi (kolona Chiralpak AD-3). Enantiomeri spojeva **12e**, **12j**, **12o** i **12r** postižu bolje razlučivanje na koloni Chiralpak AS-3 nego na kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA.

Očito je da zamjena celulozne jedinice s amiloznom, odnosno levanskom manje pogoduje razdvajanju enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**. Od svih ispitanih kolona, kolona Chirallica PST-9, pokazala se najlošijom u odjeljivanju enantiomera spoja **12a-v**. Na koloni Chirallica PST-9 izostaje enantiomerno prepoznavanje kod 15 analiziranih β -laktamskih urea.

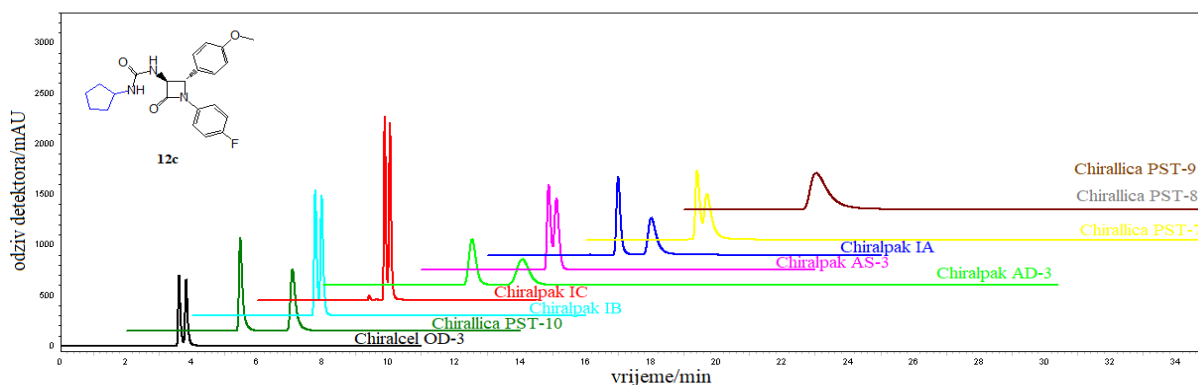
U slučaju analiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** primjenom HPLC-a uz metanol kao pokretnu fazu, vidljivo je da je razlučivanje enantiomera znatno bolje na celuloznim nepokretnim fazama od razlučivanja postignutog na amiloznim ili levanskim nepokretnim fazama, uz izuzetak celulozne Chiralpak IC nepokretne faze, Slika 36. Iz prikaza je vidljivo da

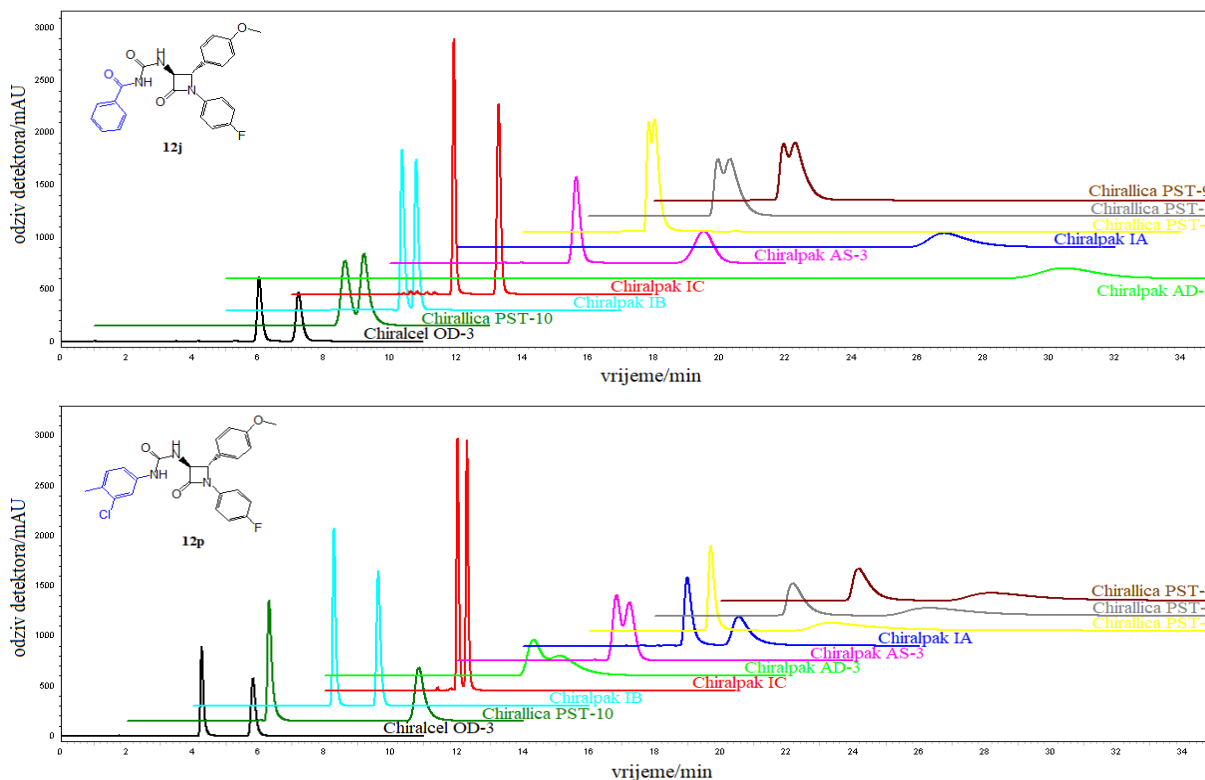
je najbolje razlučivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** postignuto na koloni Chirallica PST-10. Na ovoj koloni se do osnovne linije odjeljuju enantiomeri 20 od ukupno 21 analizirane ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree. Enantiomeri spoja **12j** s benzoilnom skupinom se tek djelomično razdvajaju na ovoj koloni.



Slika 36. Ukupni broj neodjeljenih, djelomično odjeljenih i potpuno odjeljenih (do osnovne linije) ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na deset polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza utemeljenih na derivatima amiloze, celuloze i levana

Na Slici 37 prikazano je odjeljivanje enantiomera spojeva **12c**, **12j** i **12p** na odabranim amiloznim, celuloznim i levanskim kolonama primjenom HPLC-a uz metanol kao pokretnu fazu.





Slika 37. Odjeljivanje enantiomera spojeva **12c**, **12j** i **12p** na kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10, Chiralpak IB, Chiralpak IC, Chiralpak AD-3, Chiralpak AS-3, Chiralpak IA, Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9. Kromatografski uvjeti: pokretna faza metanol, protok 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 30 °C, UV detekcija 254 nm

4.6.1.2. Utjecaj temperature na enantioseparaciju ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12b-f**, **12h-j** i **12m-r** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Na temelju provedenih enantioselektivnih analiza ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** na deset polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza, najdjelotvornije razlučivanje enantiomera postignuto je na celuloznoj koloni Chirallica PST-10. U nastavku istraživanja, na ovoj je koloni ispitan utjecaj temperature na odjeljivanje enantiomera spojeva **12b-f**, **12h-j** i **12m-r** uz metanol kao pokretnu fazu. Utjecaj temperature ispitan je u intervalu od 5 °C do 45 °C. Rezultati su prikazani u Tablici P1.2 u *Prilogu 1*. Iz Tablice P1.2 je vidljivo da se povećanjem temperature kolone (od 5 do 45 °C) skraćuje vrijeme zadržavanja prvoizlazećih i drugoizlazećih enantiomera na koloni Chirallica PST-10, odnosno smanjuju se vrijednosti faktora zadržavanja enantiomera. Također, uočava se da se povećanjem temperature kolone smanjuju vrijednosti separacijskih faktora enantiomera spojeva **12c**, **12e**, **12i**, **12o** i **12p**, a da kod ostalih ispitivanih spojeva nema pravilnosti. Razlučivanje enantiomera R_S lagano raste dosežući maksimum pri temperaturi od 20 °C za spojeve **12b**, **12c**, **12e**, **12i** ili 30 °C za spojeve **12d**, **12f**, **12h**, **12m-r**, a izuzetak je spoj

12j s benzoilnom skupinom koji svoj maksimum postiže na 15 °C, Slika P1.4 u *Prilogu 1*. Nakon postizanja maksimuma R_s -vrijednost pada.

Utjecaj temperature praćen je pomoću van't Hoffovog dijagrama, ovisnost faktora zadržavanja enantiomera $\ln k$ o $1/T \times 10^3$ i separacijskog faktora $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za spojeve **12b-f**, **12h-j**, **12m-r**, Slika P1.5 i Slika P1.6 u *Prilogu 1*.

Termodinamički parametri (ΔH_1° , ΔH_2° , ΔS_1° , ΔS_2° , $\Delta \Delta H^\circ$ i $\Delta \Delta S^\circ$) izračunati su prema van't Hoffovim jednadžbama (1.6 i 1.7)^{212,213}

$$\ln k_i = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (1.6)$$

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta \Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta \Delta S^\circ}{R} \quad (1.7)$$

gdje ΔH° i ΔS° predstavljaju entalpiju i entropiju prijenosa otopljenе tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, T je apsolutna temperatura, R je plinska konstanta ($R = 8,314472 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). $\Delta \Delta H^\circ$ je razlika slobodne entalpije drugoizlazećeg i prvoizlazećeg enantiomera ($\Delta \Delta H^\circ = \Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$), a $\Delta \Delta S^\circ$ je razlika slobodne entropije između dva enantiomera ($\Delta \Delta S^\circ = \Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$). Ako je ovisnost $\ln k$ vs. $1/T \times 10^3$ linearna, onda se iz nagiba pravca može odrediti entalpija prijenosa tvari iz pokretne na nepokretnu fazu ($-\Delta H^\circ/R$) i entropija prijenosa iz vrijednosti odsječka ($\Delta S^\circ/R$). Pravac $\ln \alpha$ u funkciji $1/T$ omogućuje računanje vrijednosti razlike entalpije prijenosa iz vrijednosti nagiba ($-\Delta \Delta H^\circ/R$) i entropije prijenosa iz vrijednosti odsječka ($\Delta \Delta S^\circ/R$).

Ovisnost $\ln k$ prvoizlazećih i drugoizlazećih enantiomera o $1/T \times 10^3$ je linearna za sve ispitivane ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree. Nadalje, uočava se da se povećanjem $1/T$ (smanjenjem temperature) blago povećava $\ln \alpha$ -vrijednost za spojeve **12b**, **12c**, **12e**, **12i**, **12o** i **12p**. Navedeni spojevi pokazuju dobru linearnost ($R^2 \geq 0,96$), što ukazuje da se mehanizam odvajanja enantiomera nije mijenjao u promatranom temperaturnom intervalu. Svako odstupanje od linearnosti ukazuje da je u promatranom temperaturnom intervalu došlo do promjene u mehanizmu razdvajanja enantiomera, što je vidljivo kod enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12d**, **12f**, **12h**, **12j**, **12m**, **12n** i **12r**, Slika P1.5 i Slika P1.6 u *Prilogu 1*. Stoga za ove spojeve nisu izračunate vrijednosti $\Delta \Delta H^\circ$ i $\Delta \Delta S^\circ$.

Iz Tablice P1.3 u *Prilogu 1*, može se vidjeti da su vrijednosti ΔH° negativne za sve ispitivane spojeve što pokazuje da je prijelaz otopljenе tvari iz pokretne na nepokretnu fazu bio egzoterman. Par enantiomera uvijek je imao različite ΔH° vrijednosti zbog različitog vremena zadržavanja na koloni. Također su i ΔS° -vrijednosti negativne. Kao posljedica negativnih

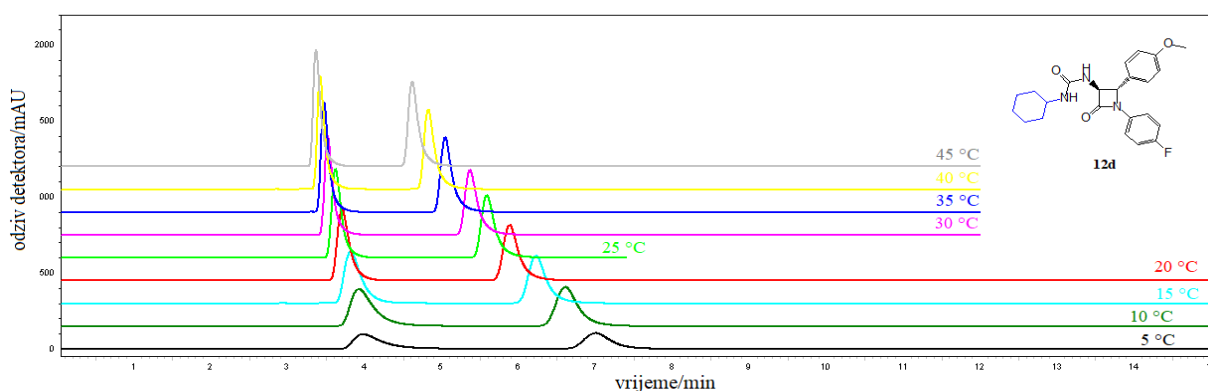
vrijednosti ΔH° i ΔS° , možemo reći da je prijenos otopljene tvari iz pokretne na nepokretnu fazu entalpijski povoljan proces, ali entropijski nepovoljan proces u promatranom temperaturnom intervalu. Nadalje, vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ enantiomera spojeva **12b**, **12c**, **12e**, **12i**, **12o** i **12p** su negativne na svakoj od ispitivanih temperatura, a vrijednost $\Delta\Delta H^\circ > T\Delta\Delta S^\circ$. Ovi parametri otkrili su da je postupak kiralnog prepoznavanja enantiomera također kontroliran entalpijom. Vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ$ variraju u intervalu od -9,63 do -3,98 kJ/mol za gore navedene spojeve. Negativne $\Delta\Delta H^\circ$ vrijednosti ukazuju na egzotermni prijenos adsorbiranog enantiomera iz pokretne na nepokretnu fazu, dakle radi se o povoljnom procesu, a povećanje temperature je nepovoljno za enantioseparaciju.

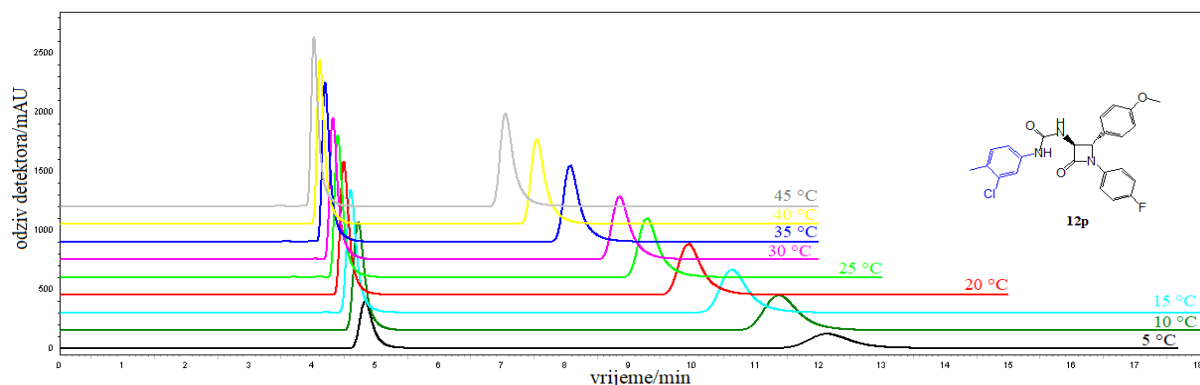
Poznavanje termodinamičkih parametra $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ omogućava i izračunavanje izoenantioselektivne temperature T_{iso} pomoću sljedeće jednadžbe:²¹⁴

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H^\circ}{\Delta\Delta S^\circ} \quad (1.8)$$

Iz Tablice P1.3 u *Prilogu 1* uočava se da su izoenantioselektivne temperature T_{iso} spojeva **12b**, **12c**, **12e**, **12i**, **12o** i **12p** znatno veće od najviše testirane temperature kolone (45 °C). Najviša opažena T_{iso} -vrijednost iznosi 1241 K za spoj **12o**. Uočava se da spojevi **12j** ima najnižu T_{iso} -vrijednosti (317,85 K).

Na Slici 38 prikazan je utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera spojeva **12d** i **12p** na celuloznoj koloni Chirallica PST-10 uz metanol kao pokrenu fazu.





Slika 38. Utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera spojeva **12d** i **12p** na celuloznoj koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza metanol, protok 1 mL min⁻¹, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 5 - 45 °C

4.6.2. Enantioseparacija ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** primjenom superkritične fluidne kromatografije

4.6.2.1. Utjecaj polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v**

Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** superkritičnom fluidnom kromatografijom ispitano je na različitim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama uz CO₂/metanol (70:30, v/v) kao pokretnu fazu.²¹⁵ Protok pokretne faze bio je 4,0 mL min⁻¹, radna temperatura kolone 35 °C, a povratni tlak 11 MPa. Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 254 nm te se snimalo UV područje od 190 do 400 nm. Rezultati enantioseparacije prikazani su u Tablici P2.1 u *Prilogu 2*.

Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a**, **12b** i **12e** na odabranim celuloznim i amiloznim nepokretnim fazama, uočava se najdulje zadržavanje enantiomera spoja **12e** s 4-fenilbutilnom skupinom, dok se enantiomeri spoja **12a** s alilnom skupinom najkraće zadržavaju na navedenim nepokretnim fazama. Uočava se da je na celuloznim nepokretnim fazama enantioselektivnost spojeva **12a** i **12e** lošija u odnosu na enantioselektivnost spoja **12b**. Za spoj **12a**, enantioselektivnost i razlučivanje na amiloznim kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA bolji su u odnosu na ostala dva spoja. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnu nepokretnu fazu ima negativan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera svih triju spojeva, što potvrđuju niže vrijednosti α i R_s postignute na koloni Chiralpak IB u odnosu na kolonu Chiralcel OD-3. Osim toga, imobilizacija celuloznog selektora ima pozitivan utjecaj i na razlučivanje enantiomera spoja **12a**. Također, imobilizacija amiloznog kiralnog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju spojeva **12a**, **12b** i **12e**, ali imobilizacija ima pozitivan utjecaj na razlučivanje enantiomera spoja

12e. Zamjenom celulozne jedinice s amiloznom, odnosno zamjenom kolone Chiralcel OD-3 s kolonom Chiralpak AD-3, postignuta je bolja enantioselektivnost i bolje razlučivanje spoja **12a**. Enantioselektivnost i razlučivanje enantiomera spoja **12a** na koloni Chiralpak IA bolji su u odnosu na kolonu Chiralpak IB. Razlučivanje enantiomera spoja **12e** na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3, Chirallica PST-10 i Chiralpak IB je veće nego razlučivanja enantiomera spoja **12a** i **12b**, dok na amiloznim kolonama najbolje razlučivanje postižu enantiomeri spoja **12a**.

Ispitan je utjecaj veličine cikloalkilnog prstena na mehanizam kiralnog prepoznavanja na celuloznim i amiloznim kolonama. Iz Tablice P2.1 u *Prilogu 2* je vidljivo da se enantiomeri spoja **12c** s ciklopentilnim skupinom kraće zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama u odnosu na enantiomere spoja **12d** s cikloheksilnom skupinom, neovisno o primjenjenim celuloznim ili amiloznim nepokretnim fazama. Zapravo, enantiomeri spoja **12c** se kraće zadržavaju pa u tom vremenu ne ostvaruju dovoljan broj kiralnih interakcija, dok enantiomeri spoja **12d** stvaraju veći broj interakcija zbog čega se dulje zadržavaju u kontaktu s nepokretnim fazama. Takvim je interakcijama nastali diastereomerni kompleks između spoja **12d** i kiralnog selektora dobro stabiliziran, a rezultat toga je bolje enantioprepoznavanje sa selektorima nepokretnih faza. Možemo zaključiti da u mehanizmu kiralnog prepoznavanja ovih spojeva, osim vodikovih veza, dipol-dipol i π - π interakcija s kiralnim selektorom, veliki doprinos ima i smještanje diastereomernog kompleksa u kiralnu šupljinu nepokretne faze. Moguće je da se šesteročlani prsten spoja **12d** fleksibilno prilagođava šupljinama kiralnih nepokretnih faza, dok sterički rigidan peteročlani prsten spoja **12c** nema tu mogućnost. Uočava se da je razlučivanje enantiomera spojeva **12c** i **12d** najbolje na koloni Chirallica PST-10 s kiralnim selektorom celuloza *tris*-(4-metilfenilkarbamatom). Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da veličina cikloalkilnog prstena utječe na mehanizam kiralnog prepoznavanja na polisaharidnim nepokretnim fazama.

Usporedbom rezultata odjeljivanje enantiomera spoja **12f** s furfurilnom skupinom i spoja **12h** s benzilnom skupinom na odabranim amiloznim i celuloznim nepokretnim fazama, vidljivo je da se enantiomeri spoja **12h** dulje zadržavaju u kontaktu s kiralnim nepokretnim fazama u odnosu na enantiomere spoja **12f**. Nadalje, uočava se da je kiralno prepoznavanje spoja **12h** na amiloznim kolonama Chiralcel AD-3 i Chiralpak IA te na celuloznoj koloni Chirallica PST-10 bolje u odnosu na spoj **12f**, dok je na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB nešto lošije u odnosu na spoj **12f**. Imobilizacija celuloznog kiralnog selektora na kiralnu nepokretnu fazu ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera spojeva **12f** i **12h**. Na koloni Chiralpak IB postiže se kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera, ali je ono nešto lošije u odnosu na kolonu Chiralcel OD-3. Isto tako, promjena više strukture kiralne nepokretne faze uslijed

imobilizacije amiloznog kiralnog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju i razlučivanju enantiomera spojeva **12f** i **12h**. Razlučivanje enantiomera spoja **12h** na svim ispitivanim kolonama veće je od razlučivanje enantiomera spoja **12f**. Najbolje kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera obaju spojeva postiže se na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kiralno prepoznavanje ovisi o vrsti prstena vezanog na ureido skupinu β -laktamskih urea.

Nadalje, cilj ispitivanja bio je uočiti kako veličina aromatskog sustava utječe na mehanizam kiralnog prepoznavanja spojeva **12g** i **12v** na celuloznim i amiloznim kiralnim nepokretnim fazama uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu. Naftilni prsten je veći aromatski sustav i može ostvariti jače aromatske π - π interakcije s elektronima bogatom benzenskom skupinom kiralne nepokretne faze. Usporedbom razlučivanja enantiomera spojeva **12g** i **12v**, vidljivo je da se enantiomeri spojeva **12g** i **12v** razdvajaju do osnovne linije uz odlično razlučivanje enantiomera na kolonama Chirallica PST-10, Chiralcel OD-3, Chiralpak IA i Chiralpak IB. Primjenom amilozne kolone Chiralpak AD-3 enantiomeri spoja **12g** s fenilnom skupinom tek se djelomično razdvajaju, dok se enantiomeri spoja **12v** s naftilnom skupinom razdvajaju do osnovne linije. Vidljivo je da se enantiomeri spoja **12v** dulje zadržavaju u kontaktu s ispitivanim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, te u odnosu na spoj **12g** imaju veće faktore zadržavanja enantiomera. Dulje vrijeme zadržavanja enantiomera spoja **12v** u kontaktu s nepokretnim fazama može biti posljedica dodatnih π - π interakcija, međutim, te interakcije ne doprinose značajnijem enantioprepoznavanju s celuloznim kiralnim nepokretnim fazama. Zamjenom celulozne jedinice s amiloznom jedinicom situacija se mijenja, enantiomeri spoja **12v** ostvaruju viši stupanj enantioprepoznavanja u odnosu na enantiomere spoja **12g**, ali isto tako je i bolje razlučivanje enantiomera spoja **12v**. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da mehanizam kiralnog prepoznavanja enantiomera ovisi o veličini aromatskog sustava vezanog na ureido skupinu. U mehanizmu kiralnog prepoznavanja steričke interakcije su manje izražene kod amiloznih nepokretnih faza nego kod celuloznih. Rezultati ukazuju da mehanizam kiralnog prepoznavanja na amiloznim kolonama ovisi o veličini aromatskog sustava.

Usporedbom razlučivanja spojeva **12h** i **12i**, može se primjetiti da su vrijednosti R_s faktora manje za spoj **12i** s (S)-(-)- α -metilbenzilnom skupinom nego za spoj **12h** s benzilnom skupinom na kolonama s kiralnim selektorom *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamatom). Međutim, enantiomeri spoja **12i** postižu viši stupanj enantioselektivnosti i bolje razlučivanje na koloni Chirallica PST-10. Iz toga proizlazi da kiralnim šupljinama kolona Chiralcel OD-3, Chiralpak AD-3, Chiralpak IA i Chiralpak IB više odgovara veličina i oblik nesupstituiranog benzila spoja **12h**, a manje metilbenzilna skupina spoja **12i**. Uočava se sterički utjecaj metilne skupine, što

može biti razlog nemogućnosti ostvarenja interakcija između NH-skupine analita i karbonilne skupine nepokretne faze. Međutim, enantiomeri spoja **12i** neometano sjedaju u kiralnu šupljinu kolone Chirallica PST-10.

Ispitivanjem utjecaja vrste kiralne nepokretne faze na odjeljivanje enantiomera spojeva **12h-j** na amiloznim i celuloznim kiralnim nepokretnim fazama vidljivo je da se prvoizlazeći i drugoizlazeći enantiomeri spoja **12j** dulje zadržavaju u kontaktu s ispitivanim kiralnim nepokretnim fazama nego enantiomeri spojeva **12h** i **12i**. Duže zadržavanje enantiomera spoja **12j** s benzoilnom skupinom uzrokuju dipol-dipol interakcije i vodikove veze. Osim što se dulje zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom enantiomeri spoja **12j** postižu i viši stupanj enantioselektivnosti i bolje razlučivanje enantiomera na kolonama Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB u odnosu na ostala dva spoja. Naime, na koloni Chirallica PST-10, unatoč duljem zadržavanju enantiomeri spoja **12j** ostvaruju lošije enantioprepoznavanje u odnosu na spoj **12i**, ali bolje u odnosu na spoj **12h** s benzilnom skupinom.

Zamjena celulozne jedinice s amiloznom je poboljšala odjeljivanje enantiomera spojeva **12h-j**, kako na adsorbiranoj tako i na imobiliziranoj inačici, odnosno na kolonama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA. Iako se enantiomeri spoja **12j** najdulje zadržavaju na navedenim amiloznim kolonama, ostvaruju niži stupanj enantioprepoznavanja od spojeva **12h** i **12i**. Štoviše, za ova tri spoja odjeljivanje je bolje na adsorbiranim selektorima (kolone Chiralcel OD-3 i Chiralpak AD-3) od onih na imobiliziranim (kolone Chiralpak IA i Chiralpak IB). Imobilizacija amiloznog i celuloznog kiralnog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju i razlučivanju enantiomera spojeva **12h-j**. Iz toga proizlazi da kiralno prepoznavanje spojeva **12h-j** i nepokretne faze ovisi o vrsti supstituenta i vrsti kiralnog selektora.

Doprinos Cl-atoma i njegov položaja na benzenskom prstenu vezanom na N1-atom ureido skupine na kiralno razdvajanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea utvrđen je obradom podataka dobivenih za spojeve **12k**, **12l** i **12m** i za nesupstituirani spoj **12g**. Iz Tablice P2.1 u *Prilogu 2* uočava se vrlo dobro enantioprepoznavanje svih četiriju spojeva sa selektorima kolona Chirallica PST-10, Chiralcel OD-3, Chiralpak IA i Chiralpak IB, dok kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12l** i **12m** u potpunosti izostaje na koloni Chiralpak AD-3. Uočava se da su za sva četiri spoja veće R_s -vrijednosti na celuloznim nepokretnim fazama nego na amiloznim nepokretnim fazama. Primjenom kolone Chiralpak AD-3, odjeljivanje enantiomera spoja **12g** pokazuje niži stupanj enantioprepoznavanja i razlučivanja u odnosu na njenu imobiliziranu inačicu, kolonu Chiralpak IA. Imobilizacija amiloznog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera spoja **12g**. Zamjena amilozne jedinice na

kiralnoj nepokretnoj fazi s celuloznom poboljšava kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12g**, a najbolje razdvajanje enantiomera može se uočiti na koloni Chiralpak IB.

Usporedbom razlučivanja enantiomera spojeva **12k-m**, koji se međusobno razlikuju samo po položaju Cl-atoma na fenilnom prstenu, vidljivo je da enantiomeri spoja **12k** s Cl-atomom u *ortho*-položaju postižu najbolje razlučivanje na koloni Chirallica PST-10. Međutim, enantiomeri spoja **12l** s Cl-atomom u *meta*-položaju i enantiomeri spoja **12m** s Cl-atomom u *para*-položaju postižu izvrsno kiralno prepoznavanje na drugom tipu celulozne nepokretne faze, odnosno na koloni Chiralcel OD-3, te na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IB. Na koloni Chiralpak AD-3 su kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera spojeva **12k-m** puno lošiji od onih postignutih na koloni Chiralpak IA. Stoga se može zaključiti da promjena više strukture amiloznog kiralnog selektora uslijed njegove imobilizacije pogoduje kiralnom prepoznavanju spojeva **12k-m**. Primjenom kolone Chiralpak AD-3 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12k** i **12l** uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu. Na koloni Chiralpak AD-3 najbolje je kiralno prepoznavanje enantiomera *meta*-analoga **12l**, dok je na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IA, najbolje kiralno prepoznavanje *para*-analoga **12m**. Iz Tablice P2.1 primjećuje se opadanje vrijednosti razlučivanja enantiomera u nizu: R_s (*ortho*, spoj **12k**) > R_s (*meta*, spoj **12l**) > R_s (*para*, spoj **12m**) na koloni Chirallica PST-10. Iz toga proizlazi da kiralnom selektoru kolone Chirallica PST-10 više „odgovara“ kada se atom klora nalazi bliže -NH i -C=O skupinama (±)-*trans*-β-laktamske uree. Enantiomeri spoja **12k** s Cl-atomom u *ortho*-položaju kraće se zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom, a α-vrijednost i R_s -vrijednost su veće. (±)-*trans*-β-Laktamska urea **12k** s Cl-atomom u *ortho*-položaju se unatoč steričkim smetnjama dobro smješta u kiralnu šupljinu selektora *tris*-(4-metilfenilkarbamata) celuloze koja stabilizira nastali diastereomerni kompleks i postiže se bolje kiralno prepoznavanje. Međutim, razlučivanje enantiomera spoja **12k** s Cl-atomom u *ortho*-položaju je lošije u odnosu na *meta*- i *para*-analoge na ostalim ispitivanim kiralnim nepokretnim fazama. Takvi rezultati ukazuju da u mehanizmu kiralnog prepoznavanja serije (±)-*trans*-β-laktamskih urea **12k-m** osim vodikovih interakcija, π-π interakcija i dipol-dipol interakcija, značajan doprinos ima i smještanje diastereomernog kompleksa u kiralnu šupljinu selektora, odnosno prostorna sukladnost enantiomera s kiralnom nepokretnom fazom. Sterički utjecaji važni su faktori za ulazak enantiomera u kiralnu šupljinu selektora i dodatnu stabilizaciju nastalog diastereomernog kompleksa između analita i selektora.

Osim položaja Cl-atoma na benzenskom prstenu, ispitan je i utjecaj njegovog elektron odvlačećeg djelovanja, te djelovanje elektron donirajuće metoksi-skupine, odnosno *tert*-butilne

skupine u *para*-položaju benzenskog prstena koji je vezan na N1-atom ureido skupine, na kiralno prepoznavanje na odabranim kolonama uz pokretnu fazu CO₂/MeOH (70:30, v/v). Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12m**, **12n** i **12o** na različitim celuloznim i amiloznim nepokretnim fazama uočava se najdulje zadržavanje enantiomera spoja **12m** s elektron odvlačećim Cl-atomom u *para*-položaju benzenskog prstena na amiloznim nepokretnim fazama kolona Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA, te na celuloznoj nepokretnoj fazi sa selektorom *tris*-(4-metilfenilkarbamatom) celuloze, tj. na koloni Chirallica PST-10. Međutim, iz Tablice P2.1 u *Prilogu 2* vidljivo je da se enantiomeri spojeva **12m** i **12n** s elektron donirajućom skupinom u *para*-položaju najduže zadržavaju na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB. Na koloni Chirallica PST-10 najbolje je kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12o** s *tert*-butilnom skupinom u *para*-položaju, dok su enantiomeri spoja **12m** s elektron odvlačećim Cl-atomom u istom položaju na benzenskom prstenu najslabije razdvojeni. Iz čega proizlazi, da ovoj koloni više odgovara elektron-donirajući supstituent u *para*-položaju nego elektron odvlačeći supstituent. Najbolje razlučivanje enantiomera na kolonama Chiralcel OD-3, Chiralpak IA i Chiralpak IB postižu enantiomeri spoja **12m** uz najviše α -vrijednosti, a na koloni Chiralcel AD-3 najbolje kiralno prepoznavanje ostvaruju enantiomeri spoja **12n** s metoksi-skupinom u *para*-položaju benzenskog prstena. Tetraedarski orijentirana *tert*-butilna skupina spoja **12o** najmanje pogoduje stvaranju povoljnih interakcija između enantiomera sa selektorom kiralne nepokretne faze kolona Chiralcel OD-3, Chiralpak IA i Chiralpak IB. Klorov atom i metoksi-skupina su prostorno manje i zbog toga sterički ne ometaju smještanje diastereomernog kompleksa u kiralnu šupljinu gore navedenih kiralnih kolona. Stoga interakcije između enantiomera spoja **12m**, odnosno **12n** i kiralne nepokretne faze postaju jače što rezultira boljom enantioseparacijom.

Usporedbom rezultata ispitivanja odjeljivanja enantiomera spoja **12l** s Cl-atomom u *meta*-položaju i spoja **12p** s Cl-atom u *meta*-položaju i metilnom skupinu u *para*-položaju benzenskog prstena na odabranim amiloznim i celuloznim, može se uočiti da se enantiomeri spoja **12p** dulje zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom kolone Chiralcel OD-3, te u odnosu na spoj **12l**, imaju veći faktor zadržavanja prvoizlazećeg i drugoizlazećeg enantiomera, ali se ostvaruje niži stupanj enantioprepoznavanja. Na preostalim kolonama, enantiomeri spoja **12l** pokazuju niži stupanj enantioselektivnosti od spoja **12p**, no dulje se zadržavaju u kontaktu s kiralnim nepokretnim fazama. Na koloni Chiralpak IB je kiralno prepoznavanje enantiomera obaju spojeva lošije od onih postignutih na koloni Chiralcel OD-3. Stoga se može zaključiti da promjena više strukture celuloznog kiralnog selektora uslijed njegove imobilizacije ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera obaju spojeva, dok

imobilizacijom razlučivanje enantiomera spoja **12l** postaje bolje. Imobilizacija amiloznog kiralnog selektora na kiralnoj nepokretnoj fazi ima pozitivan utjecaj na kiralno prepoznavanje i razlučivanje enantiomera obaju spojeva, što potvrđuju više vrijednosti α i R_s postignute na koloni Chiralpak IA u odnosu na kolonu Chiralpak AD. Razlučivanje enantiomera spoja **12l** na celuloznim kolonama Chiralpak OD-3 i Chiralpak IB je veće nego razlučivanje enantiomera spoja **12p**. Na preostalim kolonama bolje se odjeljuju enantiomeri spoja **12p** s Cl-atomom i metilnom skupinom na fenilnom prstenu. Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti da uvođenje elektron-donirajuće metilne skupine u *para*-položaju fenilnog prstena poboljšava sposobnost kiralnog prepoznavanja kiralnih nepokretnih faza, a iznimka je neopokretna faza kolone Chiralpak OD-3.

Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih i drugoizlazećih enantiomera spojeva **12r** i **12s**, na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, uočava se dulje zadržavanje enantiomera spoja **12r** s dvije metilne skupine u *meta*-položaju fenilnog prstena, neovisno o vrsti primjenjene kiralne nepokretne faze. Nadalje, može se uočiti da je enantioselektivnost spoja **12s** na celuloznim kolonama bolja u odnosu na enantioselektivnost spoja **12r**. Na koloni Chiralpak AD-3 izostaje enantioselektivno prepoznavanje enantiomera spoja **12s** s dvije trifluorometilne skupine u *meta*-položaju fenilnog prstena, dok na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IA izostaje enantioselektivno prepoznavanje enantiomera obaju spojeva. Imobilizacija amiloznog kiralnog selektora ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera spojeva **12r** i **12s**. Na koloni Chiralpak IB je kiralno prepoznavanje enantiomera obaju spojeva lošije od onih postignutih na koloni Chiralcel OD-3. Stoga se može zaključiti da promjena više strukture celuloznog kiralnog selektora uslijed njegove imobilizacije ne pogoduje kiralnom prepoznavanju enantiomera spojeva **12r** i **12s**. Razlučivanje enantiomera spoja **12s** na celuloznoj koloni Chirallica PST-7 je veće nego razlučivanje enantiomera spoja **12r**. Na preostalim kolonama bolje se odjeljuju enantiomeri spoja **12r**. Iz dobivenih podataka vidljivo je kako kiralno prepoznavanje spojeva **12r** i **12s** na odabranim kiralnim nepokretnim fazama ovisi o elektronskim svojstvima supstituenta u 3,5-položaju benzenskog prstena. Uvođenje elektron odvlačećih trifluorometilnih skupina u *meta*-položaj fenilnog prstena poboljšava sposobnost kiralnog prepoznavanja celuloznih kiralnih nepokretnih faza.

Nadalje, ispitan je utjecaj položaja dviju metilnih skupina na arilnom dijelu molekule na mehanizam kiralnog prepoznavanja spojeva **12r** i **12t** na celuloznim i amiloznim nepokretnim fazama. Iz Tablice P2.1 u *Prilogu 2* vidljivo je da se enantiomeri spoja **12r** duže zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom nego enantiomeri spoja **12t**. Osim toga, primjećuje se rast enantioselektivnosti i razlučivanja promjenom položaja metilnih skupina u strukturi ($\pm$)-

trans- β -laktamskih urea: enantiomeri spoja **12r** s metilnim skupinama u *meta*-položaju se odjeljuju bolje nego enantiomeri spoja **12t** s metilnim skupinama u *ortho*-položaju na celuloznim nepokretnim fazama. Vrijednosti α i R_s za enantiomere spoja **12t** su niže od spoja **12r**, što se može pripisati steričkim smetnjama koje uzrokuje metilna skupina u *ortho*-položaju. Njihov položaj ometa ulazak enantiomera u kiralnu šupljinu celuloznih kolona. Međutim, odjeljivanju enantiomera spoja **12t** više pogoduju amilozne nepokretne faze. Na koloni Chiralpak AD-3 spoj **12t** pokazuje veću enantioselektivnost od spoja **12r**, a na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IA, ne dolazi do enantioprepoznavanja spoja **12r** s kiralnim selektorom navedene kolone. Dobiveni rezultati ukazuju da kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12r** i **12t** sa selektorima ispitivanih amiloznih i celuloznih nepokretnih faza ovisi o položaju metilnih skupina na fenilnom prstenu, ali isto tako i o supramolekularnoj strukturi amiloze odnosno celuloze. Kako je tercijarna struktura amiloze drugačija od celuloze, za očekivati je da će i mehanizam kiralnog prepoznavanja biti različit. Pritom viša struktura amilozne uzvojnice u ovom slučaju više pogoduje ulasku enantiomera spoja **12t** u odnosu na manje sterički zahtjevan spoj **12r**.

Ispitan je utjecaj veličine alkilnog lanca na mehanizam kiralnog prepoznavanja spojeva **12t** i **12u** na celuloznim i amiloznim nepokretnim fazama. Usporedbom α -vrijednosti spoja **12t**, supstituiranog s dvije metilne skupine u *ortho*-položaju benzenskog prstena, u odnosu na spoj **12u** s dvije izopropilne skupine u *ortho*-položaju benzenskog prstena, može se uočiti da spoj **12t** ima viši stupanj enantioprepoznavanja u odnosu na spoj **12u** na amiloznim i celuloznim nepokretnim fazama, s izuzetkom kolone Chirallica PST-10. I ostali pokazatelji enantioselektivnosti, odnosno faktori zadržavanja i razlučivanje enantiomera, također su veći za spoj **12t** nego za spoj **12u** na svim kolonama, osim na koloni Chirallica PST-10. Najbolje odjeljivanje enantiomera i enantioselektivnost za spoj **12t** postignuto je na koloni Chiralpak AD-3, a za spoj **12u** na koloni Chirallica PST-10. Na amiloznim nepokretnim fazama Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera spoja **12u**. To pokazuje da u mehanizmu kiralnog prepoznavanja na amiloznim nepokretnim fazama veliku ulogu ima veličina supstituenta u *ortho*-položaju benzenskog prstena. Zapravo, prevladavaju sterički efekti pri smještanju enantiomera u kiralne šupljine amilozne nepokretne faze, pri čemu su metilne skupine spoja **12t** manje sterički zahtjevne. Izopropilna skupina sterički otežava ulazak enantiomera spoja **12u** u kiralnu šupljinu, a isto tako navedena skupina ometa i nastajanje vodikovih veza između NH-protona ureido skupine i C=O skupine kiralnog selektora.

Usporedba faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na amiloznim i celuloznim kiralnim nepokretnim fazama prikazana je na Slici P2.1 u *Prilogu 2*. Iz prikaza je vidljivo da se prvoizlazeći enantiomeri najdulje zadržavaju na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3, a jedina iznimka su spojevi **12p** i **12s** koji se najdulje zadržava u kontaktu s nepokretnom fazom kolone Chiralpak IA. Nadalje, uočava se da se prvoizlazeći enantiomeri spojeva **12a-v** dulje zadržavaju na koloni Chiralpak AD-3 nego na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IA. Zamjena amilozne jedinice s celuloznom, u slučaju adsobiranog i imobiliziranog selektora skraćuje vrijeme zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a-v**. Zamjenom kolona Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB s kolonom Chirallica PST-10, postignuto je dulje zadržavanje prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea, uz izuzetak enantiomera spojeva **12s** i **12v**. Zamjenom je postignuto bolje kiralno prepoznavanje kao i razlučivanje većine ispitivanih spojeva (13 od ukupno 21).

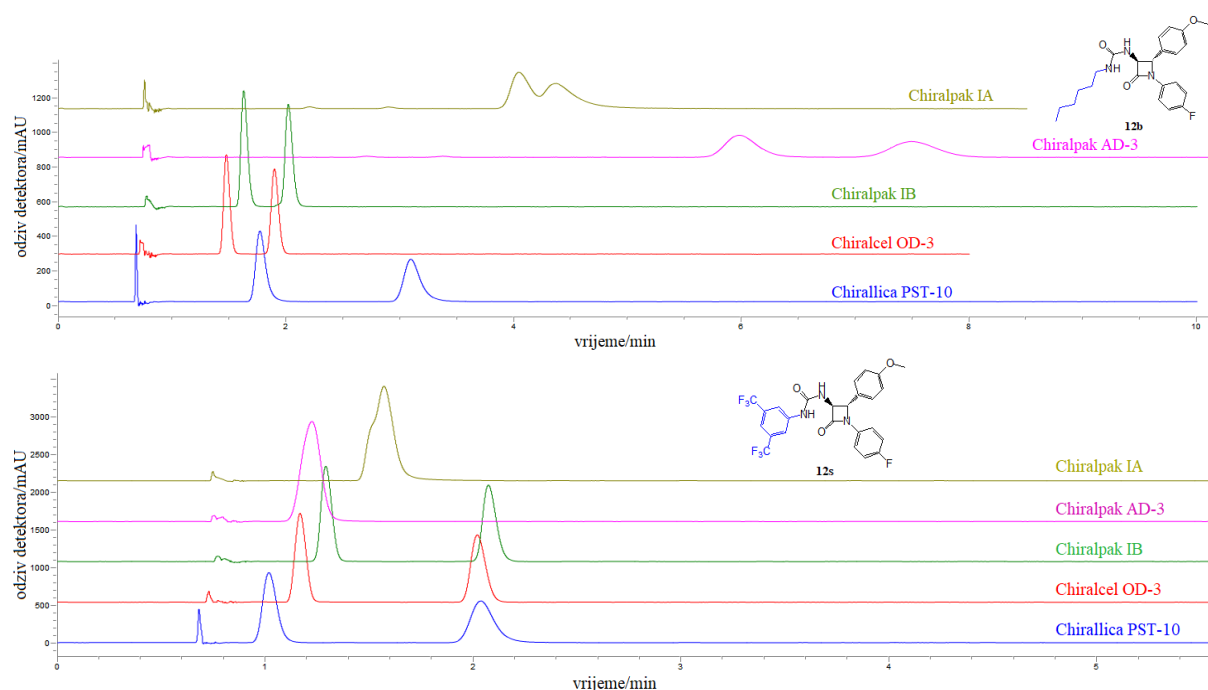
Usporedbom separacijskih faktora sintetiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na amiloznim i celuloznim kiralnim nepokretnim fazama, Slika P2.2 u *Prilogu 2*. Uočava se da spoj **12s** s 3,5-bis(trifluormetil)fenilnom skupinom, pokazuje najviši stupanj enantioprepoznavanja na celuloznim nepokretnim fazama kolona Chirallica PST-10, Chiralcel OD-3 i Chiralcel IB, dok enantioprepoznavanje spoja **12s** izostaje na amiloznim kolonama. Na koloni Chiralpak AD-3 najviši stupanj enantioselektivnosti α uz pokretnu fazu CO₂/MeOH postiže spoj **12t** s 2,6-dimetilfenilnim supstituentom, a na koloni Chiralpak IA najviši stupanj enantioprepoznavanja pokazuje spoj **12i** s (S)-(-)- α -metilbenzilnom skupinom. Nadalje, uočava se da na koloni Chiralpak AD-3 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje spojeva **12k**, **12m**, **12s** i **12u**, a na njenoj imobiliziranoj inačici izostaje prepoznavanje spojeva **12r**, **12s** i **12u**.

Slika P2.3 u *Prilogu 3* prikazuje usporedbu razlučivanja enantiomera, kao mjere djelotvornosti odvajanja enantiomera sintetiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na amiloznim nepokretnim fazama kolona Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA, te celuloznim nepokretnim fazama kolona Chirallica PST-10, Chiralcel OD-3 i Chiralcel IB. Uočava se da je neovisno o vrsti primjenjene kiralne nepokretne faze, odjeljivanje većine ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** zadovoljavajuće visoko. Nadalje, uočava se da se enantiomeri spojeva **12k**, **12m**, **12s** i **12u** uopće ne odjeljuju na kolonama Chiralpak AD-3, a na njenoj imobiliziranoj inačici ne odjeljuju se enantiomeri spojeva **12r**, **12s** i **12u**. Nadalje, na celuloznim kolonama Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB ističu se iznimno visoke vrijednosti faktora razlučivanja ($R_s > 6$) za spojeve **12g**, **12j**, **12k-p**. Na amiloznoj kiralnoj nepokretnoj fazi kolone Chiralpak AD-3 vrlo je slabo odjeljivanje enantiomera spojeva **12g**, **12n** i **12o**, na koloni Chiralcel OD-3 slabo

se odjeljuju enantiomeri spoja **12u**, dok se enantiomeri spoja **12b** slabo odjeljuju na koloni Chiralpak IA.

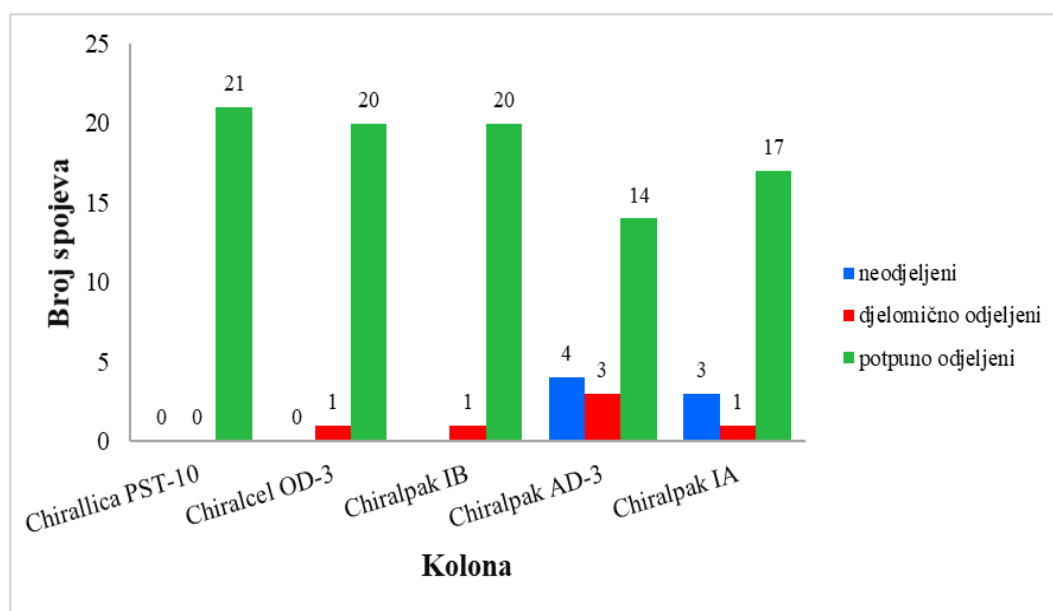
Za odjeljivanje enantiomera spojeva najdjelotvornija je kolona Chirallica PST-10 sa selektorom tris-(4-metilfenilkarbamatom) celuloze, jer se na ovoj koloni odjeljuju enantiomeri svih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea. Celulozne kolone s adsorbiranim i imobiliziranim selektorom, kolone Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB, pokazale su se djelotvornijim od amiloznih analoga, kolona Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA.

Na Slici 39 prikazan je utjecaj vrste kiralnih nepokretnih faza na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12b** i **12s** uz CO₂/MeOH (70/30, v/v) kao pokretnu fazu.



Slika 39. SFC kromatogrami enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12b** i **12s** odvojenih na kolonama Chirallica PST-10, Chiralcel OD-3, Chiralpak IB, Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA. Kromatografski uvjeti: mobilna faza CO₂/MeOH (70/30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa

Rezultati kromatografskog razdvajanja ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu prikazani su u Tablice P2.1 u *Prilogu 2*, a broj kiralnih spojeva koji se ne odjeljuje, djelomično odjeljuje i potpuno odjeljuje (odjeljuje do osnovne linije) su prebrojani i prikazani na Slici 40.



Slika 40. Ukupni broj neodjeljenih, djelomično odjeljenih i potpuno odjeljenih (do osnovne linije) ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, odnosno na kolonama Chirallica PST-10, Chiralcel OD-3, Chiralcel IB, Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA

U slučaju analiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** vidljivo je da je razlučivanje enantiomera značajno bolje na celuloznim nepokretnim fazama od razlučivanja postignutog na amiloznim nepokretnim fazama. Iz prikaza je vidljivo da je najbolje razlučivanje ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** postignuto na koloni Chirallica PST-10, odnosno na ovoj se koloni enantiomeri svih spojeva odjeljuju do osnovne linije uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu. Na drugom tipu celulozne nepokretne faze koja je preinačena s *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamatom), odnosno na koloni Chiralcel OD-3, uočava se izvrsno odvajanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea do osnovne linije za 20 od ukupno 21 analiziranog spoja. No, za kolonom Chiralcel OD-3 ne zaostaje ni njena imobilizirana inačica, kolona Chiralpak IB, koja također potpuno odjeljuje enantiomere 20 ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea.

Zamjena celulozne jedinice na kiralnoj nepokretnoj fazi s amiloznom rezultira manjim stupnjem enantioprepoznavanja (81 %) svih spojeva sa selektorom kolone Chiralpak AD-3, ali su enantiomeri 14 spojeva (67 %) odvojeni do osnovne linije. Nadalje, na *tris*-(3,5-dimetilfenilkarbamoil) amiloznoj kiralnoj nepokretnoj fazi odjeljivanja enantiomera su bila učinkovitija (86 %) na imobiliziranoj (kolona Chiralpak IA) nego na adsorbiranoj fazi (kolona Chiralpak AD-3). Očito je da zamjena celulozne jedinice s amiloznom, a naročito njena adsorbirana inačica, manje pogoduje razdvajanju enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**.

4.6.2.2. Utjecaj vrste alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

($\pm$)-*trans*- β -Laktamske uree su polarni spojevi, a ugljikov(IV) oksid je nepolaran spoj. Polarnost mu je slična heksanu i time ga čini pogodnim za korištenje kao pokretne faze kod eluiranja nepolarnih spojeva. Čisti ugljikov(IV) oksid nije najbolji izbor kod analize polarnih spojeva jer može uzrokovati probleme s topljivošću. Kako bi se povećala topljivost analita u pokretnu fazu se dodaje polarno organsko otapalo, koje se još naziva i modifikator.²¹⁶ Najčešće korišteni modifikatori su metanol, etanol, propan-2-ol i acetonitril.

U ovom radu ispitan je utjecaj vrste alkoholnog modifikatora (metanol, etanol i propan-2-ol) na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**.²¹⁵ Literaturno je poznato da se struktura višeg reda polisaharidnih nepokretnih faza mijenja ovisno o vrsti upotrebljenog alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi.²¹⁷ Etanol i propan-2-ol na drugačiji način utječu na tercijarnu strukturu polisaharidne nepokretne faze mijenjanjem veličine i oblika kiralnih šupljina u koje se mogu "smjestiti" enantiomeri analita. Kao rezultat tih promjena, drugačije je i kiralno prepoznavanje enantiomera analita sa selektorom kiralne nepokretne faze.²¹⁸

Ispitan je utjecaj volumnog udjela (30 %) metanola, etanola ili propan-2-ola u pokretnoj fazi. Promjena alkoholnog modifikatora utječe na polarnost pokretne faze.²¹⁹ Rezultati ispitivanja vrste alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi CO₂/alkohol (70:30, v/v) na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 prikazani su u Tablici P2.2 u *Prilogu 2*. Protok pokretne faze bio je 4,0 mLmin⁻¹, radna temperatura kolone 35 °C, a povratni tlak 11 MPa.

Na temelju podataka prikazanih u Tablici P2.2 u *Prilogu 2*, može se zaključiti da kiralno prepoznavanje enantiomera spojeva **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 ovisi o polarnosti analita, ali isto tako i o vrsti alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi. Metanol ima veću moć eluiranja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a-e**, **12i**, **12o**, **12r**, **12t**, **12u** od etanola i propan-2-ola, dok etanol ima veću moć eluiranja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12f-h**, **12j-n**, **12s** i **12v**. Također, metanol ima veću moć ispiranja drugoizlazećih enantiomera spojeva **12a-c**, **12o**, **12s**, a etanol ima veću moć ispiranja drugoizlazećih enantiomera spojeva **12d-i**, **12k-n**, **12p**, **12r**, **12s-12v**. Iz iste tablice vidljivo je da etanol ima veću moć eluiranja enantiomera od propan-2-ola, a u slučaju spoja **12j** moć ispiranja enantiomera uz propa-2-ol je veća nego uz metanol i etanol. Nadalje, vidljivo je kako vrsta alkohola utječe i na separacijski faktor i na razlučivanje.

Na Slici P2.4 u *Prilogu 2* uspoređeni su faktori zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz pokretnu fazu CO₂/alkoholni modifikator, odnosno uz metanol, etanol ili propan-2-ol. Usporedbom faktora zadržavanja

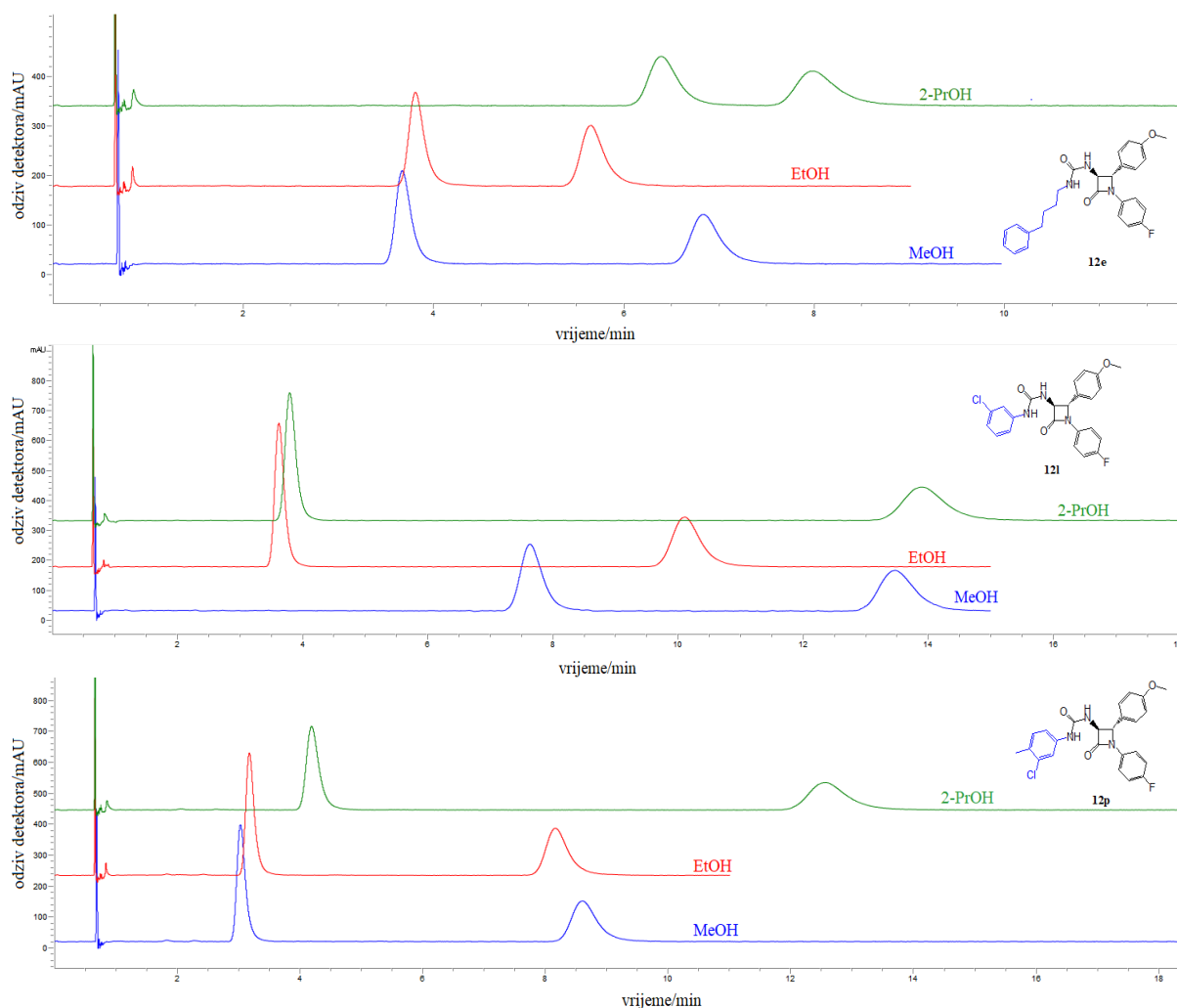
prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a-v**, može se uočiti da se enantiomeri spojeva **12a-e**, **12i**, **12o**, **12r**, **12t** i **12u** najkraće zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom primjenom metanola kao alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi. Dulje zadržavanje enantiomera gore navedenih spojeva posebno je izraženo primjenom propan-2-ola kao alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi. Polarnost alkoholnih modifikatora opada u nizu: metanol > etanol > propan-2-ol. Literaturno je poznato, da se alkoholni modifikator natječe s analitom za interakcijska mjesta na nepokretnoj fazi²¹⁶ i s povećanjem polarnosti modifikatora u pokretnoj fazi jačaju vodikove veze između alkohola i kiralnog selektora, a istovremeno slabe vodikove veze između analita i kiralnog selektora nepokretne faze. Budući da interakcije slabe, enantiomeri se kraće zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom, odnosno vrijednosti faktora zadržavanja enantiomera su niže. Međutim, enantiomeri spojeva **12g**, **12j**, **12l**, **12m** i **12r** najdulje se zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom primjenom metanola kao alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi, a najkraće se zadržavaju uz etanol, dok se enantiomeri spoja **12r** najkraće zadržava uz propan-2-ol kao alkoholni modifikator. Metanol i etanol su linerani alkoholi, a propan-2-ol je razgranati alkohol i kod njega dolaze do izražaja i steričke smetnje. Steričke smetnje slabe vodikove veze između propan-2-ola i kiralnog selektora kolone Chirallica PST-10. Stoga vodikove veze između kiralne nepokretne faze i enantiomera većine analiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea (**12a-f**, **12h**, **12i**, **12k**, **12n**, **12o**, **12p**, **12s-v**) postaju jače, što rezultira duljim zadržavanjem enantiomera na kiralnoj nepokretnoj fazi.

Na Slici P2.5 u *Prilogu 2* uspoređeni su separacijski faktori ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz CO₂/alkoholni modifikator (metanol, etanol ili propan-2-ol) kao pokretnu fazu. Iz prikaza je vidljivo da se zamjenom alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi iz metanola u manje polaran etanol, α -vrijednost smanjuje za spojeve **12a-f**, **12i-k**, **12o**, **12r**, **12t** i **12u**. Također, uočava se da se separacijski faktor α smanjuje u nizu: metanol > etanol > propan-2-ol za enantiomere spojeva **12a-c**, **12e**, **12i-k**, **12t** i **12u**. Međutim, separacijski faktor raste u nizu: metanol > etanol > propan-2-ol za enantiomere spojeva **12g**, **12l-n**, **12p**, **12s** i **12v**. Nadalje, uočava se da spojevi **12f**, **12o** i **12r** postižu sličnu vrijednost faktora selektivnosti primjenom metanola i propan-2-ola kao modifikatora u pokretnoj fazi. Iz Slike P2.5 u *Prilogu 2* vidljivo je da enantiomeri spoja **12s** ostvaruju bolje kiralno prepoznavanje sa selektorom nepokretne faze nego enantiomeri ostalih analiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea, neovisno o primjenjenom alkoholnom modifikatoru u pokretnoj fazi. Uočava se da se enantiomeri spojeva **12g**, **12l**, **12m** i **12p** zamjenom alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi iz metanola u manje polarne modifikatore, kao što su etanol i propan-2-ol, kraće zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom, ali i da postižu bolje razlučivanje

enantiomera. Razdvajanju enantiomera spoja **12j** s benzoilnim supstytutentom najviše pogoduje metanol kao alkoholni modifikator u pokretnoj fazi.

Iz Slike P2.6 u *Prilogu 2* je vidljivo da se promjenom etanola kao alkoholnog modifikatora, R_S -vrijednost povećava za enantiomere spojeva **12f-h**, **12k-n**, **12p**, **12s** i **12v**, a smanjuje za spojeve **12a-e**, **12i**, **12j**, **12o**, **12r**, **12t** i **12u**. Zamjenom alkoholnog modifikatora u pokretnoj fazi iz metanola u propan-2-ol, R_S -vrijednost se povećava za enantiomere spojeva **12g**, **12k-n**, **12p-s** i **12v** a smanjuje za ostale ispitivane ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree. Takav rezultat ukazuje da mehanizam kiralnog prepoznavanja ovisi o polarosti primjenjenog modifikatora i o vrsti supstituenta vezanog na dušikov atom ureido skupine ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea.

Na Slici 41 prikazan je utjecaj alkoholnih modifikatora na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12e**, **12l** i **12p** na koloni Chirallica PST-10.



Slika 41. Utjecaj alkoholnih modifikatora (metanola, etanola i propan-2-ola) na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12e**, **12l** i **12p** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: mobilna faza CO₂/alkoholni modifikator (70/30, v/v), protok 4 mL min⁻¹; temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa

4.6.2.3. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

($\pm$)-*trans*- β -Laktamske uree **12a-v** su spojevi koji u svojoj strukturi uz β -laktamski prsten sadrže i uredio skupinu, odnosno fragment NH-C(=O)-NH. Naime, uredio skupina je planarna i sadrži dvije NH-skupine koje mogu donirati svoje protone, a elektron-odvlačeći kisikov atom dodatno povećava njihov donorski karakter. Osim toga, ova skupina može djelovati i kao akceptor vodikove veze preko slobodnih elektronskih parova kisika.²²⁰

U superkritičnoj fluidnoj kromatografiji se pri analizi bazičnih analita u pokretnu fazu dodaje amin, a najčešće se dodaju izopropilamin, dietilamin ili trimetilamin.¹²⁹ Dodatak amina u pokretnu fazu poboljšava selektivnost kolone²²¹, a ne utječe značajno na oštrinu (simetričnost) pikova.²²² Osim toga, vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera skraćuju se znatnije za razliku od vremena zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, u odnosu na uvjete kada nije bio dodan aditiv u pokretnu fazu. Smatra se da je kraće vrijeme zadržavanja enantiomera posljedica natjecanja aditiva i bazičnog analita za interakcijska mjesta na nepokretnoj fazi.²²¹

Budući da ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12a-v** sadrže dvije NH-skupine, u pokretnu fazu CO₂/MeOH (70/30, v/v) dodana je baza, odnosno dodan je izopropilamin. Ispitan je utjecaj volumnog udjela izopropilamina (0 %, 0,1 % i 0,2 %) u pokretnoj fazi na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10. Ispitivanje je provedeno pri protoku pokretne faze od 4,0 mL min⁻¹, temperaturi kolone od 35 °C i povratnom tlaku od 11 MPa.²¹⁵ Rezultati ispitivanja volumnog udjela izopropilamina prikazani su u Tablici P2.3 u *Prilogu 2*.

Iz Tablice P2.3 u *Prilogu 2* vidljivo je da se povećanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi CO₂/MeOH (70/30, v/v) neznatno mijenjaju vrijednosti faktora zadržavanja enantiomera k_1 i k_2 te separacijskog faktora α . Nadalje, uočava se da nema pravilnosti kod razlučivanje enantiomera spojeva **12a-v**. Također, uočava se da se povećanjem volumena udjela izopropilamina povećava razlučivanje enantiomera spojeva **12m** i **12s**, a da se smanjuje razlučivanje enantiomera spojeva **12a**, **12g**, **12k** i **12t**.

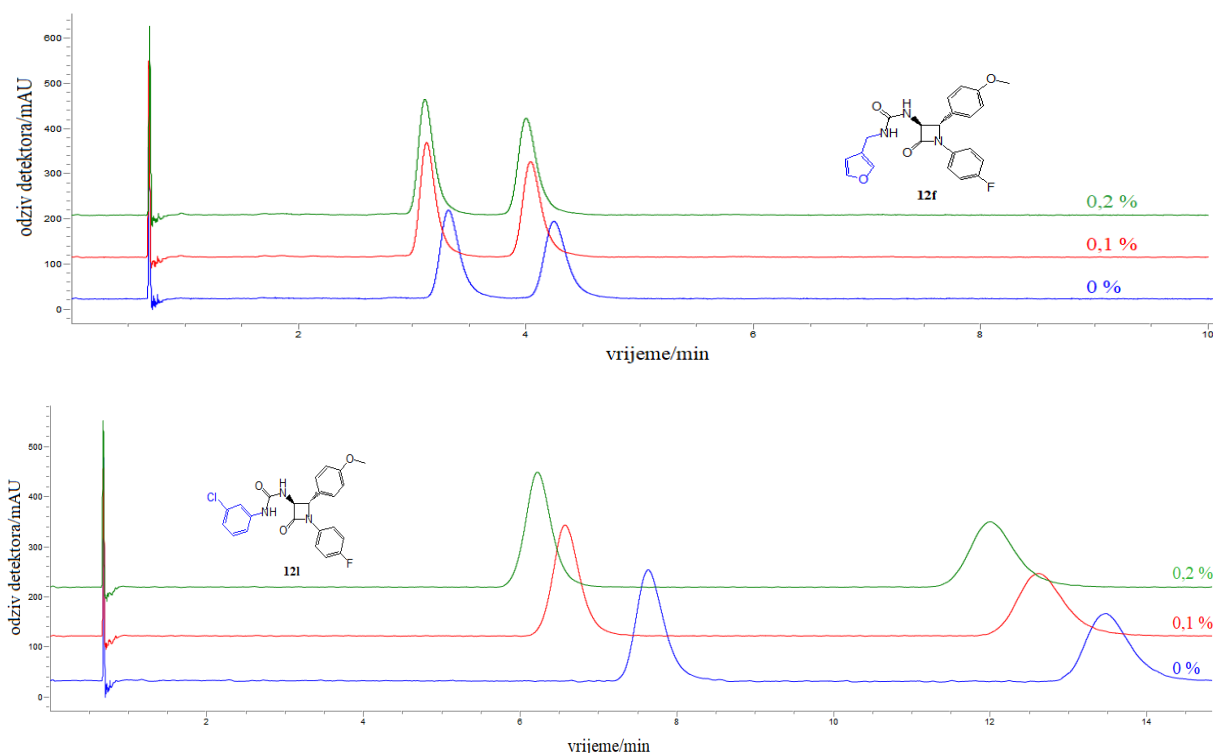
Slika P2.7 u *Prilogu 2* prikazuje usporedbu faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz izopropilamin kao aditiv. Uočava se da se povećanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi skraćuje vrijeme zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a**, **12g**, **12l**, **12m**, **12s** i **12v**. Međutim, kod ostalih analiziranih spojeva nema pravilnosti. Iz iste slike vidljivo je da se enantiomeri spoja **12p** s 3-klor-4-metilfenilnim supstituentom najdulje zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom faza, dok se enantiomeri spojeva **12s** i **12u** najkraće zadržavaju u kontaktu s

nepokretnom fazom kolone Chirallica PST-10. Usporedbom faktora zadržavanja spojeva **12k**, **12l** i **12m** koji se međusobno razlikuju samo u položaju Cl-atoma na fenilnom prstenu, vidljivo je da se spoj **12k** s Cl-atomom u *ortho*-položaju kraće zadržava na koloni Chirallica PST-10 nego spojevi **12l** i **12m** s Cl-atomom u *meta*-položaju, odnosno u *para*-položaju.

Slika P2.8 u *Prilogu 2* prikazuje usporedbu separacijskih faktora enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu koja sadrži izopropilamin u volumnom udjelu od 0 % do 0,2 %. Uočava se da separacijski faktor kod većine analiziranih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea ostaje gotovo nepromijenjen povećanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi. Najbolje kiralno prepoznavanje pokazuju enantiomeri spoja **12s** s 3,5-bis(trifluormetil)fenilnom skupinom na N1-atomu ureido skupine, unatoč najnižoj vrijednosti faktora zadržavanja enantiomera. Usporedbom α -vrijednosti spoja supstituiranog s *ortho*-Cl atomom **12k**, *meta*-Cl atomom **12l** i *para*-Cl atomom **12m** može se uočiti da spojevi **12k** i **12l** imaju slične α -vrijednosti neovisno o volumnom udjelu izopropilamina (0,1 % ili 0,2 %) u pokretnoj fazi te da je kiralno prepoznavanje ovih spojeva bolje nego za spoj **12m**.

Slika P2.9 u *Prilogu 2* prikazuje usporedbu razlučivanja enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz izopropilamin kao aditiv. Uočava se da se povećanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi (od 0 do 0,2 %) smanjuje razlučivanje enantiomera spojeva **12a**, **12g**, **12k** i **12t**. Nadalje, vidljivo je da se razlučivanje enantiomera spojeva **12m** i **12s** blago povećava s povećanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi, a da kod preostalih spojeva nema pravilnosti. Enantiomeri ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** se razdvajaju do osnovne linije uz odlično razlučivanje enantiomera. Razlučivanje enantiomera je izuzetno visokih vrijednosti ($R_s > 11$) kod spojeva **12j** i **12r**. Ispitivanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 utvrđeno je da kiralno prepoznavanje ovisi o vrsti supstituenta vezanog na N-atom ureido skupine i o volumnom udjelu izopropilamina u pokretnoj fazi.

Na Slici 42 prikazan je utjecaj volumnog udjela izopropilamina na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12f** i **12l** na koloni Chirallica PST-10.



Slika 42. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12f** i **12l** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: mobilna faza CO₂/MeOH/izopropilamin (70/30/(0-0,2), v/v/v), protok 4 mL min⁻¹; temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa

4.6.2.4. Utjecaj temperature kolone na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

U nastavku istraživanja, ispitan je utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**. Utjecaj temperature ispitan je u temperaturnom intervalu od 29 °C do 41 °C. Ispitivanje je provedeno na koloni Chirallica PST-10 uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu, uz protok od 4 mL min⁻¹ i povratni tlak od 11 MPa.²¹⁵ Rezultati utjecaja temperature kolone na faktor zadržavanja enantiomera, separacijski faktor i razlučivanje enantiomera spojeva **12a-v** prikazani su u Tablici P2.4 u *Prilogu 2*.

Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a-v**, mogu se primjetiti opadajuće vrijednosti k_1 povećanjem temperature kolone za spojeve **12b**, **12d-h**, **12j**, **12n** i **12r**, dok kod ostalih spojeva nema pravilnosti. Enantiomeri spoja **12r** s 3,5-dimetilfenilnom skupinom pokazuju najvišu vrijednost faktora zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, a najnižu vrijednost faktora pokazuju enantiomeri spoja **12s** s 3,5-bis(trifluormetil)fenilnim supstituentom.

Kao što je vidljivo iz Tablice P2.4 u *Prilogu 2*, u većini se slučajeva faktor zadržavanja drugoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** smanjuje s povećanjem temperature kolone. Iz Tablice P2.4 u *Prilogu 2* uočava se da se povećanjem temperature kolone

(29 °C do 41 °C) α -vrijednost blago smanjuje za enantiomere spojeva **12b-e**, **12i-12k**, **12o** i **12p**. Budući da se separacijski faktor smanjuje s povećanjem temperature kolone to ukazuje da je odjeljivanje enantiomera navedenih spojeva entalpijski vođen proces. Separacijski faktor α za spoj **12r** se blago povećava s povećanjem temperature kolone (29 do 41 °C). Kad povećanjem temperature α -vrijednost raste, onda je to entropijski vođen proces. Nadalje, uočava se da kod spojeva **12a**, **12f-h**, **12l-n**, **12s-v** nema pravilnosti. ($\pm$)-*trans*- β -Laktamske uree pokazale su dobar stupanj enantioprepoznavanja s kiralnim selektorom kolone Chirallica PST-10. Enantiomeri spoja **12s** postižu najviši stupanj enantioselektivnosti pri svim ispitanim temperaturama.

Iz Slike P2.10 u *Prilogu 2* je vidljivo da se razlučivanje enantiomera spojeva **12f**, **12n-r** i **12u** povećava s povećanjem temperature kolone, a da se smanjuje za spoj **12c**. Uočava se da kod ostalih spojeva nema pravilnosti. Usporedbom R_s vrijednosti spojeva **12a-v**, uz konstantan sastav pokretne faze i promjenu temperature kolone (29 °C do 41 °C), ističu se vrijednosti razlučivanja enantiomera spojeva **12j** i **12r** koje su veće od 10. Enantiomeri ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** se razdvajaju do osnovne linije pri svim ispitivanim temperaturama.

Nadalje, da bi se dodatno ispitaio utjecaj temperature kolone na enantioseparaciju, proučeno je termodinamičko ponašanje odvajanja enantiomera spojeva **12a-v** na koloni Chirallica PST-10. Upotrebom van't Hoffovih jednadžba (1.5 i 1.7) izračunati su termodinamički parametri ΔH_1° , ΔH_2° , ΔS_1° , ΔS_2° , $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ te izoenantioselektivna temperatura T_{iso} . Na Slici P2.11 u *Prilogu 2* prikazana je grafička ovisnost $\ln k$ ili $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za enantiomere spojeva **12a-h**, na Slici P2.12 za enantiomere spojeva **12i-p**, a na Slici P2.13 za enantiomere spojeva **12r-v**.

Uočava se da je ovisnost $\ln k$ prvoizlazećih i drugoizlazećih enantiomera o $1/T \times 10^3$ linearna za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12d**, **12e**, **12j**, **12n-r** i **12v**. Nadalje, uočava se da ovisnost $\ln k_1$ o $1/T \times 10^3$ nije linearna za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12a-c**, **12i**, **12k-m** i **12s-u** te da ovisnost $\ln k_2$ o $1/T \times 10^3$ nije linearna za spojeve **12k** i **12s**. Svako odstupanje od linearnosti ukazuje da je u promatranom temperaturnom intervalu došlo do promjene u mehanizmu razdvajanja enantiomera, što je vidljivo kod enantiomera spojeva **12a-c**, **12i**, **12k-m** i **12s-u**, Slike P2.11-P2.13 u *Prilogu 2*. Stoga za ove spojeve nisu izračunate vrijednosti ΔH_1° , ΔH_2° , ΔS_1° i ΔS_2° . Ako je ovisnost $\ln k_1$, odnosno $\ln k_2$ vs. $1/T \times 10^3$ linearna, iz nagiba pravca ($-\Delta H_1^\circ/R$, odnosno $-\Delta H_2^\circ/R$) određene su vrijednosti entalpija ΔH_1° i ΔH_2° prijenosa tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, a vrijednosti entropija ΔS_1° i ΔS_2° prijenosa iz vrijednosti odsjeka ($\Delta S_1^\circ/R$, odnosno $\Delta S_2^\circ/R$).

Iz Tablice P2.5 u *Prilogu 2* može se vidjeti da su vrijednosti ΔH_1° i ΔH_2° negativne za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12d**, **12e**, **12j**, **12n-r** i **12v** (linearna ovisnost $\ln k_1$ i $\ln k_2$ o $1/T \times 10^3$), što pokazuje da je prijelaz otopljene tvari iz pokretne na nepokretnu fazu bio egzoterman. Par enantiomera uvijek je imao različite ΔH° vrijednosti zbog različitog vremena zadržavanja na koloni. Kao posljedica negativnih vrijednosti ΔH° i ΔS° , možemo reći da je prijenos otopljene tvari iz pokretne na nepokretnu fazu entalpijski povoljan proces, ali entropijski nepovoljan proces u promatranom temperaturnom intervalu, a povećanje temperature će biti nepovoljno za enantioseparaciju.

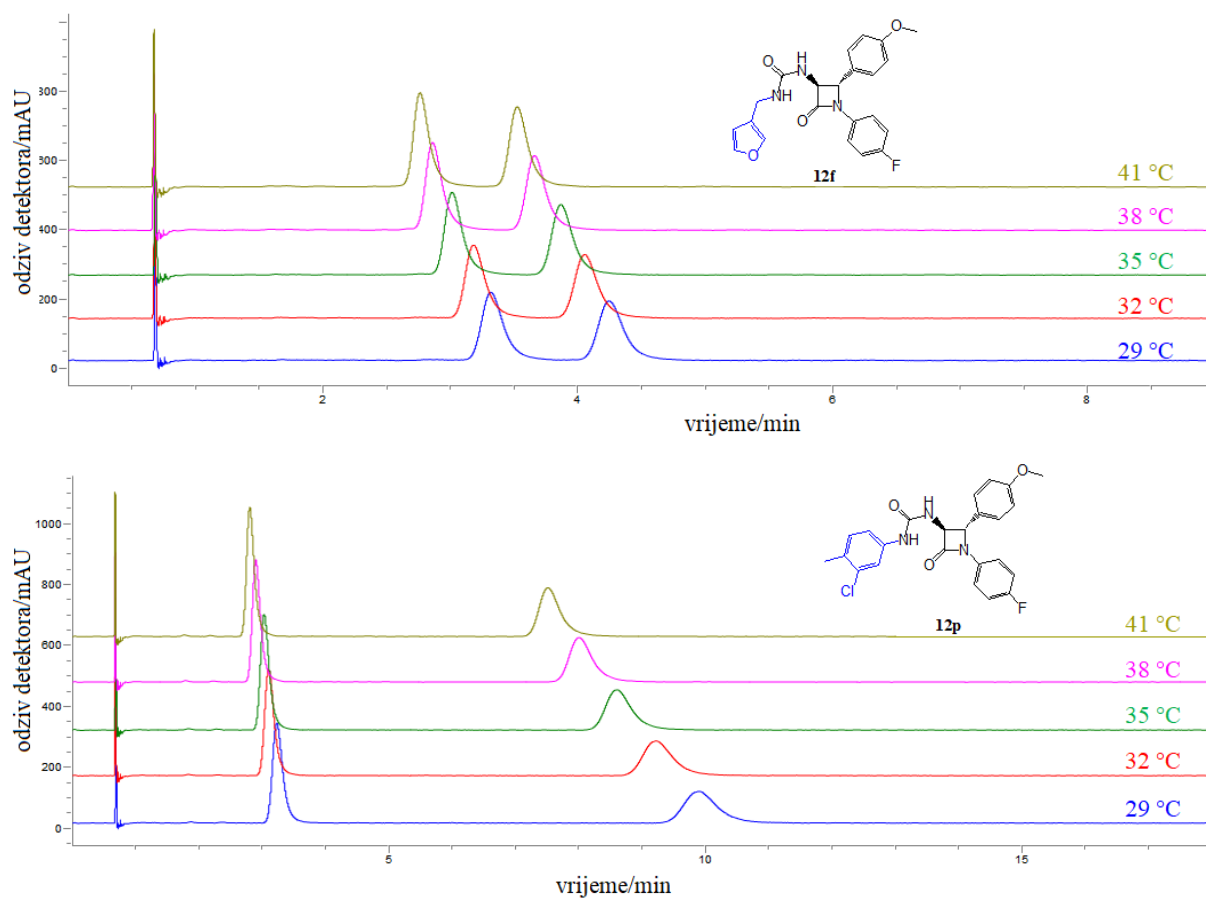
Pravac $\ln \alpha$ u funkciji $1/T$ omogućuje računanje vrijednosti razlike entalpije prijenosa iz vrijednosti nagiba ($-\Delta\Delta H^\circ/R$) i entropije prijenosa iz vrijednosti odsjeka ($\Delta\Delta S^\circ/R$). Uočava se da ovisnost $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ nije linearna za spojeve **12a**, **12f-h**, **12l-n** i **12s-v** i da se vrijednost koeficijena korelacije R^2 kreće u rasponu od 0,002 do 0,74, Slika P2.11-P2.13 i Tablica P2.5 u *Prilogu 2*. Ovisnost $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ je linearna za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12b-e**, **12i-k** i **12o-r**. Vrijednosti entalpije $\Delta\Delta H^\circ$ prijenosa izračunate su iz vrijednosti nagiba ($-\Delta\Delta H^\circ/R$), a vrijednosti entropija prijenosa iz vrijednosti odsjeka ($\Delta\Delta S^\circ/R$). Dok su termodinamički parametri $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ za spojeve **12f-h**, **12n** i **12v** izračunati iz razlike $\Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$, odnosno $\Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$.

Iz Slika P2.11-P2.13 u *Prilogu 2*. je vidljivo da se povećanjem $1/T$ blago povećava $\ln \alpha$ -vrijednost za spojeve **12b-e**, **12i-k** **12o** i **12r**, a da se smanjuje za spoj **12p**. Ovi spojevi pokazuju dobru linearnost ($R^2 \geq 0,90$), što ukazuje da se mehanizam odvajanja enantiomera spojeva **12b-e**, **12i-k** i **12o-r** nije mijenjao u ispitivanom temperaturnom intervalu.

Izoenantioselektivne temperature T_{iso} spojeva izračunate su iz omjera termodinamičkih parametra $\Delta\Delta H^\circ/\Delta\Delta S^\circ$, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici P2.5 u *Prilogu 2*. Vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ enantiomera spojeva **12b-e**, **12i-k**, **12o** i **12r** su negativne na svakoj od ispitivanih temperatura, a apsolutna vrijednost $\Delta\Delta S^\circ/R$ je manja od vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ/RT$. Iz čega se može utvrditi da je mehanizam kiralnog prepoznavanja enantiomera gore navedenih spojeva bio entalpijski vođen proces. Vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ$ za gore navedene spojeve variraju u intervalu od -9,94 do -4,36 kJ/mol. Negativne $\Delta\Delta H^\circ$ vrijednosti ukazuju na egzotermni prijenos adsorbiranog enantiomera iz pokretne na nepokretnu fazu, dakle radi se o povoljnom procesu. S druge strane, negativne vrijednosti entropije, koje su određene u ovom radu, mogu se protumačiti kao povećanje reda i/ili gubitak broja stupnjeva slobode uslijed adsorpcije enantiomera analita na kiralni selektor. Iz iste je tablice vidljivo da je izoenantioselektivna temperatura T_{iso} enantiomera spojeva **12b-e**, **12i-k**, **12o** i **12r** znatno veća od najviše testirane temperature kolone (41 °C). Najviša opažena T_{iso} -vrijednost iznosi 319,2 °C, odnosno 592,4 K,

za spoj **12o** s 4-*tert*-butilfenilnom skupinom. Uočava se da spojevi **12d** i **12j** imaju najniže T_{iso} -vrijednosti (141,9 °C, tj. 415,0 K). Nadalje, uočava se da su vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ$ i $\Delta\Delta S^\circ$ za spoj **12p** pozitivne, a apsolutna vrijednost $\Delta\Delta S^\circ/R$ je veća od vrijednosti $\Delta\Delta H^\circ/RT$. Pozitivna vrijednost entalpije za spoj **12p** ukazuje da se radi o endotermnom prijenosu enantiomera iz pokretne na nepokretnu fazu, a pozitivna vrijednost entropije ukazuje na povećanje nereda i/ili povećanje stupnjeva slobode uslijed adsorpcije enantiomera analita na kiralni selektor.

Na temelju rezultata dobivenih ispitivanjem temperature kolone utvrđeno je, da je utjecaj temperature kolone na vrijeme zadržavanja enantiomera, separacijski faktor i razlučivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 nepredvidiv te da ovisi o supstituentu vezanom na N-atom ureido grupe. Strukture ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea očito imaju jak utjecaj na termodinamiku enantioselektivne adsorpcije analita na kiralni selektor kolone Chirallica PST-10. Slika 43 prikazuje utjecaj temperature (29, 32, 35, 38 i 41 °C) kolone na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12f** i **12p** na koloni Chirallica PST-10 uz pokretnu fazu CO₂/MeOH (70:30, v/v).



Slika 43. Utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera spojeva **12f** i **12p** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza CO₂/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, povratni tlak 11 MPa, temperatura kolone 29, 32, 35, 38 i 41 °C

4.6.2.5. Utjecaj povratnog tlaka na enantioseparaciju ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v**

Nadalje, u ovom radu ispitan je utjecaj povratnog tlaka na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v**.²¹⁵ Tlak se kretao u rasponu od 11 do 15 MPa. Ispitivanje je provedeno na koloni Chirallica PST-10 uz pokretnu fazu CO₂/MeOH (70:30, v/v), uz protok od 4 mL min⁻¹ i temperaturu kolone od 35 °C. Rezultati odjeljivanja enantiomera spojeva **12a-v** prikazani su u Tablici P2.6 u *Prilogu 2*. Iz rezultata je vidljivo da se vrijednosti faktora zadržavanja k_1 i k_2 za većinu ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** smanjuju povećanjem povratnog tlaka u sustavu. To ukazuje da se povećanjem povratnog tlaka u sustavu enantiomeri spojeva **12a-v** kraće zadržavaju na koloni Chirallica PST-10, jer se brzina eluiranja povećava s povećanjem tlaka. Povećanje povratnog tlaka u sustavu uzrokovalo je povećanje gustoće pokretne faze, kao i povećanje sposobnosti solvatacije, što je dovelo do bržeg eluiranja enantiomera s kolone. Pri ispitivanim povratnim tlakovima vrijednost separacijskog faktora α i razlučivanja enantiomera R_s blago se mijenjaju.

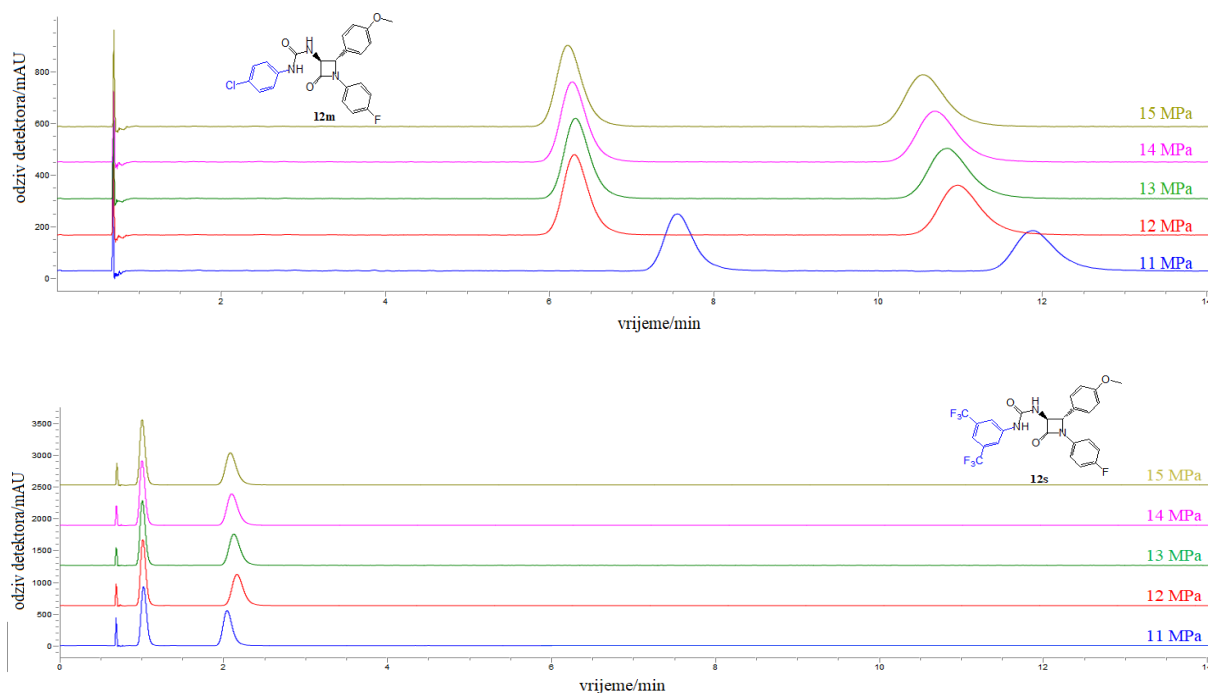
Slika P2.14 u *Prilogu 2* prikazuje usporedbu faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretnu fazu te povratni tlak u rasponu od 11 do 15 MPa. Enantiomeri spoja **12j** s benzoilnom skupinom najdulje se zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom. Nadalje, enantiomeri spojeva **12s**, **12t** i **12u** se kraće zadržavaju u kontaktu sa selektorom kolone Chirallica PST-10 u odnosu na ostale ispitivane spojeve. Izopropilne skupine (spoj **12u**) prostorno su velike i sterički ometaju interakciju NH-skupine s C=O skupinom selektora. Metilne skupine prostorno su manje, ali nalaze se u blizini NH-skupine i vjerojatno ometaju interakcije.

Slika P2.15 u *Prilogu 2* prikazuje usporedbu separacijskih faktora enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz povratni tlak od 11 do 15 MPa. Uočava se da separacijski faktor ostaje gotovo nepromijenjen povećanjem povratnog tlaka u sustavu. Najbolje enantioselektivno prepoznavanje pokazuju enantiomeri spoja **12s** s 3,5-bis(trifluorometil)fenilnom skupinom. Enantiomeri spoja **12j** s benzoilnom grupom na dušikovom atomu ureido skupine najdulje se zadržavaju u kontaktu s nepokretnom fazom, ali moguće da zbog nepravilnog smještanja enantiomera u kiralnu šupljinu, ostvaruju niži stupanj enantioprepoznavanja. Usporedbom separacijskih faktora enantiomera analiziranih ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** uočava se da najlošije enantioprepoznavanje ($\alpha \sim 1,35$) ostvaruju enantiomeri spoja **12f** s furfurilnom skupinom.

Slika P2.16 u *Prilogu 2* prikazuje usporedbu razlučivanja enantiomera ($\pm$)-trans- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 uz povratni tlak od 11 do 15 MPa. Uočava

se da se povećanjem povratnog tlaka smanjuje razlučivanje enantiomera spojeva **12k** i **12t**, dok kod ostalih spojeva nema pravilnosti. Nadalje, uočava se da enantiomeri većine ispitivanih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea postiže najveću R_s -vrijednost, tj. najbolje razdvajanje enantiomera, uz povratni tlak od 11 MPa.

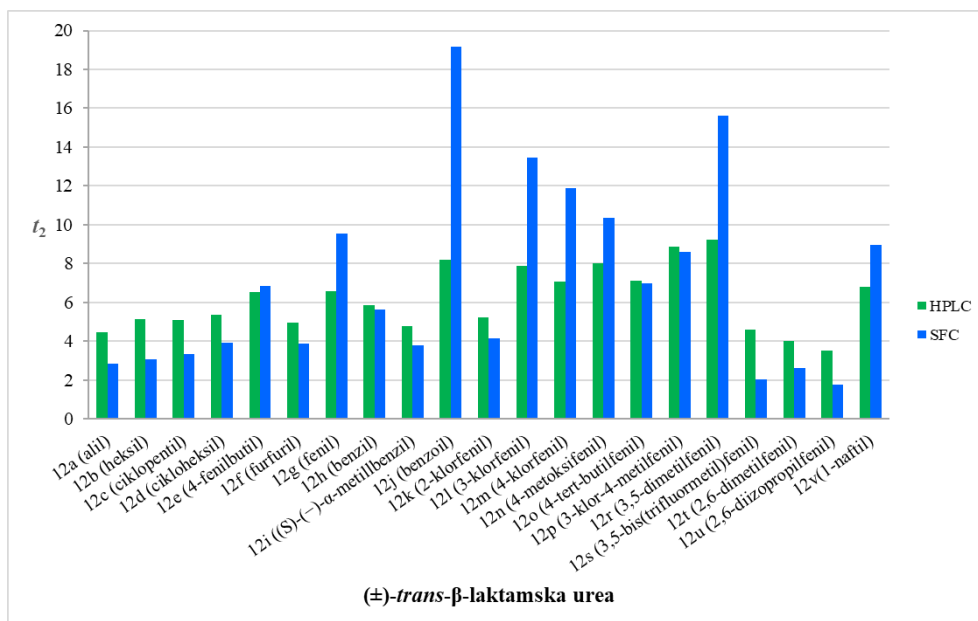
Na Slici 44 prikazani su SFC kromatogrami spoja **12m** i **12s** primjenom kolone Chirallica PST-10 uz CO₂/MeOH kao pokretnu fazu te povratni tlak od 11 do 15 MPa.



Slika 44. Odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12m** i **12s** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: mobilna faza CO₂/MeOH (70/30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 do 15 MPa

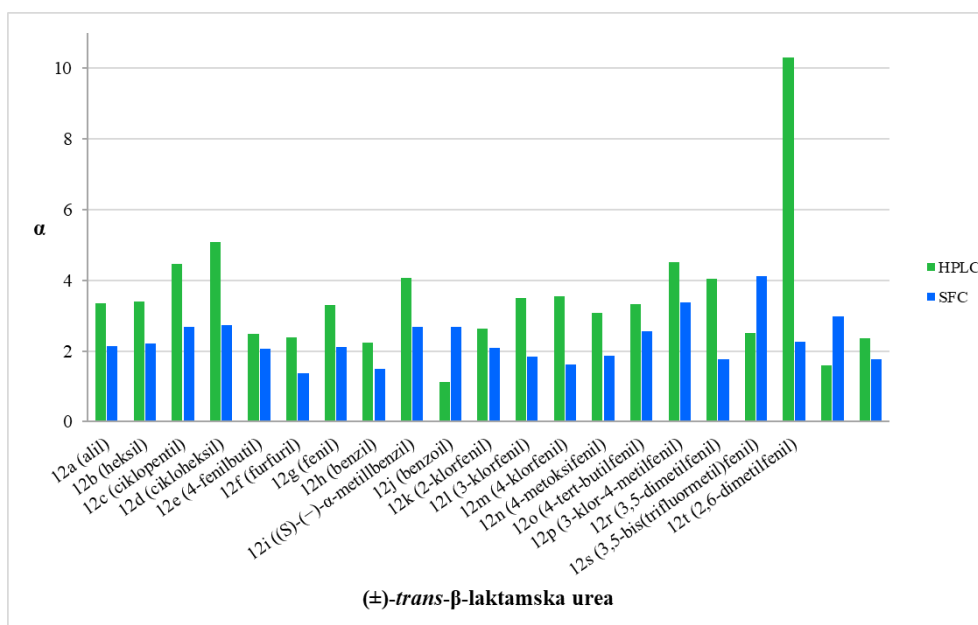
4.6.3. Usporedba HPLC i SFC enantioseparacije ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

U ovom dijelu rada uspoređeni su rezultati odjeljivanja enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz metanol kao pokretnu fazu te primjenom superkritične fluidne kromatografije uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) kao pokretne faze. Usporedbom vremena zadržavanja drugoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea na koloni Chirallica PST-10, može se uočiti da se enantiomeri 13 od ukupno 21 ispitivanog spoja kraće zadržavaju na koloni primjenom SFC uz CO₂/MeOH (70:30, v/v) pokretnu fazu nego primjenom HPLC uz metanol kao pokretnu fazu, Slika 45.

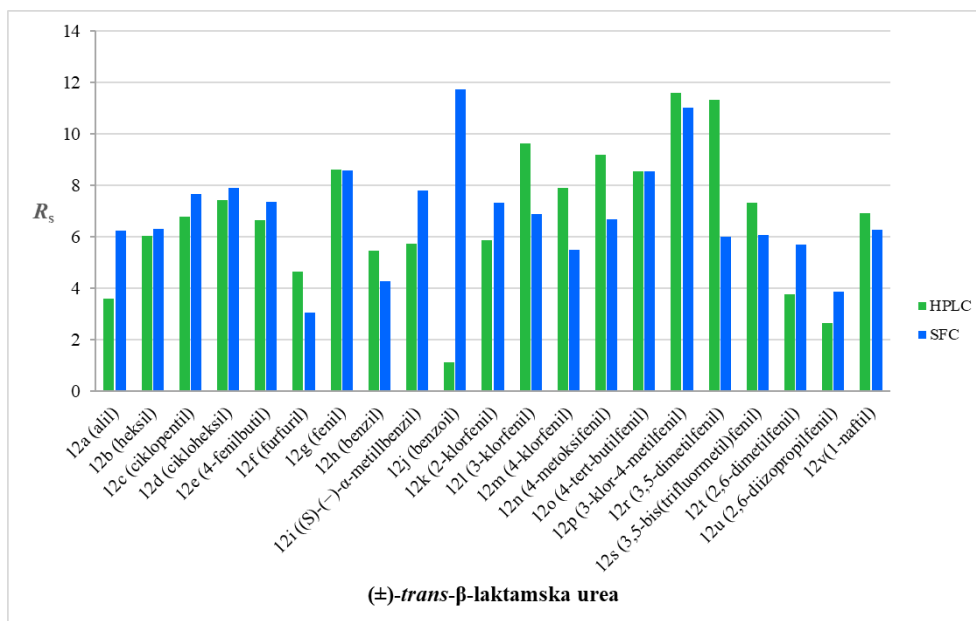


Slika 45. Usporedba vremena zadržavanja drugoizlazećih enantiomera spojeva **12a-v** primjenom HPLC-a i SFC-a

Usporedbom separacijskih faktora spojeva **12a-v**, pri odabranim pokretnim fazama, uočava se da je enantioselektivnost ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea na koloni Chirallica PST-10, dobivena primjenom HPLC-a bolja u odnosu na enantioselektivnost dobivenu primjenom SFC, Slika 46. Razlog tome može biti da metanol mijenja tercijarnu strukturu nepokretne faze što omogućava bolje kiralno prepoznavanje analita i selektora nepokretne faze.



Slika 46. Usporedba separacijskih faktora α enantiomera spojeva **12a-v** primjenom HPLC-a i SFC-a



Slika 47. Usporedba razlučivanja R_s enantiomera spojeva **12a-v** primjenom HPLC-a i SFC-a

Usporedbom razlučivanja enantiomera spojeva **12a-v**, uočava se izvrsno razlučivanje ($R_s > 2,0$) ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea neovisno o primjenjenoj pokretnoj fazi, s izuzetkom enantiomera spoja **10** s benzoilnom skupinom koji se tek djelomično odvajaju uz metanol kao pokretnu fazu, Slika 47.

SFC metoda pokazala je da se enantiomeri 13 ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea kraće zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom kolone Chirallica PST-10, te da je razlučivanje 11 spojeva bolje u odnosu na HPLC metodu. No, kiralno prepoznavanje je znatno bolje uz metanol nego uz CO_2/MeOH (70:30, v/v). Iz dobivenih podataka može se zaključiti da kiralno prepoznavanje ovisi o vrsti pokretne faze i vrsti supstituenta na N1-atomu ureido skupine ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea.

4.6.4. Enantioseparacija ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti ispitano je odjeljivanje enantiomera *syn*-**13a-i** i *anti*-3,5-disupstituiranih hidantoina **14a-i** na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama s adsorbiranim i imobiliziranim selektorom, tj. na 3,5-dimetilfenilkarbamoi amiloznoj nepokretoj fazi (Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA), te na 3,5-dimetilfenilkarbamoi celuloznoj nepokretoj fazi (Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB). Analizirani spojevi razlikuju se samo po supstituentu na N-3 položaju hidantoinskog prstena. Ovaj dio istraživanja trebao bi dati odgovor koji je kiralni selektor najpogodniji za ovaj tip spojeva.

Rezultati kiralnog razdvajanja 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** navedeni su u Tablici P3.1 u *Prilogu 3*. Za svaki su spoj navedene vrijednosti retencijskog vremena t_R , faktora zadržavanja k , faktora odjeljivanja α te razlučivanje R_s postignute na pojedinoj koloni uz heksan/propan-2-ol kao pokretnu fazu. Protok pokretne faze je bio $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ s UV detekcijom pri 254 nm.

Na temelju podataka prikazanih u Tablici P3.1 u *Prilogu 3*, vidljivo je da se na koloni Chiralpak AD-3 uz visoke vrijednosti separacijskog faktora, ističu i iznimno visoke vrijednosti faktora razdvajanja enantiomera većine analiziranih 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**. Na ovoj koloni najbolje se razdvajaju enantiomeri 13 od ukupno 18 testiranih spojeva. Enantiomeri spojeva **13i** se samo djelomično odjeljuju na koloni Chiralpak AD-3, dok se enantiomeri spoja **13e** uopće ne odjeljuju na ovoj koloni. Enantiomeri spoja s furfurilnom skupinom **13d** na N-3 položaju hidantoinskog prstena najbolje se razdvajaju na koloni Chiralcel OD-3, međutim najbolje enantioprepoznavanje enantiomera ostvaruju na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3. Enantiomeri spojeva **13f**, **14f**, **14g** i **14h** dulje se zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom kolone Chiralpak IA u odnosu na kolonu Chiralpak AD-3, pri tome postižu i viši stupanj enantioselektivnosti, ali bolje razlučivanje enantiomera postiže se na koloni Chiralpak AD-3. Stoga se može zaključiti da promjena više strukture amiloznog kiralnog selektora uslijed njegove imobilizacije pogoduje kiralnom prepoznavanju, ali ne i razdvajanju enantiomera spoja **13f**, **14f**, **14g** i **14h**. Za spojeve **13e**, **13i** i **14i**, enantioselektivnost i razlučivanje na koloni Chiralpak IA bolji su u odnosu na kolonu Chiralpak AD-3, što upućuje da utjecaj imobilizacije kiralnog selektora na njegovu višu strukturu pogoduje kiralnom prepoznavanju i razdvajanju enantiomera spojeva **13e**, **13i** i **14i**.

Zamjena amilozne jedinice s celuloznom nije doprinjela boljem odjeljivanju enantiomera testiranih 3,5-disupstituiranih hidantoina. Jedino u slučaju spojeva **15d** i **15e** zamjena amilozne jedinice s celuloznom doprinosi boljem razlučivanju enantiomera. Međutim, enantioselektivnost spoja **15d** je bolja na koloni Chiralpak AD-3 u odnosu na kolonu Chiralcel OD-3. Enantiomeri spojeva **13f**, **13i**, **14f** i **14i** se uopće ne odjeljuju na celuloznoj koloni Chiralcel OD-3. Kod spojeva **13f**, **13i**, **14f**, **14g** i **14i** zamjena adsorbirane s imobiliziranom celuloznom nepokretnom fazom rezultira boljim kiralnim prepoznavanjem i boljim odjeljivanjem enantiomera navedenih spojeva. Imobilizacija kiralnog selektora na celuloznoj kiralnoj nepokretnoj fazi pogoduje razdvajanju enantiomera spoja **14h**, ali enantioprepoznavanje je nešto bolje na koloni Chiralcel OD-3 u odnosu na kolonu Chiralpak IB. Nadalje, iz Tablice P3.1 u *Prilogu 3* vidljivo je da zamjena adsorbirane (Chiralcel OD-3) s

imobiliziranom celuloznom kiralnom nepokretnom fazom rezultira slabijim kiralnim prepoznavanjem i razlučivanjem enantiomera spojeva **13a-e**, **13g**, **13i**, **14a-e**.

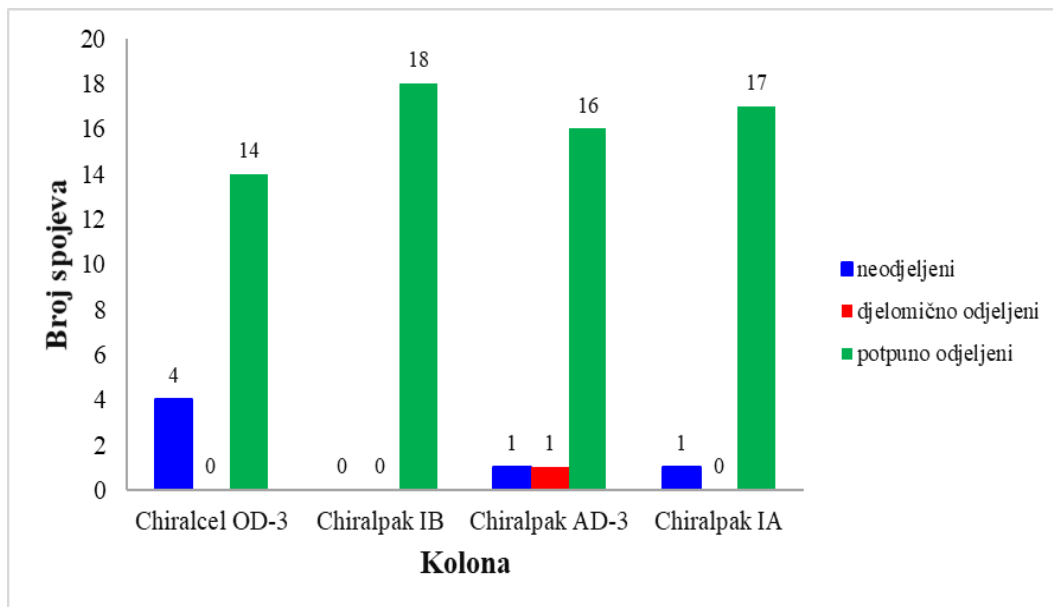
Usporedbom faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** na amiloznim i celuloznim kiralnim nepokretnim fazama primjenom heksan/propan-2-ol (9:1, v/v) kao pokretne faze, uočava se da se enantiomeri spojeva **13c**, **13g** i **13i** najdulje zadržavaju na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3, Slika P3.1 u *Prilogu 3*. Enantiomeri spojeva **13d** i **13f** najdulje zadržavaju na koloni Chiralpak IB, dok se enantiomeri spojeva preostalih hidantoina najdulje zadržavaju na koloni Chiralcel OD-3. Enantiomeri većine analiziranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** najkraće se zadržavaju na amiloznoj koloni Chiralpak IA. Uz izuzetak enantiomera spojeva **13d**, **14a**, **14b** i **14f** i koji se najdulje zadržava u kontaktu s nepokretnom fazom kolone Chiralpak AD-3, enantiomera spoja **13c** koji se najkraće zadržava na koloni Chiralpak IB te enantiomera spoja **13i** koji se najkraće zadržava na koloni Chiralcel OD-3.

Usporedbom separacijskih faktora ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, vidljivo je da enantiomeri spojeva **13a**, **13b**, **13c** i **13h** postižu visoki stupanj enantioprepoznavanja ($\alpha > 4,0$) na koloni Chiralpak AD-3, Slika P3.2 u *Prilogu 3*. Na koloni Chiralcel OD-3 u potpunosti izostaje kiralno prepoznavanje hidantoina **13f** i **14f** s 4-*tert*-butilfenilnom skupinom te hidantoina **13i** i **14i** 2,6-dimetilfenilnom skupinom. Na koloni Chiralpak AD-3 izostaje enantioprepoznavanje spoja **13e** benzilnom skupinom na N-3 položaju hidantoinanskog prstena, a na njenoj imobiliziranoj inačici izostaje kiralno prepoznavanje enantiomera **13d** s furfurilnom skupinom na N-3 položaju.

Usporedba razlučivanja enantiomera, kao mjere djelotvornosti odvajanja enantiomera, ističu se vrijednosti razlučivanja većine analiziranih enantiomera ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina na koloni Chiralpak AD-3, a enantiomeri spojeva **13e**, **13g** i **14i** najbolje razlučivanje postiže na njenoj imobiliziranoj inačici, odnosno na koloni Chiralpak IA, Slika P3.3. u *Prilogu 3*. Enantiomeri spoja **13d** najbolje razlučivanje postižu na koloni Chiralcel OD-3, a enantiomeri spoja **13i** na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IB. Nadalje, uočava se da se enantiomeri spojeva **13f** i **14f** s 4-*tert*-butilfenilnom skupinom te **13i** i **14i** s 2,6-dimetilfenilnom skupinom uopće ne odjeljuju na koloni Chiralcel OD-3. Na koloni Chiralpak AD-3 ne odjeljuju se enantiomeri spoja **13e** s benzilnom skupinom, dok se na njenoj inačici koloni Chiralpak IA ne odjeljuju enantiomeri spoja **13d** s furfurilnom skupinom na N-3 položaju hidantoinanskog prstena.

Rezultati kromatografskog razdvajanja 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama uz heksan/propan-2-ol (9:1, v/v) kao

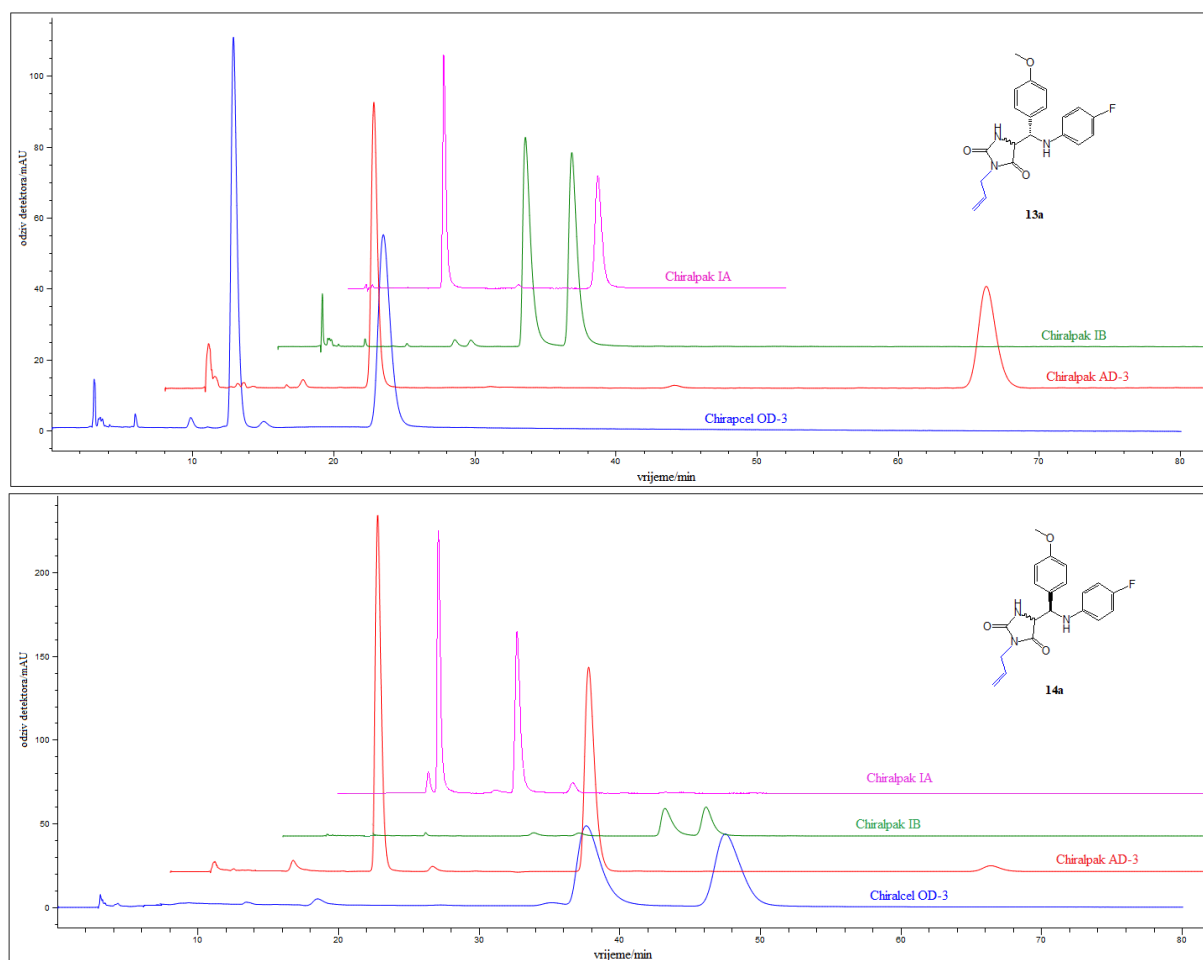
pokretnu fazu prikazani su u Tablice P3.1 u *Prilogu 3*, a broj kiralnih spojeva koji se ne odjeljuje, djelomično odjeljuje i potpuno odjeljuje (odjeljuje do osnovne linije) su prebrojani i prikazani na Slici 48.



Slika 48. Ukupni broj neodjeljenih, djelomično odjeljenih i potpuno odjeljenih (do osnovne linije) ($\pm$)-hidantoina **13a-i** i **14a-i** na četiri polisaharidne kiralne nepokretne faze utemeljene na derivatima amiloze (Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA) i celuloze (Chiralcel OD-3 i Chiralpak IB)

Iz prikaza je vidljivo da se na imobiliziranoj celuloznoj koloni Chiralpak IB do osnovne linije odjeljuju enantiomeri svih analiziranih ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina. No, na njenoj adsorbiranoj inačici, koloni Chiralcel OD-3, potpuno se odjeljuje 14 hidantoina, a enantiomeri spojeva **15f**, **15i**, **16f** i **16i** se uopće ne odjeljuju na ovoj koloni. Nadalje, na koloni Chiralpak IA potpuno se odjeljuje 17 od ukupno 18 testiranih 3,5-disupstituiranih hidantoina, dok se na njenoj adsorbiranoj inačici do osnovne linije odjeljuje 16 spojeva. Imobilizacija amilozne kiralne nepokretne faze pogoduje razdvajanju enantiomera **13e**.

Na Slici 49 prikazan je utjecaj vrste kiralnih nepokretnih faza na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a** i **14a** uz heksan/propan-2-ol (9:1, v/v) kao pokretnu fazu.



Slika 49. RP-HPLC enantioseparacija hidantoina **13a** i **14a** s alilnim supstutentom na N-3 položaju hidantoiniskog prstena na četiri polisaharidne kolone (Chiralcel OD-3, Chiralpak AD-3, Chiralpak IA i Chiralpak IB). Kromatografski uvjeti: pokretna faza heksan/propan-2-ol (9:1, v/v), protok 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 30 °C, UV detekcija 254 nm

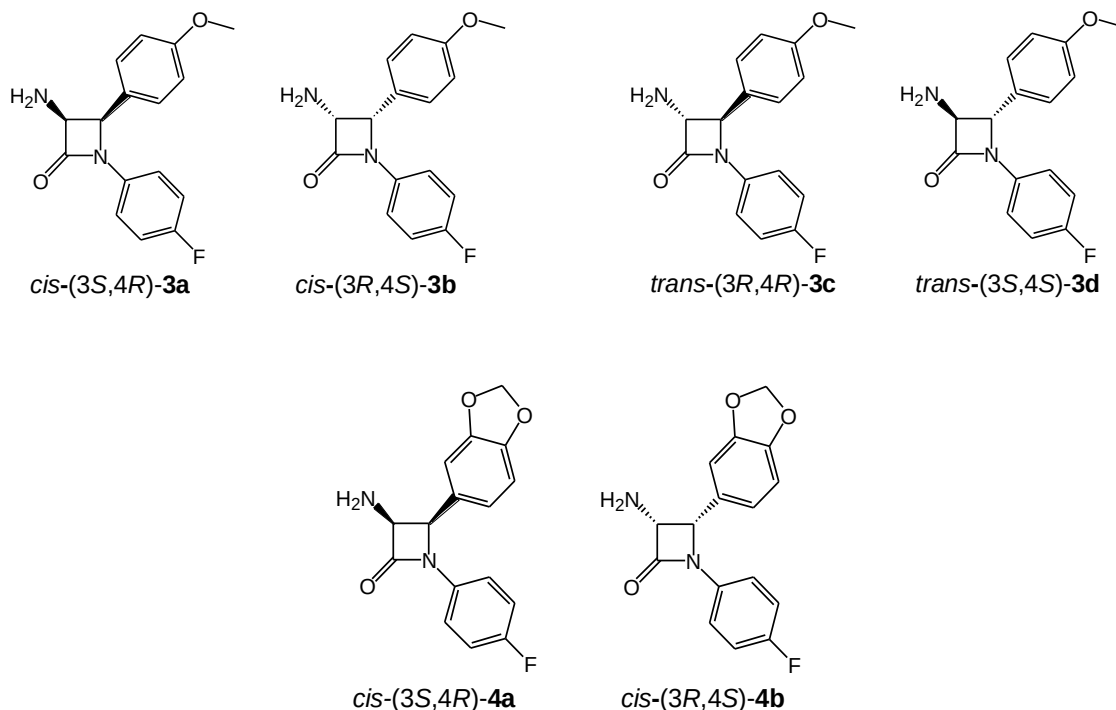
4.7. Određivanje apsolutne konfiguracije

4.7.1. Apsolutna konfiguracija 3-amino-β-laktama

S ciljem određivanja apsolutne konfiguracije *cis*-3-amino-β-laktama **3** i **4**, Slika 50, mala količina spojeva odijeljena je upotrebom HPLC-a koristeći kolone s kiralnim punilom. Za odijeljivanje enantiomera *cis*-**3** korištena je kolona Chirallica PST-2, a za odijeljivanje enantiomera spoja *cis*-**4** kolona Chirallica PST-1. Odijeljivanje enantiomera obaju spojeva provedeno je uz MeOH/H₂O (70:30, v/v) kao pokretnu fazu, protok od 1 mL min⁻¹ i s UV detekcijom pri 254 nm.

Kako bi se odredile njihove apsolutne konfiguracije, primjenjena je metoda elektronskog cirkularnog dikroizma (ECD), pouzdana i učinkovita metoda za određivanje apsolutne

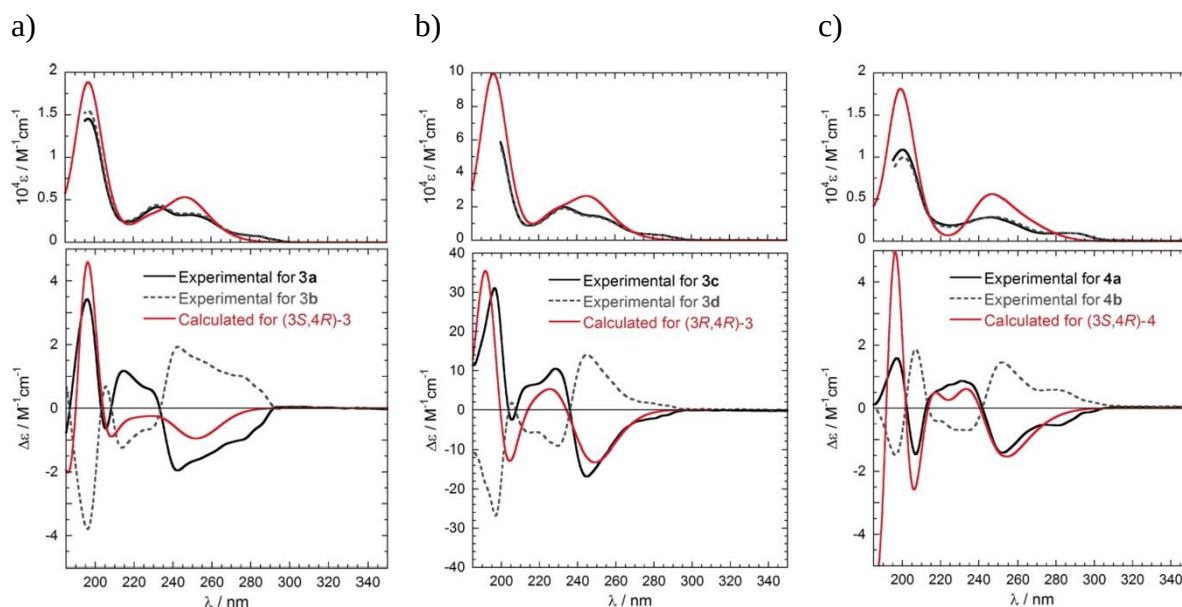
konfiguracije β -laktamskih spojeva.²²³ Apsolutna konfiguracija određena je usporedbom njihovih eksperimentalno određenih ECD krivulja s krivuljama izračunatim pomoću TDDFT matematičke metode.



Slika 50. 3-amino- β -laktami **3** i **4**

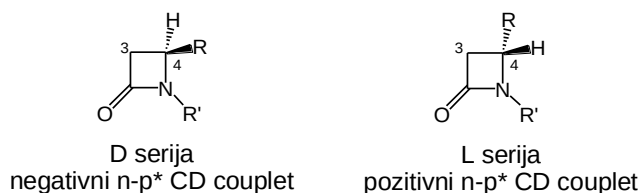
UV i ECD spektri spojeva **3a–d** i **4a,b** u acetonitrilu prikazani su na Slici 51a-c. Svi enantiomerni parovi, **3a/b**, **3c/d** i **4a/b**, pokazali su ECD krivulje poput zrcalne slike, što potvrđuje enantiomernu prirodu i čistoću analiziranih uzoraka. Još je zanimljivije da su ECD spektri spojeva **3a**, **3c** i **4a** u velikoj mjeri međusobno konzistentni, Slika 51a-c. Slično tome, spektri za spojeve **3b**, **3d** i **4b** također su konzistentni, Slika 51a-c. Spojevi **3a**, **3c** i **4a** pokazuju ECD spektre s relativno intenzivnom i širokom, negativnom ECD vrpcom između 240-260 nm s ramenom (260-280 nm) istog predznaka, slabija pozitivna ECD vrpca između 210-240 nm, s ramenom istog predznaka te negativni maksimum između 205-210 nm, što je vrlo slabo vidljivo kod spojeva **3a** i **3c**, a intenzivnije kod spoja **4a**, i na kraju pozitivna ECD vrpca ispod 200 nm. Slijed ECD vrpce uključujući i ramena (u zagradama) za seriju spojeva **3a**, **3c** i **4a**, počevši od dužih valnih duljina, je (–)/+(+)/–/+. Za enantiomerne serije spojeva **3b**, **3d** i **4b**, slijed znakova je obrnut. Svi su ECD spektri relativno slabi, međutim, spoj *trans*-**3** ima jače ECD signale od spojeva *cis*-**3** i *cis*-**4** u cijelom rasponu valnih duljina u ispitivanju. Oba su zapažanja

u skladu s literaturnim podacima za β -laktame s aromatskim supstytutentima na N-1 i C-4 atomima β -laktamskog prstena.^{224,225}

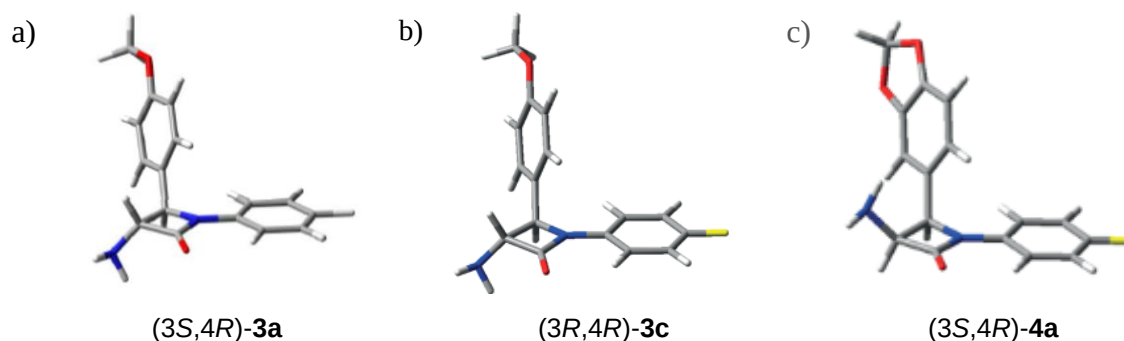


Slika 51. Eksperimentalni UV spektri (gore) i ECD spektri (dolje) 3-amino- β -laktama: a) **3a** (pune linije) i **3b** (isprekidane crte), b) **3c** (pune linije) i **3d** (isprekidane crte) i c) **4a** (pune linije) i **4b** (isprekidane crte) snimljeni u acetonitrilu, i izračunati UV i ECD spektri modelnih molekula: a) (3*S*,4*R*)-**3**, b) (3*R*,4*R*)-**3** i c) (3*S*,4*R*)-**4** na CAM-B3LYP/def2-TZVP// ω B97X-D/6-311+G (d,p) razini u acetonitrilu s PCM modelom solvatacije.

Spojevi **3a**, **3c** i **4a** imaju jednaku konfiguraciju na C-4 atomu, a spojevi **3a** i **3c** su epimeri na C-3 atomu. ECD vrpca od 240-260 nm uzeta je kao dijagnostički signal. Iz Slike 51 je vidljivo da spojevi **3a**, **3c** i **4a** imaju negativnu dijagnostičku vrpcu te ovi spojevi pripadaju D seriji. Apsolutna konfiguracija na C-4 atomu ovih spojeva je dodjeljena kao (*R*). Konačno, ovi spojevi su određeni kao (3*S*,4*R*)-**3a**, (3*R*,4*R*)-**3c** i (3*S*,4*R*)-**4a**. Suprotno tome, spojevi **3b**, **3d** i **4b** imaju pozitivnu dijagnostičku ECD vrpcu i pripadaju L seriji, Slika 52. Njihova apsolutna konfiguracija na C-4 je (*S*), to jest određeni su kao (3*R*,4*S*)-**3b**, (3*S*,4*S*)-**3d** i (3*R*,4*S*)-**4b**. Frelek i suradnici su predložili oznaku L/D, čime se izbjegava nedostatak općenitosti (*R*)/(*S*) oznaka.^{224,226}

Slika 52. D i L serija β -laktama

Za DFT i TDDFT izračune uzeti su u obzir β -laktami (3*S*,4*R*)-**3a**, (3*R*,4*R*)-**3c** i (3*S*,4*R*)-**4a**. Konformacijska pretraživanja za spojeve **3** i **4** provedena su u Spartan'14 korištenjem izračuna sile polja molekularne mehanike MMFF (engl. *Molecular Merck Force Field*, MMFF) pomoću Monte Carlo algoritama.²²⁷ Svi minimumi dobiveni MMFF-om optimizirani su u vakuumu na DFT višim razinama teorije korištenjem funkcionala, ω B97X-D,²²⁸ i dva osnovna skupa 6-31G(d) i 6-311+G(d,p). Rezultati su pokazali šest najnižih energetske konformera za spojeve **3a**, **3c** i **4a**, a na Slici 53 prikazani su njihovi konformeri najniže energije. Nakon toga, svi konformeri su ponovno optimizirani TDDFT metodama na višim razinama teorije korištenjem pet različitih funkcionala B3LYP,²²⁹ CAM-B3LYP,²³⁰ PBE0,²³¹ M06-2X,²³² i ω B97X-D,²³³ i dva osnovna skupa def2-SVP i def2-TZVP pomoću Gaussian 09²³⁴ programskog paketa.

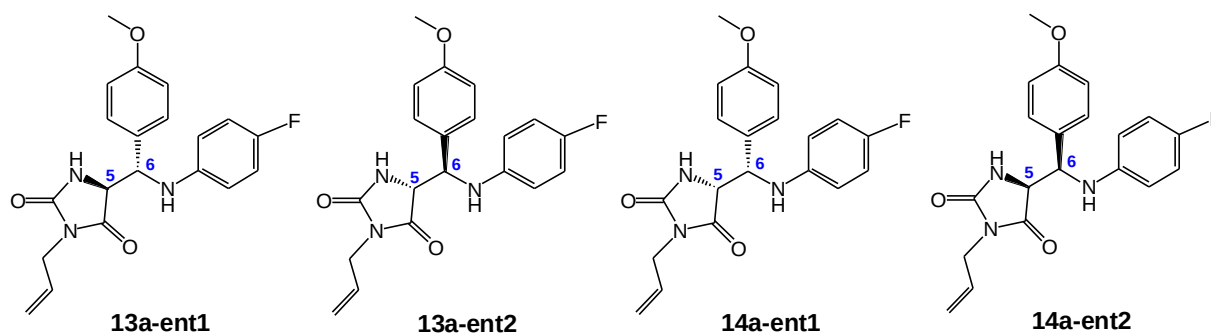
Slika 53. Strukture s najnižom energijom za spoj: a) (3*S*,4*R*)-**3a**, b) (3*R*,4*R*)-**3c** i c) (3*S*,4*R*)-**4a** izračunate pomoću TDDFT metodologije na ω B97-D/6-311+G(d,p) razini

Korištenjem TDDFT metode na razini CAM-B3LYP/def2-TZVP// ω B97X-D/6-311+G (d,p) u acetonitrilu s PCM²³⁵ modelom solvatacije, ukupni izračunati ECD spektri od (3*S*,4*R*)-**3a**, (3*R*,4*R*)-**3c** i (3*S*,4*R*)-**4a** generirani su Boltzmannovim ponderiranjem. Ukupni obrasci izračunatih ECD spektra od (3*S*,4*R*)-**3** bili su u skladu s eksperimentalnim podacima za **3a** u cijelom rasponu valnih duljina u ispitivanju, Slika 51. Tako je struktura **3a** označena kao (3*S*,4*R*)-**3a**. Kao što je prikazano na Slici 51, predviđena ECD krivulja za enantiomer (3*R*,4*R*)-**3** dobro se podudara s izmjerenim ECD spektrom od **3c**, što ukazuje da su apsolutne

konfiguracije C-3 i C-4 u **3c** dodijeljene kao *3R,4R*. Nadalje, eksperimentalni ECD spektar od **4a** bio je u skladu s onim (*3S,4R*)-**4** (Slika 51), što upućuje na to da je apsolutna konfiguracija **4a** ista kao i (*3S,4R*)-**4**. Stoga je apsolutna konfiguracija spoja **3b** određena kao (*3R,4S*)-**3b**, spoja **3d** kao (*3S,4S*)-**3d** i spoja **4b** kao (*3R,4S*)-**4b**. Rezultati apsolutne konfiguracije objavljeni su u radu T. Dražić, M. Roje, M. Jurin, G. Pescitelli, *Eur. J. Org. Chem.* **24** (2016) 4189-4199.²⁰²

4.7.2. Apsolutna konfiguracija 3,5-disupstituiranih hidantoina

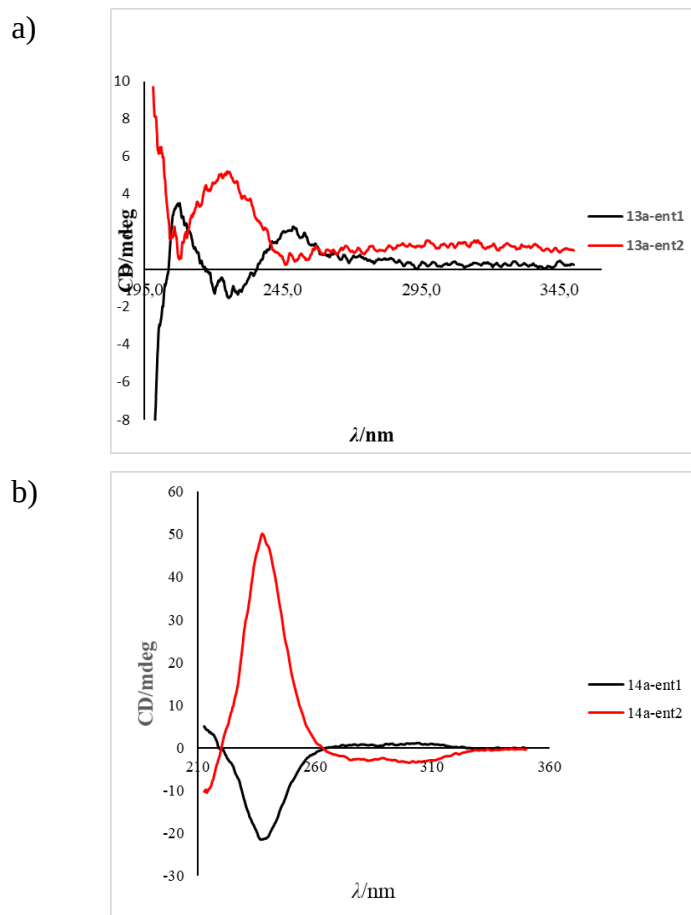
S ciljem određivanja apsolutne konfiguracije hidantoina **13a** i **14a** s alilnim supstutuentom na N-3 položaju hidantoininskog prstena, male količine spojeva **13a** i **14a** odijeljene su primjenom preparativne HPLC-kromatografije koristeći kolonu s kiralnim punilom. Za odijeljivanje enantiomera spojeva **13a** i **14a** korištena je semi-preparativna kolona Chiral Art Amylose-SA, (10 μ m, 250 mm x 8 mm) uz heksan/propan-2-ol (9:1, v/v) kao pokretnu fazu, uz protok od 5 mL min⁻¹ i s UV detekcijom pri 254 nm. Nakon odijeljivanja enatiomera spoja **13a** na kiralnoj koloni dobivena su dva enantiomera, označena kao **13-ent1** i **13a-ent2**. Isto tako, odijeljivanjem enantiomera spoja **14a** dobivena su dva enantiomera, označena kao **14a-ent1** i **14-ent2**. Na Slici 54 prikazana su četiri moguća enantiomera hidantoina **13** i **14** s alilnom skupinom.



Slika 54. Enantiomeri hidantoina **13** i **14**

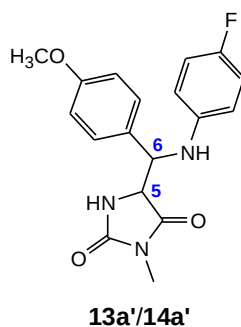
Kako bi se odredile njihove apsolutne konfiguracije, primjenjena je metoda elektronskog cirkularnog dikroizma. Usporedbom njihovih eksperimentalno određenih ECD krivulja s krivuljama izračunatim pomoću TDDFT matematičke metode pokušalo se odrediti apsolutnu konfiguraciju na stereogenom centru C-5 hidantoininskog prstena i na egzocikličkom stereogenom centru C-6.

ECD spektri spojeva **13a-ent1**, **13a-ent2**, **14a-ent1** i **14a-ent2** u acetonitrilu prikazani su na Slici 55. Svi enantiomerni parovi, **13a-ent1/ent2** i **14a-ent1/ent2**, pokazali su ECD krivulje poput zrcalne slike, što potvrđuje enantiomernu prirodu i čistoću analiziranih uzoraka. Spoj **13a-ent1** pokazuje ECD spektar sa slabom pozitivnom ECD vrpcom između 235–260 nm, s relativno intenzivnom i širokom negativnom ECD vrpcom između 215–235 nm, slabijom pozitivnom ECD vrpcom između 200–215 nm i na kraju negativnom ECD vrpcom ispod 200 nm, Slika 55. Slijed ECD vrpki za spoj **13a-ent1**, počevši od dužih valnih duljina je $+/-/+/-$, a za njegov enantiomer **13a-ent2** slijed znakova je obrnut. Spoj **14a-ent1** pokazuje ECD spektar sa slabom i širokom pozitivnom ECD vrpcom između 260–280 nm, negativnim maksimumom između 220–260 nm i na kraju pozitivnom ECD vrpcom ispod 220 nm. Slijed ECD vrpki za spoj **14a-ent1**, počevši od dužih valnih duljina je $+/-/+$, a za njegov enantiomer **14a-ent2** slijed znakova je obrnut.



Slika 55. Eksperimentalni ECD spektri hidantoina: a) **13a-ent1** (crna linija) i **13a-ent2** (crvena linija) i b) **14a-ent1** (crna linija) i **14a-ent2** (crvena linija) snimljeni u acetonitrilu

ECD spektri hidantoina **13a** i **14a** proučavani su teorijskim istraživanjima uz pomoć TDDFT matematičkih metode.^{237,238} U proračunima je korišten krnji model (**13a'**/**14a'**) reprezentativan za spojeve **13a/14a**, Slika 56. Razmatrana su dva diastereomera (5*R*,6*S*) i (5*S*,6*S*) spojeva **13a'** i **14a'**.



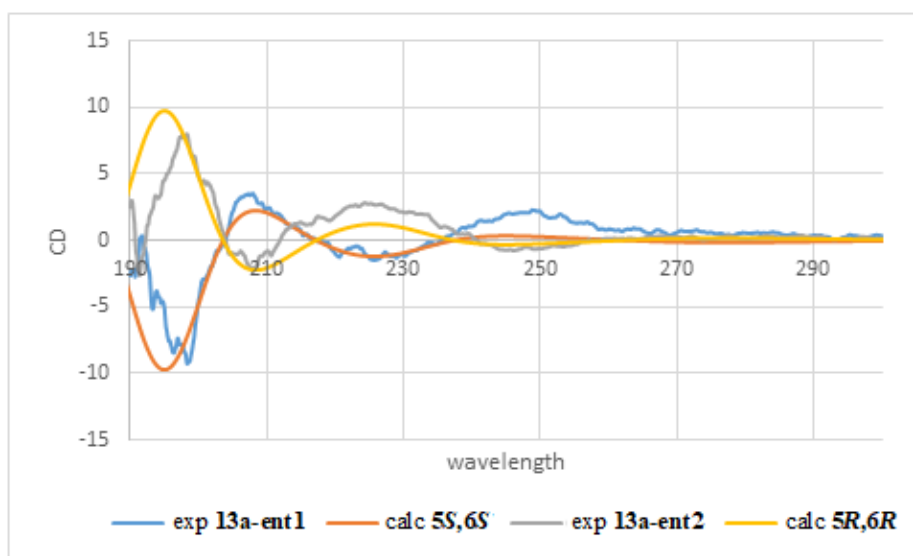
Slika 56. Modeli korišteni za TDDFT izračune

Molekularna mehanika i preliminarni DFT izračuni provedeni su na Spartan18 (Wavefunction, Inc.) pomoću Monte Carlo algoritama, sa standardnim parametrima i kriterijima konvergencije. Konformacijska pretraživanja pomoću molekularne mehanike provedena su u Spartan18 korištenjem izračuna sile polja molekularne mehanike pomoću Monte Carlo algoritama. Svi MMFF minimumi optimizirani su u vakuumu na DFT

razini, korištenjem funkcionala ω B97X-D/6-31G(d). Rezultati su pokazali više od dvadeset različitih konformera za svaki spoj s relativnom energijom unutar 4 kcal mol⁻¹. Nakon toga, svi konformeri su ponovno optimizirani korištenjem TDDFT metode na B3LYP/6-311+ G (d,p) razini u acetonitrilu sa SMD modelom solvatacije pomoću Gaussian 16 (Gaussian, Inc) programskog paketa. Rezultati su pokazali 6–10 najnižih energetske minimuma sa velikom populacijom na sobnoj temperaturi. Završni TDDFT proračuni provedeni su na razini CAM-B3LYP/def2-TZVP u acetonitrilu s IEFPCM modelom solvatacije. Konačni spektri spojeva generirani su Boltzmanovim pondiranjem na 300 K i prikazani su kao zbroj Gaussiana s najbolje prilagođenom širinom pojasa.

Na Slici 57 prikazana je usporedba eksperimentalnih ECD spektara spojeva **13a-ent1** i **13a-ent2** snimljenih u acetonitrilu i izračunatih ECD spektara modelnih molekula (5*S*,6*S*)- i (5*S*,6*R*)- na CAM-B3LYP/def2-TZVP// ω B97X-D/6-311+G (d,p) razini u acetonitrilu s PCM modelom solvatacije. Vidljivo je da postoji dobro slaganje između eksperimentalnog spektra za enantiomer **13a-ent1** i spektra izračunatog za (5*S*,6*S*) izomer u cijelom rasponu. Slično tome, spektar enantiomera **13a-ent2** poklapa se sa spektrom izračunatim za (5*S*,6*S*) izomer, Slika 57.

Međutim, u ovom slučaju uočena je dobra podudarnost između eksperimentalnog spektra za enantiomer **13a-ent1** i spektra izračunatog za (5*R*,6*S*) izomer. Stoga, možemo zaključiti da je CD analizom moguće odrediti apsolutnu konfiguraciju (*S*) na egzocikličkom stereogenom centru (C-6). Međutim, CD analiza nije u stanju razlikovati dva epimera u egzocikličkom stereogenom centru (C-5). Za nedvosmisleno određivanje apsolutne konfiguracije na oba kiralna centra potrebno je koristiti više kiroptičkih tehnika, tj. proširiti ovu studiju na vibracijski CD.^{239,240}



Slika 57. Eksperimentalni ECD spektari hidantoina: a) **13a-ent1** (plava linija) i b) **13a-ent2** (siva linija) snimljeni u acetonitrilu i izračunati ECD spektri modelnih molekula: a) (5*S*,6*S*)-**13a'** (narančasta linija) i b) (5*S*,6*R*)-**13b'** (žuta linija) na CAM-B3LYP/def2-TZVP//ωB97X-D/6-311+G (d,p) razini u acetonitrilu s PCM modelom solvatacije

4.8. Biološka ispitivanja *trans*-β-laktamskih urea **12a-v** i 3,5-disupstituirani hidantoini **13a-i** i **14a-i**

4.8.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti *trans*-β-laktamskih urea **12a-v**

Antimikrobno djelovanje *trans*-β-laktamskih urea **12a-v** ispitano je metodom mikrodilucije u skladu s CLSI smjernicama.^{161,163} Ispitivanje je provedeno na kontrolnim sojevima *Escherichia coli* NCTC 12241, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12903, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 90028 i *Saccharomyces cerevisiae* BY 4741. Metodom dvostrukog serijskog mikrorazrjeđenja u Müller-Hinton bujonu (za bakterijske sojeve) ili u YPD bujonu (za gljivice) postignut je raspon koncentracija *trans*-β-laktamskih urea **12a-v** od

128 – 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kojima su tretirani sojevi gore navedenih bakterija i gljivica. Rast mikroorganizama je detektiran vizualno, u obliku pojave zamućenja medija. Osim vizualne detekcije inhibicije rasta, MIC je određen i spektrofotometrijskim očitavanjem apsorbancije pri valnoj duljini od 600 nm nakon 0 i 20 sati za antibakterijsko djelovanje, a nakon 0 i 48 sati za antifungalno djelovanje. Najniža koncentracija kod koje je potpuno inhibiran rast smatra se MIC.² Rezultati testiranja pokazali su da *trans*- β -laktamske uree **12a-v** nisu inhibirale rast bakterija *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, kao ni rast gljivica *C. albicans* i *S. cerevisiae*, u koncentraciji od 128 – 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.8.2. Ispitivanje antitumorske aktivnosti *trans*- β -laktamskih urea **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t** i 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**

Ispitana je antiproliferativna aktivnost pripremljenih *trans*- β -laktamskih urea **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t** i 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**. Antiproliferativno djelovanje ispitano je u *in vitro* uvjetima pomoću MTT testa²³⁵ na staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), karcinoma jajnika (A2780), karcinoma dojke (MCF-7) te na netransformiranim stanicama ljudskih fibroblasta (HFF-1). Stanice su bile izložene djelovanju *trans*- β -laktamskih urea **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t** i 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** u rasponu koncentracija od 100 do 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Rezultati ispitivanja prikazani su pomoću vrijednosti IC₅₀ koja predstavlja koncentraciju spoja koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta stanica.²³⁶ Rezultati testiranja prikazani su u Tablicima 23 i 24. Krivulje rasta stanica HepG2, A2780, MCF7 i HFF1 prikazane su na Slikama P4.1

trans- β -Laktamske uree **12b**, **12c**, **12h**, **12o**, **12p** i **12r** pokazale su zanimljiv biološki odgovor. Svih šest spojeva srednje jako inhibiraju rast staničnih linija HepG2, A2780 i MCF-1. β -Laktamski derivati s alilnim **12a**, furfurilnim **12d** i 2,6-dimetilfenilnim **12t** supstituentima na N1-atomu ureido skupine β -laktamskih urea pokazali su nikakvu ili slabu aktivnost na HepG2 stanice. Međutim, ovi spojevi pokazuju srednje jako djelovanje na stanice A2780, a spoj **12d** pokazuje i srednje jako djelovanje na MCF-1 stanice. Najjači učinak na rast stanica A2780 pokazala je *trans*- β -laktamska urea **12p** s 3-klor-4-metilfenilnim supstituentom. Nadalje, antiproliferacijski učinak ispitan je s dvije β -laktamske uree **12p** i **12r** na ne-tumorskoj staničnoj liniji HFF-1. Rezultati testiranja pokazali su da ovi spojevi imaju citotoksično djelovanje na HFF-1 stanice.

Tablica 23. IC₅₀ vrijednosti (μmol L⁻¹) za spojeve **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t**

Spoj	Struktura	Stanične linije			
		HepG2	A2780	MCF7	HFF1
12a		>100	25 ± 4	57 ± 22	n.t.
12b		18 ± 0,1	16 ± 0,3	18 ± 0,5	n.t.
12c		18 ± 1,3	16 ± 0,01	20 ± 3,7	n.t.
12f		82 ± 85	20 ± 3,8	19 ± 1,7	n.t.
12h		17 ± 1,5	12 ± 0,2	15 ± 6,1	n.t.
12o		30 ± 48	13 ± 5,2	12 ± 1,7	n.t.
12p		17 ± 5,3	7,8 ± 8,4	13 ± 2	8 ± 5,1
12r		24 ± 0,8	16 ± 0,2	18 ± 0,1	4,5 ± 8,9
12t		>100	23 ± 1,9	43 ± 13	n.t.

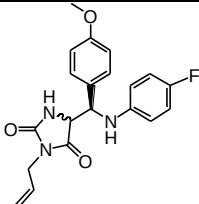
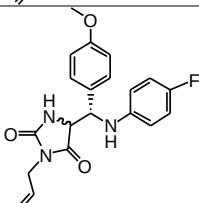
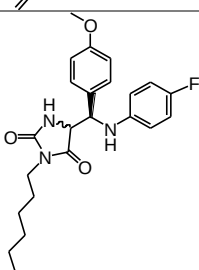
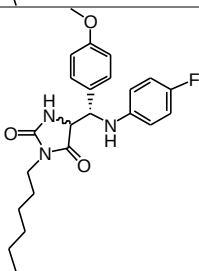
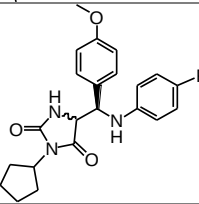
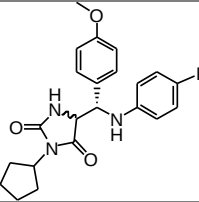
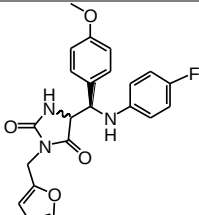
n.t. - nije testirano

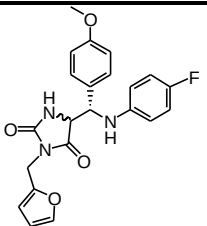
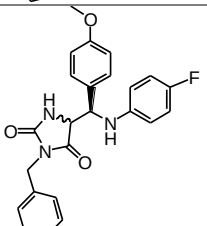
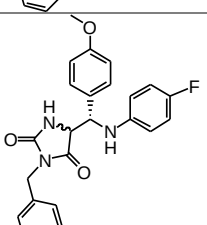
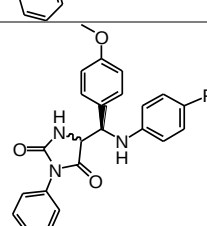
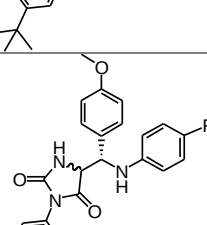
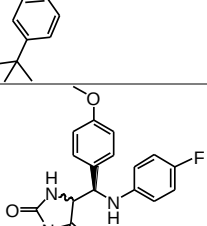
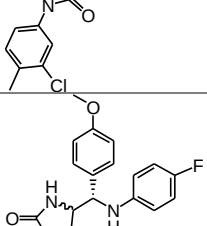
Za razliku od *trans*- β -laktamske urea, većina sintetiziranih 3,5-disupstituiranih hidantoina nije pokazala značajno antiproliferacijsko djelovanje. Na primjer za staničnu liniju hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2, jedino četiri hidantoina derivata s heksilnim **14b**, 4-*tert*-butilfenilnim **13f** i **14f** i 3-klor-4-metilfenilnim **14g** supstituentima na N-3 položaju hidantoinskog prstena srednje jako inhibiraju rast HepG2 stanice. Za staničnu liniju karcinoma jajnika A2780 devet spojeva **13b**, **13c**, **13f**, **13g**, **13h**, **14c**, **14f**, **14g** i **14i** pokazuje srednje jako djelovanje na A2780 stanice, dok za staničnu liniju karcinoma dojke MCF-7 blagi antiproliferacijski učinak imaju spojevi **13b**, **13c**, **13g**, **13h**, **14b**, **14f**, **14g** i **14h**. Najjaču antiproliferacijsku aktivnost na MCF-7 stanice pokazao je hidantoini derivat **14c** s ciklopentilnim supstituentom ($IC_{50} = 4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) na N-3 položaju hidantoinskog prstena. Međutim, njegov dijastereomer **13c** pokazuje srednje jako antiproliferativno djelovanje na MCF-7 stanice ($IC_{50} = 41 \mu\text{mol L}^{-1}$).

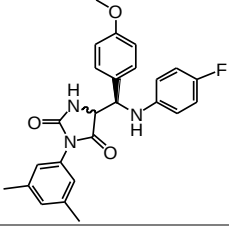
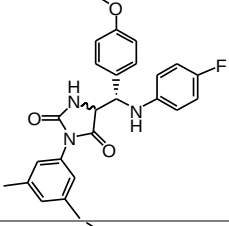
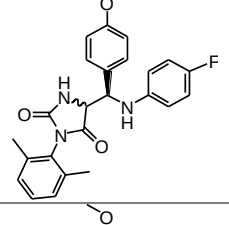
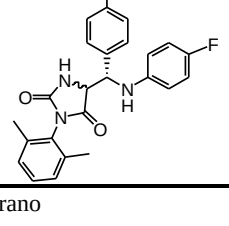
Citotoksični učinak na zdrave HFF-1 stanice pokazali su hidantoini **13g**, **13h**, **14c**, **14g** i **14h**. Citotoksični učinak na HFF-1 stanice koje predstavljaju jedan od modela za proučavanje djelovanja testiranih spojeva na normalne stanice. Poželjno bi bilo da novi kemijski spojevi, odnosno potencijalni lijekovi, pokazuju što manju toksičnost prema normalnim stanicama i što veće citotoksično djelovanje na stanične linije tumorskih stanica.

Spojevi **13a**, **13e**, **13d**, **13i**, **14a**, **14d** i **14e** pokazali su zanemarivo ili izrazito slabo djelovanje na ispitivane stanične linije, odnosno na HepG2, A2780, MCF-7 i HFF-1. Hidantoini derivati s heksilnim **14b**, 4-*tert*-butilfenilnim supstituentom **13f** i **14f** i 3-klor-4-metilfenilnim supstituentima **14g** na N-3 položaju hidantoinskog prstena pokazali su zanimljiv biološki odgovor. Sva četiri spoja srednje jako inhibiraju rast staničnih linija karcinoma jetre HepG2, jajnika A2780 i dojke MCF-1.

Tablica 24. IC₅₀ vrijednosti (μmol L⁻¹) za spojeve **13a-i** i **14a-i**

Spoj	Struktura	Stanične linije			
		HepG2	A2780	MCF7	HFF1
13a		>100	71 ± 34	>100	>100
14a		>100	>100	>100	>100
13b		>100	93 ± 123	65	n.t.
14b		36 ± 12	33 ± 12	41	n.t.
13c		>100	36 ± 7,9	41	>100
14c		>100	42 ± 57	4,6	12 ± 13
13d		>100	>100	>100	>100

Unos	Struktura	Stanične linije			
		HepG2	A2780	MCF7	HFF1
14d		>100	79 ± 6,4	>100	>100
13e		>100	69 ± 17	>100	>100
14e		>100	68 ± 7,7	65 ± 2,4	>100
13f		16 ± 1,2	15 ± 1,7	20	n.t.
14f		33 ± 1,4	22 ± 6,9	46	n.t.
13g		>100	28 ± 13	21	23
14g		30 ± 3	43 ± 13	28	13

Spoj	Struktura	Stanične linije			
		HepG2	HepG2	HepG2	HepG2
13h		>100	43 ± 4	27 ± 2,2	21 ± 49
14h		>100	59 ± 2,4	48 ± 14	18 ± 27
13i		>100	77 ± 3	>100	>100
14i		>100	48 ± 10	69	>100

n.t. - nije testirano

5. ZAKLJUČAK

Primjenom računalnih programa ADMET Predictor i DataWarrior te poslužitelja admetSAR izračunati su ADMET parametri za seriju *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, hidantoina **3a-v** i **4a-v** i parazoantina **5a-l**. Dobiveni rezultati upoređeni su s ADMET osobinama ezetimiba i njegovih amidnih analoga **TD1-6**. Većina ispitivanih spojeva ispunjava Lipinskijeva pravila što ukazuje na to da bi u uvjetima *in vitro/in vivo* mogli pokazati zadovoljavajući stupanj oralne bioraspoloživosti.

Parazoantini su značajno drugačiji u ADMET prostoru, odnosno u fizikalno-kemijskom prostoru, od ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituiranih hidantoina **3a-v** i **4a-v**, ezetimiba i njegovih amidnih analoga **TD1-6**. To je prvenstveno zbog toga jer su to bazični spojevi koji imaju pozitivno nabijenu gvanidinsku skupinu u bočnom lancu. Zbog gvanidinske grupe, ovi spojevi su polarniji, hidrofilniji, topljiviji u vodi, ali i slabije permeabilni kroz membrane. Osim toga, predviđeno je da su ovi spojevi linearniji i fleksibilniji od ostalih spojeva. Također, može se očekivati da će se parazoantinski derivati manje vezati za proteine plazme i stoga biti skloniji ući u krvne stanice poput eritrocita (RBP > 1).

Predviđeno je da *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, hidantoini **3a-v** i **4a-v** i parazoantini **5a-l** ne prolaze kroz BBB. Nadalje, predviđeno je da su *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v** i hidantoini **3a-v** i **4a-v** supstrati i inhibitori P-gp, a da su parazoantinski spojevi **5a-l** supstrati P-gp što može smanjiti njihov unos u stanice. *trans*- β -Laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituirani hidantoini **3a-v** i **4a-v** i parazoantinski spojevi **5a-l** međusobno se razlikuju po svojim predviđenim metaboličkim osobinama. *trans*- β -Laktamske uree **1a-v** i **2a-v** i hidantoini **3a-v** i **4a-v** spadaju u ECCS klasu 2, dok derivati s 3,5-bis(trifluormetil)fenilnim supstituentom (**1s**, **2s**, **3s** i **4s**) i parazoantinski spojevi **5a-l** spadaju u klasu 4. *trans*- β -Laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, 3,5-disupstituirani hidantoini **3a-v** i **4a-v** te parazoantini **5a-l** ne djeluju kao BCRP, MATE1, OATP 2B1, OCT 1 i OCT 2 inhibitori. Međutim, oni mogu djelovati kao OATP 1B1 i 1B3 inhibitori. Nadalje, *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v**, hidantoini **3a-v** i **4a-v**, fenilamino-derivati parazoantina **A 5k** i **F 5l** te četiri prirodna parazoantina **5b,c,e,f** mogu djelovati i kao BSEP inhibitori. Jedino je za β -laktamske i hidantoinске derivate s 3-klor-4-metilfenilnom skupinom (**1p**, **2p**, **4p**) predviđena hepatotoksičnost (povišeni AST, ALT i LDH enzimi). Za većinu *trans*- β -laktamskih urea **1a-v** i **2a-v** i hidantoina **3a-v** i **4a-v** predviđeno je da povećavaju razinu jetrenih AP, AST, ALT i GGT enzima, dok je za parazoantinske spojeve

5a-l predviđeno povećanje samo GGT enzima. Nadalje, predviđeno je da *trans*- β -laktamske uree **1a-v** i **2a-v** i hidantoini **3a-v** i **4a-v** posjeduju androgensko djelovanje. Međutim, parazoantinski spojevi **5a-l** ne posjeduju ni androgensko ni estrogensko djelovanje. Većina β -laktamskih urea, hidantoina te fenilamino-derivati parazoantina **5k,l** inhibiraju hERG kalijeve kanale, dok prirodni parazoantini **5a-j** ne inhibiraju navedene kanale. Programom ADMET Predictor predviđeno je da su hidantoini spojevi (**3a-v**, **4a-v**) toksičniji u odnosu na β -laktamske analoge **1a-v** i **2a-v**.

Sintetizirani su imini **1a** i **1b** iz 4-fluoranilina i odgovarajućih aldehida, te su izolirani u 72,6 %-tnom, odnosno u 71,4 %-tnom iskorištenju.

Uspješno je pripravljen zaštićeni metilni ester glicina **2** u iskorištenju od 99,3 %.

Uspješno su pripravljeni zaštićeni kiralni mentilni esteri **8a** i **8b** u iskorištenju od 97,1 %, odnosno u 96,5 %.

Primjenom litijevog enolata metilnog estera glicina **2** s iminima **1a** i **1b** pripravljeni su β -laktami u iskorištenju od 60,9 %, odnosno u iskorištenju od 69,8 %. Analizom ^1H NMR spektara 3-amino- β -laktama **3** i **4** utvrđeno je da pretežno nastaje *cis*-izomer.

Pripravljeni su 3-amino- β -laktami ciklokondenzacijom kiralnih litijevih enolata estera glicina **4c** i **4d** s iminom **1a**, te su izolirani u 52,9 %-tnom, odnosno u 61,2 %-tnom iskorištenju. β -Laktami pripravljeni su isključivo kao *trans*-izomeri, što je utvrđeno analizom konstanti sprege vicinalnih protona na C-3 i C-4 položajima β -laktamskog prstena u ^1H -NMR spektru.

Dijastereomerna smjesa *cis*- i *trans*-3-ftalimido- β -laktama **9** i **10** pripravljena je Staudingerovom reakcijom, (2+2) keten-imin ciklokondenzacijom, iz *N*-ftaloilglicina i imina **1a**. Uklanjanjem zaštitne ftalimido skupine spoja **10** s etilendiaminom pripravljen je ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktam **4e** u iskorištenju od 66,5 %.

Korištenjem ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama **4e** u reakciji s različitim arilnim i alkilnim izocijanatima **17a-v** priređene su ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12a-v** u iskorištenju od 68,5-93,5 % uz zadržavanje apsolutne konfiguracije na C-3 i C-4 položajima β -laktamskog prstena.

Intramolekulskom transformacijom ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** u prisustvu natrijevog metoksida pripravljeni su ($\pm$)-3,5-disupstituirani hidantoini **13a-i/14a-i** u iskorištenju od 58,8-91,8 %. Dobivene dijastereomerne smjese 3,5-disupstituiranih hidantoina odvojene su primjenom preparativne HPLC-kromatografije.

U pokušajima sinteza fenilamino-derivata parazoantina A i F, reakcija kondenzacije između *N*-Boc-aminopropanala i anilina nije uspjela.

U ovom radu ispitano je odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na odabranim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i superkritične fluidne kromatografije. Nadalje, ispitan je utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera spojeva **12b-f**, **12h-j** i **12m-r** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Ispitan je utjecaj alkoholnih modifikatora, izopropilamina, temperature kolone i povratnog tlaka na odjeljivanje enantiomera spojeva **12a-v** primjenom superkritične fluidne kromatografije. U mehanizmu kiralnog prepoznavanja, uz vodikove veze, dominiraju π - π interakcije, dipol-dipol intrakcije i inkluzija u kiralnu šupljinu. Kiralno prepoznavanje ovisi o vrsti supstituenta vezanog na N1-atom ureido skupine, vrsti kiralnog selektora i o polarnosti pokretne faze. Na temelju provedenih enantioselektivnih analiza ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uočava se da enantioprepoznavanju većine spojeva više pogoduju celulozna kolona Chirallica PST-10 te levanska kolona Chirallica PST-7. Najbolje razlučivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea postignuto je na celuloznoj koloni Chirallica PST-10, uz izuzetak enantiomera spoja **12j** koji najbolje razlučivanje postižu na celuloznoj koloni Chiralpak IC.

Na temelju provedenih enantioselektivnih analiza ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** superkritičnom fluidnom kromatografijom uočava se da enantioprepoznavanju spojeva **12a-e**, **12i-k**, **12o**, **12p**, **12s** i **12u** više pogoduje kolona Chirallica PST-10 od ostalih ispitivanih kolona. Dok enantiomeri spojeva **12f**, **12h**, **12t** i **12v** najbolje kiralno prepoznavanje ostvaruju na koloni Chiralpak AD-3, a enantiomeri spojeva **12g**, **12l-12n** i **12r** na celuloznoj koloni Chiralcel OD-3. Na koloni Chirallica PST-10, enantiomeri svih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** odjeljuju se do osnovne linije. Vrsta alkoholnog modifikatora utječe na faktor zadržavanja enantiomera, separacijski faktor i razlučivanje enantiomera. Povećanjem volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi skraćuje se vrijeme zadržavanja prvoizlazećih enantiomera spojeva **12a**, **12g**, **12l**, **12m**, **12s** i **12v**, a kod ostalih ispitivanih spojeva nema pravilnosti. Isto tako, nema pravilnosti kod enantioselektivnosti i razlučivanja enantiomera. Faktori zadržavanja enantiomera većine ispitivanih ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** smanjuju su s povećanjem temperature kolone. Povećanjem temperature vrijednost separacijskog faktora se blago smanjivala za enantiomere spojeva **12b-f**, **12i-k**, **12o** i **12p**, dok je za spoj **12r** rasla s povećanjem temperature kolone. Prema van't Hoffovoj jednadžbi, odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea bio je entalpijski vođen proces. Povećanjem povratnog tlaka u sustavu skraćuje se vrijeme zadržavanja enantiomera na koloni, dok se separacijski faktor nije značajno mijenjao. SFC metoda pokazala je da se enantiomeri 13 ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea

kraće zadržavaju u kontaktu s kiralnom nepokretnom fazom kolone Chirallica PST-10, te da je razlučivanje 11 spojeva bolje u odnosu na HPLC metodu. No, kiralno prepoznavanje je znatno bolje uz metanol nego uz CO₂/MeOH (70:30, v/v).

Na temelju provedenih enantioselektivnih analiza (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uočava se da enantioprepoznavanju većine spojeva više pogoduju amilozne kolone Chiralpak AD-3 i Chiralpak IA u odnosu na celulozne kolone. Najbolje razlučivanje enantiomera (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i** postignuto je na amiloznoj koloni Chiralpak AD-3, uz izuzetak enantiomera spojeva **13e**, **13g** i **14i** koji se najbolje odjeljuju na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IA. Enantiomeri spoja **13d** najbolje se odjeljuju na koloni Chiralcel OD-3, dok se enantiomeri spoja **13i** najbolje odjeljuju na njenoj imobiliziranoj inačici, koloni Chiralpak IB.

Apsolutna konfiguracija 3-amino-β-laktama **3** i **4** određena je usporedbom njihovih eksperimentalno izmjerenih ECD spektara s ECD spektrima izračunatim pomoću TDDFT metode na CAM-B3LYP/def2-TZVP//ωB97X-D/6-311+G (d,p) razini u acetonitrilu s IEFPCM modelom solvatacije.

Apsolutna konfiguracija (*S*) na egzocikličkom stereogenom centru C-6 hidantoina **13a** određena je usporedbom njihovih eksperimentalno izmjerenih ECD spektara s ECD spektrima izračunatim pomoću TDDFT metode na CAM-B3LYP/def2-TZVP//ωB97X-D/6-311+G (d,p) razini u acetonitrilu s IEFPCM modelom solvatacije. Primjenom ECD analize nije bilo moguće odrediti apsolutnu konfiguraciju na stereogenom centru C-5 hidantoiniskog prstena te je stoga potrebno nadopuniti analizu s vibracijskim CD-om.

Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti pokazali su da *trans*-β-laktamske uree **12a-v** nisu inhibirale rast bakterija *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, kao ni rast gljivica *C. albicans* i *S. cerevisiae*, u koncentraciji od 128–0,125 μg mL⁻¹.

Antiproliferativni učinak ispitan je s *trans*-β-laktamskim ureama **12b**, **12c**, **12h**, **12o**, **12p** i **12r** i 3,5-disupstituiranim hidantoinima **13a-i** i **14a-i** na tri tumorske stanične linije (HepG2, A2780 i MCF-7). Također, antiproliferativni učinak ispitan je s spojevima **12p**, **12r**, **13a**, **13c-e**, **13g-i**, **14b**, **14c-e** i **14g-i** na zdravim stanicama fibroblasta ljudske kože (HFF-1).

Najjači citotoksični učinak pokazao je 3,5-disupstituirani hidantoin **14c** s ciklopentilnom skupinom na N-3 položaju hidantoiniskog prstena, na proliferaciju MCF-7 tumorskih stanica (IC₅₀ = 4,6 μmol L⁻¹) i β-laktam **12p** s 3-klor-4-metilfenilnom skupinom na N-1 atomu ureido β-laktamske uree, koji snažno zaustavlja proliferaciju A2780 tumorskih stanica (IC₅₀ = 7,8 μmol L⁻¹). Spojevi **13g**, **13h**, **14c**, **14g** i **14h** imaju citotoksični učinak na zdrave HFF-1 stanice.

3,5-Disupstituirani hidantoini s alilnom **14a** i furfurilnom **13d** skupinom na N3 položaju hidantoinskog prstena ne pokazuju antiproliferativnu aktivnost ($IC_{50} > 100 \text{ mmol L}^{-1}$) na svim ispitivanim staničnim linijama.

6. LITERATURA

1. Z. Wang, J. Ni, Y. Kuninobu, M. Kanai, *Angew. Chem. Ind. Ed.* **53** (2014) 3496-3499.
2. A. Jarrahpour, E. Ebrahimi, V. Sinou, C. Latour, J. M. Brunei, *Eur. J. Med. Chem.* **87** (2014) 364-371.
3. L. Méndez, A. A. Poeylaut-Palena, E. G. Mata, *Molecules* **23** (2018) 1-15.
4. P. D. Mehta, N. P. S. Sengar, A. K. Pathak, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010), 5541-5560.
5. S. Zavar, M. Zarei, M. Saraei, *Synth. Commun.* **46** (2016) 2031-2036.
6. N. Piens, M. D'hooghe, *Eur. J. Org. Chem.* **40** (2017) 5943-5960.
7. T. Dražić, M. Roje, *Chem. Heterocycl. Compd.* **53** (2017) 953-962.
8. D-J. Fu, Y-F. Zhang, A-Q. Chang, J. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **201** (2020) 1-53.
9. S. Cho, S-H. Kim, D. Shin, *Eur. J. Med. Chem.* **164** (2019) 517-545.
10. J. C. Thenmozhiyal, P. Tsun-Hon Wong, W.-K. Chui, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 1527-1535.
11. V. Kumar, M. P. Kaushik, A. Mazumdar, *Eur. J. Org. Chem.* **11** (2008) 1910-1916.
12. M. Meusel, M. Gutschow, *Org. Prep. Proced. Int.* **36** (2004) 391-443.
13. D. T. A. Youssef, L. A. Shaala, K. Z. Alshali, *Mar. Drugs* **13** (2015) 6609-6619.
14. N. Cachet, G. Genta-Jouve, E. L. Regalado, R. Mokrini, P. Amade, G. Culioli, O. P. Thomas, *J. Nat. Prod.* **72** (2009) 1612-1615
15. N. Cachet, G. Genta-Jouve, J. Ivanisevic, P. Chevaldonne, F. Sinniger, G. Culioli, T. Pérez, O. P. Thomas, *Sci. Rep.* **5** (2015) 1-9.
16. C. Audion, V. Cocandeau, O. P. Thomas, A. Bruschini, S. Holderith, G. Genta-Jouve, *Metabolites* **4** (2014) 421-432.
17. A. Kamath, I. Ojima, *Tetrahedron* **68** (2012) 10640-10664.
18. S. Deketelaere, T. Van Nguyen, C. V. Stevens, M. D'hooghe, *ChemistryOpen* **6** (2017) 301-319.
19. A. Jarrahpour, P. Shirvani, V. Sinou, C. Latour, J. M. Brunel, *Med. Chem. Res.* **25** (2016) 149-162.
20. W. A. Petri. Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics. U: Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics, X^{ed} (Brunton LL, Lazo HS, Parker KL, ur), McGraw Hill, New York 2006, str. 1127-1154.

21. H. F. Chambers, D. H. Deck. Beta lactam and other cell wall and membrane active antibiotics. U: basic and clinical pharmacology, XIed (Katzung BG, ur), Lange medical books/ McGraw Hill, New York 2010, str. 773-793.
22. T. Sawa, K. Koroguchi, K. Moriyama, *J. Intensive Care* **8** (2020) 1-13.
23. C. R. Pitts, T. Lectka, *Chem. Rev.* **114** (2014) 7930-7953.
24. Y. Guo, D. C. W. Tsang, X. Zhang, X. Yangl, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25** (2018) 4279-4288.
25. N. Arya, A. Y. Jagdale, T. A. Patil, S. S. Yeramwar, S. S. Holikatti, J. Dwivedi, C. J. Shishoo, K. S. Jain, *Eur. J. Med. Chem.* **74** (2014) 619-656.
26. D. A. Burnett, *Curr. Med. Chem.* **11** (2004) 1873-1887.
27. B. A. P. Phan, T. D. Dayspring, P. P. Toth, *Vasc. Health Risk Manag.* **8** (2012) 415-427.
28. S. Hosseyni, A. Jarrahpour, *Org. Biomol. Chem.* **16** (2018) 6840-6852.
29. I. Ojima, E. S. Zuniga, J. D. Seitz, *Top. Heterocycl. Chem.* **30** (2013) 1-64.
30. E. Ghabraie, S. Balalaie, S. Mehrparvar, F. Rominger, *J. Org. Chem.* **79** (2014) 7926-7934.
31. M. M. Meloni, M. Taddei, *Org. Lett.* **3** (2001) 337-340.
32. P. Pérez-Faginas, M. T. Aranda, L. Coady, M. T. García-López, R. González-Muñiz, *Adv. Synth. Catal.* **350** (2008) 2279-2285.
33. M. Benaglia, F. Cozzi, A. Puglisi, *Eur. J. Org. Chem.* **17** (2007) 2865–2869.
34. B. Indrani, F. B. Fredrick, K. B. Bimal, *Mod. Chem. Appl.* **5** (2017), 2329-6798.
35. B. F. Bonini, C. Femoni, M. Comes-Franchini, M. Fochi, G. Mazzanti, A. Ricci, G. Varchia, *Synlett* **7** (2001) 1092–1096.
36. L. Jiao, Y. Liang, J. Xu, *J. A. Chem. Soc.* **128** (2006) 6060-6069.
37. L. R. Domingo, M. Rios-Gutierrez, *J. A. Saez, RSC Adv.* **5** (2015) 37119-37129.
38. M. A. Ogliaruso, J. F. Wolfe, In *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*; Kartritzky, A. R.; Meth-Cohn, O.; Rees, C. W., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1995; Vol. 5, str. 23-120.
39. J. C. Sheehan, J. J. Ryan, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 1204–1206.
40. A. K. Bose, B. Anjaneyulu, S. K. Bhattacharya, M. S. Manhas, *Tetrahedron* **23** (1967) 4769–4776.
41. D. Bandyopadhyay, J. Cruz, B. K. Banik, *Tetrahedron* **68** (2012) 10686-10695.
42. J. Aszodu, A. Bonnet, G. Teutsch, *Tetrahedron* **46** (1990) 1579-1586.
43. G. I. Georg, Z. Wu, *Tetrahedron Lett.* **35** (1994) 381-384.
44. T. E. Gunda, F. Sztaricskai, *Tetrahedron* **53** (1997) 7985–7998.

45. D. Evans, J. Williams *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 5065–5068.
46. E. Bandini, G. Martelli, G. Spunta, A. Bongini, M. Panunzio, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 4409–4412.
47. D. A. Evans, E. B. Sjogren, *Tetrahedron Lett.* **26** (1985) 3783–3786.
48. I. Ojima, H. J. C. Chen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987 625–626.
49. I. Ojima, H. J. C. Chen, X. Qiu, *Tetrahedron* **44** (1988) 5307–5318.
50. H. Gilman, M. Speeter, *J. Am. Chem. Soc.* **65** (1943) 2255–2256.
51. I. Ojima, I. Habuš, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 4289–4292.
52. F. H. Van der Steen, H. Kleijn, A. L. Spek, G. Van Koten, *J. Org. Chem.* **56** (1991) 5868–5875.
53. T. Dražić, V. Sachdev, C. Leopold, J. V. Patankar, M. Malnar, S. Hećimović, S. Levak-Frank, I. Habuš, D. Kratky, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2015) 2353–2359.
54. A. Bhalla, G. Modi, S. S. Bari, A. Kumari, D. Narula, S. Berry, *Tetrahedron Asymmetry* **28** (2017) 307–316.
55. T. Shimizu, *Soil Sci. Plant Nutr.* **32** (1986) 255–264.
56. L. K. Abdulrahman, M. M. Al-Mousley, M. L. Al-Mosuli, K. K. Al-Azzawii, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **5** (2013) 494–504.
57. A. Baeyer, *Ann.* **117** (1861) 178–180.
58. J. H. Bateman, Hydantoin and derivatives, (CIBA-GEIGY Corp) <https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/#id=mxly0046>, pristupljeno 3.10.2020. str 607–608.
59. A. Baeyer, *Ann.* **130** (1864) 129–175.
60. A. Strecker, *Ann.* **166** (1870) 177–185.
61. Z. Rajić, B. Zorc, S. Raic-Malić, K. Ester, M. Kralj, K. Pavelić, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, *Molecules* **11** (2006) 837–848.
62. A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, *Pharmaceutical Substances, Synthesis Patents, Applications*, 4th Edition, Thieme Medical, Stuttgart, 2001.
63. M. Shiozaki, *Carbohydr. Res.* **337** (2002) 2077–2088.
64. Q. Huang, Q. Liu, D. Ouyang, *Med. Chem.* **15** (2019) 3–7.
65. A. A. El Gamal, *Saudi Pharm. J.* **18** (2010) 1–25.
66. M. A. Khanfar, B. A. Asal, M. Mudit, A. Kaddoumi, K. A. El Sayed, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 6032–6039.
67. M. Mudit, M. Khanfar, A. Muralidharan, S. Tjomas, G. C. Shah, R. W. M. van Soest, K. A. El Sayed, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 1731–1738.

68. http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/29814/15/16_section%202.pdf
(pristupljeno 18. svibnja 2020.)
69. R. Fathi-Afshar, T. M. Allen, *Can. J. Chem.* **66** (1988) 45-50.
70. P. M. Fresneda, M. Castañeda, M.A. Sanz, D. Bautistab, P. Molina, *Tetrahedron* **63** (2007) 1849–1856.
71. E. Colacino, F. Lamaty, J. Martinez, I. Parrot, *Tetrahedron* **48** (2007) 5317-5320.
72. G-J. Lu, J-Q. Nie, Z-X. Chen, G-C. Yang, C-F. Lu, *Tetrahedron Asymmetry* **24** (2013) 1331–1335.
73. C. Metallinos, J. John, J. Zaifman, K. Emberson, *Adv. Synth. Catal.* **354** (2012) 602-606.
74. E. Ware, The chemistry of the hydantoins, *Chem. Rev.* **46** (1950) 403 470.
75. F. Urech, *Liebigs. Ann.* **165** (1873) 99-103.
76. H. Bilitz, *Chem. Ber.* **41**(1908) 1379–1393.
77. W. T. Read, *J. Am. Chem. Soc.* **44** (1922) 1746–1755.
78. H. Bergs. *German patent*, number 566, 094, **1929**.
79. H. T. Bucherer and W. Steiner. *J. Prakt. Chem.* **140**, (1934) 291.
80. I. Muramatsu, T. Hirabayashi, A. Hagitani, *Nippon Kagaku Zasshi*, **84** (1963) 855-860.
81. E. S. Schipper, A. R. Day, u *Heterocyclic Compounds*, R. C. Elderfield (ur.), Vol. 5, John Wiley and Sons, Inc. New York, London, 1957.
82. I. Schon, J. Friss, L. Kisfaludy, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **98** (1978) 215–223.
83. G. A. Maslova, I. T. Strukov, *Zh. Obshch. Khim.* **34** (1964) 3506.
84. M. Beller, M. Eckert, W. A. Moradi, H. Neumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1454–1457.
85. S. Hobbs DeWitt, J. S. Kiely, C. J. Stankovic, M. C. Schroeder, D. M. Reynolds Cody, M. R. Pavia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) 6909–6913.
86. S. Hobbs DeWitt, A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.* **29** (1996) 114-122.
87. S.W. Kim, S.Y. Ahn, J.S. Koh, J.H. Lee, S. Ro and H.Y. Cho, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 4603- 4606.
88. A. Nefzi, J.M. Ostrech, M. Guilianotti and R.A. Houghten, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 8199- 8202.
89. A. Nefzi, M. Guilianotti, L. Truong, S. Rattan, J.M. Ostrech and R.A. Houghten, *J. Comb. Chem.* **4** (2002) 175-178.
90. J. Vázquez, M. Royo, F. Albericio, *Lett. Org. Chem.* **1** (2004) 224–226.
91. P. Y. Chong, P. A. Petillo, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 2493–2496.
92. B. A. Dressman, L. A. Spangle, S. W. Kaldor, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 937–940.

93. J. Alsina, W. L. Scott, M. J. O'Donnell, *Tetrahedron Lett.* **46** (2005) 3131–3135.
94. E. Colacino, F. Lamaty, J. Martinez, I. Parrot, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 5317–5320.
95. S. Paul, M. Gupta, R. Gupta and A. Loupy, *Synthesis*, 2002, 75–78
96. M. –J. Lee, C. –M. Sun, *Tetrahedron Lett.* **45** (2004) 437–440.
97. L. Konnert, B. Reneaud, R. Marcia de Figueiredo, J-M. Campagne, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *J. Org. Chem.* **79** (2014) 10132–10142.
98. L. Konnert, M. Dimassi, L. Gonnet, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *RSD Adv.* **6** (2016) 36978–36986.
99. L. Konnert, L. Gonnet, I. Halasz, J-S. Suppo, R. Marcia de Figueiredo, J-M. Campagne, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *J. Org. Chem.* **81** (2016) 9802–9809.
100. A. Mascitti, M. Lupacchini, R. Guerra, I. Taydakov, L. Tonucci, N. d'Alessandro, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *Beilstein J. Org. Chem.* **13** (2017) 19–25.
101. D. Zhang, X. Xing, G. D. Cuny, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 1750–1753.
102. Y. Chen, L. Su, X. Yang, W. Pan, H. Fang, *Tetrahedron* **71** (2015) 9234–9239.
103. D. K. Tanwar, A. Ratan, M. S. Gill, *Synlett* **28** (2017) 2285–2290.
104. L. Konnert, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *Chem. Rev.* **117** (2017) 13757–13809.
105. S. G. Patching, *J. Diagn. Imaging Ther.* **4** (2017) 3–26.
106. H. Liu, Z. Yang, Z. Pan, *Org. Lett.* **16** (2014) 5902–5905.
107. V. Mehra, P. Singh, N. Menhas, V. Kumar, *Synlett* **25** (2014) 1124–1126.
108. V. Mehra, V. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **54** (2013) 6041–6044.
109. <http://zastitamora.net/podmorje/morske-vrste/cnidaria-zarnjaci/koralji/parazoanthus-axinellae> (pristupljeno 1. lipnja 2020.)
110. F. Tinto, Doktorska disertacija, Universita'degli studi di Napoli Federico II, Napoli (2017)
111. <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1724> (pristupljeno 1. lipnja 2020.)
112. J. Wefer, T. Lindel, *Eur. J. Org. Chem.* **2015** 6370–6381.
113. E. Manzo, D. Pagano, G. Nuzzo, M. Gavagnin, M. L. Ciavatta, *Tetrahedron Lett.* **53** (2012) 7083–7084.
114. J.-G. Kim, D. Ok Jang, *Synlett* **13** (2008) 2072–2074.
115. <http://www.name-reaction.com/curtius-rearrangement> (pristupljeno 3. lipnja 2020.)
116. A. Padwa, K. R. Crawford, P. Rashatasakhon, M. J. Rose, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 2609–2617.
117. F. Tinto, D. Pagano, E. Manzo, *Tetrahedron* **25** (2015) 4379–4384.
118. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/dess-martin-oxidation.shtm> (pristupljeno 4. lipnja 2020.)

119. N. Sethi, A. Anand, G. Jain, K. S. Srinivas, K. K. Chandrul, *Chron. Young Sci.* **1** (2010) 12-22.
120. W. P. Farrell, C. M. Aurigemma, D. F. Masters-Moore, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **32** (2009) 1689–1710. .
121. H. Yuan, S. V. Olesik, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Online 2006 John Wiley & Sons, Ltd.
122. B. S. Sekhon, *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2** (2010) 1595-1602.
123. P. Gopaliya, P. R. Kamble, R. Kamble, C. S. Chauhan, *Int. J. Chem. Pharm. Rev. Res.* **3** (2014) 59-66.
124. G. Kucerova, K. Kalikova, E. Tesarova, *Chirallity* (2017) 1-8.
125. M. M. Wong, W. B. Holzheuer, G. K. Webster, *Curr. Pharm. Anal.* **4** (2008) 101-105.
126. C. West, *Anal. and Bioanal. Chem.* **410** (2018) 6441-6457.
127. E. Lemasson, S. Bertin, C. West, *J. Sep. Sci.* **39** (2016) 212-233.
128. L. Laboureur, M. Ollero, D. Touboul, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (2015) 13868-13884.
129. J. Peach, J. Eastoe, *Beilstein J. Org. Chem.* **10** (2014) 1878–1895.
130. S. Nowak, M. Winter, *Molecules* **22** (2017) 403-424.
131. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_General_Chemistry_\(Petrucci_et_al.\)/12%3A_Intermolecular_Forces%3A_Liquids_And_Solids/12.4%3A_Phase_Diagrams](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_General_Chemistry_(Petrucci_et_al.)/12%3A_Intermolecular_Forces%3A_Liquids_And_Solids/12.4%3A_Phase_Diagrams) (pristupljeno 1. svibnja 2020.)
132. [https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/03%3A_Chromatography/03.3%3A_Basic_Principles_of_Supercritical_Fluid_Chromatography_and_Supercritical_Fluid_Extraction.pdf](https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/03%3A_Chromatography/03.3%3A_Basic_Principles_of_Supercritical_Fluid_Chromatography_and_Supercritical_Fluid_Extraction.pdf) (pristupljeno 1. svibnja 2020.)
133. K. De Klerck, D. Mangelings, Y. V. Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 77-92.
134. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-5509EN.pdf> (pristupljeno 10. kolovoza 2020.)
135. https://www.chromacademy.com/lms/sco109/HPLC_Supercritical_Fluid_Chromatography.pdf (pristupljeno 10. kolovoza 2020.)
136. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=19016> (pristupljeno 1. rujna 2020.)
137. <https://www.pharmapproach.com/introduction-to-pharmacology/> (pristupljeno 1. rujna 2020.)
138. S. Ekins, J. Mestres, B. Testa, *Br. J. Pharmacol.* **152** (2007) 9-20.
139. <https://www.aegislabs.com/pharmacogenetics1> (pristupljeno 2. rujna 2020.)

140. <https://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakodinamika/> (pristupljeno 5. rujna 2020.)
141. S. Franković, *Lijekovi i cjepiva*, Završni rad, Stručni studij sigurnosti i zaštite, Veleučilište u Karlovcu, 2017.
142. https://bib.irb.hr/datoteka/618820.Novi_pogled_na_istrazivanje_lijekova_-nove_formulacije_i_kombinacije.pdf (pristupljeno 10. rujna 2020.)
143. M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, H. Ashrafi, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **30** (2013) 435-467.
144. N. Choudhary, V. Singh, *Plos One* (2018) 1-31.
145. A. R. Mullaicharam, N. Amaresh, *J. Pharm. Anal.* **3** (2014) 1-4.
146. F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P. W. Lee, Y. Tang, *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) 3099-3105.
147. M. S. Lowless, M. Waldman, R. Franczkiewicz, R. D. Clark Vol. 232. Switzerland: Springer International Publishing AG; 2016, str. 139-170.
148. A. Daina, O. Michielin, V. Zoente, *Sci. Rep.* **7** (2017) 1-13.
149. T. Sander, J. Freyss, M. von Korff, C. Rufener, *J. Chem. Inf. Model.* **55** (2015), 460-473.
150. S. K. Lee, I. H. Lee, H. J. Kim, G. S. Chang, J. E. Chung, K. T. No, *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions, 2003*, str. 418-420.
151. H. Yang, C. Lou, L. Sun, J. Li, Y. Cai, Z. Wang, W. Li, G. Liu, Y. Tang, *Bioinformatics* **35** (2018) 1067-1069.
152. F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P. W. Lee, Y. Tang, *J. Chem. Inf. Model.* **52** (2012) 3099-3105.
153. D. E. V. Pires, T. L. Blundell, D. B. Ascher, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 4066-4072.
154. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv Drug Deliv Rev* **46** (2001) 3-26.
155. C. A. Lipinski, *Drug. Discov. Today*, **1** (2004) 337-341.
156. S. Kar, J. Leszczynski, *Expert Opin. Drug Discov.* (2020) 1473-1487.
157. D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of laboratory Chemicals*, 3rd Edition, Pergamon Press, 1988.
158. R. E. Buntrock, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **42** (2002) 1505-1506.
159. S. Begum, P. Ganga Raju Achary, *SAR QSAR Environ. Res.* **26** (2015) 343-61.
160. <http://www.simulations-plus.com/assets/ADMET-Predictor-Nov2016.pdf> (pristupljeno 4. rujna 2020.)

161. Clinical and Laboratory Standards Institute: M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition, Wayne, PA (USA), 2015. www.clsi.org. (pristupljeno 12. prosinca 2020.)
162. J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemother.* **48** (2001) 5-16.
163. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
164. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55–63.
165. M. Masgari Abbasi, H. Valizadeh, H. Hamishehkar, M. Bannazadeh Amirkhiz, P. Zakeri-Milani, *Bangladesh J. Pharmacol.* **11** (2016) 911-919.
166. S. Oswald, C. Koll, Werner Siegmund, *J. Pharm. Sci.* **96** (2007) 3478-3484.
167. D. Suchy, K. Łabuzek, A. Stadnicki, B. Okopieñ, *Pharmacol. Rep.* **63** (2011) 1335-1348.
168. K. M. Srivalli, B. Mishra, *AAPS. PharmSciTech.* **17** (2016) 272-283.
169. T. Kosoglou, P. Statkevich, A. O. Johnson-Levonas, John F. Paolini, A. J. Bergman, K. B. Alton, *Clin. Pharmacokinet.* **44** (2005), str. 467-494.
170. G. Salen, K. von Bergmann, D. Lütjohann, P. Kwiterovich, J. Kane, S.B. Patel, T. Musliner, P. Stein, B. Musser, the Multicenter Sitosterolemia Study Group, *Circulation.* **109** (2004) 966–971.
171. M. F. J. Stolk, M. C. J. M. Becx, K. C. Kuypers, C. A. Seldenrijk, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4** (2006) 908-911.
172. J. Castellote, J. Ariza, R. Rota, A. Girbau, X. Xiol, *World. J. Gastroenterol.* **14** (2008) 5098-5099.
173. B. A. Phan, T. D. Dayspring, P. P. Toth, *Vasc Health Risk Manag.* **8** (2012), 415-27.
174. M. Yu, C. Liang, Q. Kong, Y. Wang, M. Li, *Lipids. Health. Dis.* **19** (2020) 1-7.
175. S. Oswald, E. Scheuch, I. Cascorbi, W. Siegmund, *J. Chromatogr. B* **830** (2006) 143–150.
176. H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P. K. Moore, *Farmakologija, Golden marketing – Tehnička knjiga*, Zagreb, 2006.
177. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23** (1997) 3–25.
178. C. A. Lipinski, *J. Pharmacol. Toxicol. Method* **44** (2000) 235–249.
179. D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 2615-2623.

180. E. L. Luzina, A. V. Popov, *Eur. J. Med. Chem.* **53** (2012) 364–373.
181. X. Li and M. A. Cooper, *Anal. Chem.* **84** (2012) 2609–2613.
182. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **64** (2012) 4-17.
183. E. Rutkowska, K. Pajak, K. Jóźwiak, *Acta. Pol. Pharm.* **70** (2013) 3-18.
184. S. Prasanna, R. J. Doerksen, *Curr. Med. Chem.* **16** (2009) 21-41.
185. P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 3714-3717.
186. D. Lagorce, D. Douguet, M. A. Miteva, B. O. Villoutreix, *Sci. Rep.* **7**, 46277
187. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakokinetika/distribucija> (pristupljeno 5. listopada 2020.)
188. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Krv> (pristupljeno 8. listopada 2020.)
189. Valentina Hil, Diplomski rad, Farmakokinetički parametri azatioprina - *in silico* pristup, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
190. P. Kumar, Pharmacology of Specific Drug Groups: Antibiotic Therapy. U F. J. Dowd, B. Johnson, A. Mariotti, Pharmacology and Therapeutics for Dentistry, 7th edition, St. Louis: Elsevier, 2017, str. 457-487.
191. K. Ohtaki, K. Matsubara, S. Fujimaru, K. Shimizu, T. Awaya, M. Suno, K. Chiba, N. Hayase, H. Shiono, *J. Neural. Transm.* **111** (2004) 1523–1535.
192. H. Pajouhesh, G. R. Lenz, *NeuroRx* **4** (2005) 541-553.
193. N. Božina, V. Macolić-Šarinić, Farmakogenomika i farmakovigilancija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013., str. 1-36.
194. G. Katzung, B. Masters, A. Trevor, Temeljna i klinička farmakologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2011., str. 53-66; str. 313-329.
195. K. I. Block, C. Gyllenhael, *Integr. Cancer Ther.* **1** (2002) 83-89.
196. https://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_P450 (pristupljeno 20. listopada 2020.)
197. A. F. El-Kattan, M. V. S. Varma, *Drug. Metab. Dispos.* **46** (2018) 729–739.
198. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/17/pkinet/clear.htm> (pristupljeno 24. listopada 2020.)
199. A. Charalabidisa, M. Sfounib, C. Bergströmc, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* **566** (2019) 264–281.
200. S. Ge, Y. Tu, M. Hu, *Curr. Pharmacol. Rep.* **2** (2016) 326–338.
201. M. R. McGill, *EXCLI Journal* **15** (2016) 817-828.
202. T. Dražić, M. Roje, M. Jurin, G. Pescitelli, *Eur. J. Org. Chem.* **24** (2016) 4189-4199.

203. T. Dražić, K. Molčanov, Krešimir; M. Jurin, M. Roje, *Synth. Commun.* **47** (2017) 764-770.
204. R. Varala, S. Nuvula, S. R. Adapa, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 8283-8286.
205. M. van Rensburg, B. R. Copp, D. Barker, *Eur. J. Org. Chem.* **24** (2018) 3065-3074.)
206. K. Okamura, D. Swern, *Tetrahedron* **34** (1978), 1651-1660.)
207. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/swern-oxidation.shtm> (pristupljeno 10. studenog 2020.)
208. K. P. Guzen, A. S. Guarezemini, A. T. G. Órfão, R. Cella, C. M. P. Pereira, H. A. Stefani, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 1845-1848.
209. M. Petrini, R. Ballini, E. Marcantoni, G. Rosini, *Synth. Commun.* **18** (1988) 847-853.
210. A. Leggio, E. L. Belsito, G. De Luca, M. L. Di Gioia, V. Leotta, E. Romio, C. Siciliano, A. Iguori, *RSC Adv.* **6** (2016), 34468-34475.
211. G. Pelletier, W. S. Bechara, A. Charette, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 12817-12819.
212. L. D. Asnin, M. V. Stepanova, *J. Sep. Sci.* **41** (2018), 1319-1337.
213. P. Wang, D. Liu, S. Jiang, Y. Xu, Z. Zhou, *J. Chromatogr. Sci.* **46** (2008) 789-792.
214. C. Panella, R. Ferretti, A. Casulli, R. Cirilli, *J. Pharm. Anal.* **9** (2019) 324-331.
215. M. Jurin, D. Kontrec, T. Dražić, M. Roje, *Croat. Chem. Acta* **93** (2021) 1-11.
216. [https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/03%3A_Chromatography/03.4%3A_Supercritical_Fluid_Chromatography.pdf](https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/03%3A_Chromatography/03.4%3A_Supercritical_Fluid_Chromatography.pdf) (pristupljeno 20. studenog 2020.)
217. S. Khater, C. West, *J. Chromatogr. A* **1373** (2014) 197-210.)
218. R. N. Rao, K. N. Kumar, B. S. Kumar, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 2671-2677.
219. J. Ding, M. Zhang, H. Dai, C. Lin, *Chirality* (2018) 1-12.
220. F. Lortie, S. Boileau, L. Bouteiller, *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 3008-3014.)
221. Y. K. Ye, K. G. Lynam, R. W. Stringham, *J. Chromatogr. A* **1041** (2004) 211-217.
222. R. W. Stringham, K. G. Lynam, B. S. Lord, *Chirality* **16** (2004) 493-498.
223. M. Woznica, P. Kowalska, R. Lysek, M. Masnyk, M. Gorecki, M. Kwit, F. Furche, J. Frelek, *Curr. Org. Chem.* **14** (2010) 1022-1036.
224. M. Michalak, M. Stodulski, S. Stecko, M. Woźnica, O. Staszewska-Krajewska, P. Kalicki, B. Furman, J. Frelek, M. Chmielewski, *Tetrahedron* **68** (2012) 10806-10817.
225. D. Tedesco, R. Zanasi, A. Guerrini, C. Bertucci, *Chirality* **24** (2012) 741-750.
226. M. Woźnica, M. Masnyk, S. Stecko, A. Mames, B. Furman, M. Chmielewski, J. Frelek, *J. Org. Chem.* **75** (2010), 7219-7226.

227. T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **17** (1996), 490–519.
228. J.-D. Chai, M. Head-Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10** (2008), 6615–6620.
229. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 5648–5652.
230. T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.* **393** (2004), 51–57.
231. C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **110** (1999), 6158–6170.
232. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008), 215–241.
233. F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005), 3297–3305.
234. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2013.
235. B. Mennucci, E. Cancès, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997), 10506–10517.
236. S. Aykul, E. Martinez-Hackert, *Anal. Biochem.* **508** (2016) 97–103.
237. M. Srebro-Hooper, J. Autschbach, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **68** (2017) 399–420.
238. G. Pescitelli, T. Bruhn, *Chirality* **28** (2016) 466–474.
239. A. Mándi, T. Kurtán, T. *Natural Product Reports* **36** (2019) 889–918.
240. S. Superchi, P. Scafato, M. Górecki, G. Pescitelli, *Curr. Med. Chem.* **25** (2018) 287–320.

7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

$[\alpha]_D$	specifična optička rotacija
<i>Absn_Code</i>	ukupni rizik povezan s apsorpcijom spoja u krvotok uslijed neprimjerene veličine i neravnoteže između lipofilnih i hidrofilnih karakteristika spoja
<i>Absn_Risk</i>	broj potencijalnih farmakokinetičkih problema za dani spoj povezanih s nedovoljnom apsorpcijom
ACN	acetonitril
ADME(T)	apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost (engl. <i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity</i>)
ALT	alanin aminotransferaza
AP	alkalna fosfataza
Ar	aril
AST	aspartat aminotransferaza
<i>Astro_Filter</i>	klasifikacijski model koji predviđa androgeno djelovanje u štakora
BBB	levans-moždana barijera (engl. <i>Blood-Brain Barrier</i>)
<i>BBB Filter</i>	prikladni model predviđa prolazi li spoj ili ne kroz krvno-moždanu barijeru
BCRP	protein rezistencije raka dojke (engl. <i>Breast Cancer Resistance Protein</i> – protein rezistencije raka dojke)
BCS	biofarmaceutski klasifikacijski sustav (engl. <i>Biopharmaceutics Classification System</i>)
Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonil
bs	široki singlet u NMR spektroskopiji
BSEP	eksportna pumpa za žučne soli (engl. <i>Bile Salt Export Pump</i>)
°C	Celzijev stupanj
<i>C. albicans</i>	lat. <i>Candida albicans</i>
CAN	cerijev amonijev nitrat
CAMHB	kationski podešen Mueller-Hinton bujon (engl. <i>Cation-Adjusted Mueller-Hinton broth</i>)
Cbz	Benzilkloroformat

CDI	<i>N,N'</i> -karbonildiimidazol
CLSI	Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. <i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i>)
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>Central Nervous System</i>)
COSY	engl. <i>Correlation Spectroscopy</i>
CYP	citokrom P450 (engl. <i>Cytochrom P 450</i>)
d	dublet u NMR spektroskopiji
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	diklormetan
dd	dublet dubleta u NMR spektroskopiji
DMAP	dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
d.r.	dijastereomerni omjer (engl. <i>Diastereomeric Ratio</i>)
d.v.	dijastereomerni višak (engl. <i>Diastereomeric Excess</i>)
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
EC50	srednja učinkovita koncentracija (engl. <i>Effective Concentration 50</i>). EC50 je koncentracija kod koje dolazi do djelovanja na 50% test organizama.
ECCS	prošireni sustav klasifikacije klirensa (engl. <i>Extended Clearance Classification System</i>)
<i>ECCS_Class</i>	klasifikacija ispitivanog spoja prema ECCS-u
ECD	elektronski cirkularni dikroizam (engl. <i>Electronic Circular Dichroism</i>)
EEDQ	<i>N</i> -etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin (engl. <i>N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-DihydroQuinoline</i>)
ekv.	ekvivalent
<i>Estro_Filter</i>	klasifikacijski model koji predviđa estrogno djelovanje u štakora
Et ₃ N	trietilamin
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
Flexibility	molekularna fleksibilnost
Fmoc	fluorenilmetiloksikarbonilna zaštitna skupina

EtOH	etanol
e.v.	enantiomerni višak (engl. <i>Enantiomeric excess</i>)
g	gram
GC	plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i>)
GGT	gama-glutamil-transpeptidaza
HBA	broj akceptora vodikove veze (engl. <i>Hydrogen Bond Acceptor</i>)
HBD	broj donora vodikove veze (engl. <i>Hydrogen Bond Donor</i>)
Hep G2	hepatocelularni karcinom G2 (engl. <i>Hepatocellular Carcinoma</i>)
<i>hERG_Filter</i>	potencijalna inhibitorna aktivnost spoja prema hERG ljudskim (engl. <i>Human Ether-a-go-go Related Gene</i>) kalijevim (K^+) kanalima – kardiotoksičnost
<i>hERG_pIC50</i>	mjera afiniteta ispitivanih spojeva za hERG kalijeve kanale i potencijalna kardiotoksičnost izražena kao pIC ₅₀
HMBC	engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HR-MS	spektrometrija masa visoke rezolucije (engl. <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
HSA	humani serumski albumin (engl. <i>Human Serum Albumin</i>)
HSQC	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Corelation</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	inhibitorna koncentracija, 50%
IR	engl. <i>Infrared</i> (infracrveno elektromagnetsko zračenje)
<i>J</i>	konstanta sprege (NMR)
LAG	mljevenje potpomognuto tekućinom (engl. <i>Liquid-Assisted Grinding</i>)
LDA	litijev diizopropilamid
LDH	laktat dehidrogenaze
<i>LogBB</i>	model predviđa vrijednost logaritma particijskog koeficijenta C_{mozak}/C_{krv} kojim se kvantificira zadržavanje spoja u mozgu jednom kad je prošao BBB
LP5	Lipinskijevo pravilo pet (engl. <i>Lipinski's Rule Of Five</i>)
M	mol dm ⁻³

<i>m/z</i>	odnos mase i naboja u masenoj spektrometriji
<i>m</i>	multiplet u NMR spektroskopiji
MATE1	prijenosnik za izlučivanje više lijekova i toksina (engl. <i>Multidrug And Toxin Extrusion 1</i>)
Max.	maksimalna vrijednost
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney II
MeOH	metanol
Met	metabolizma
mg	miligram
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (engl. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
min	minuta
Min.	minimalna vrijednost
mL	mililitar
<i>MlogP</i>	Moriguchi model koeficijenta razdjeljenja (particije) između oktan-1-ola i vode (<i>logP</i>)
mmol	milimol
<i>M_r</i>	relativna molekulska masa
MS	masena spektrometrija (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij-bromid
<i>MUT_{xxx}</i>	mutagenost spoja na sojevima <i>S. typhimurium</i> bakterije TA98 (98), TA ₁₀₀ (100), TA1535 (1535) i TA97 ili TA1537 (97+1537)
<i>MUT_{mxxx}</i>	mutagenost spoja nakon aktivacije jetrenih mikrosomalnih enzima u štakora na sojevima <i>S. typhimurium</i> bakterije TA98 (98), TA ₁₀₀ (100), TA1535 (1535) i TA97 ili TA1537 (97+1537)
<i>MUT_{102+wp2}</i>	mutagenost čistog spoja na soju <i>S. typhimurium</i> bakterije TA102 ili soju <i>E. coli</i> bakterije WP2 uvrA
<i>MUT_{m102+wp2}</i>	mutagenost spoja nakon aktivacije jetrenih mikrosomalnih enzima u štakora na soju <i>S. typhimurium</i> bakterije TA102 ili soju <i>E. coli</i> bakterije WP2 uvrA
MW	mikrovalno zračenje
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butil-litij
NAG	<i>N</i> -acetil-glukozamin

NAM	<i>N</i> -acetil-muraminska kiselina
n.d.	nije detektirano
N-FrRotB	broj slobodno rotirajućih veza pri čemu barem jedan vezani atom mora biti sp^3 -hibridiziran (engl. <i>Number Of Freely Rotatable Bonds</i>)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	engl. <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
n.p.	nije provedeno
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like1 protein je veliki transmembranski glikoprotein koji se nalazi u lizosomalnoj membrani
n.t.	nije testirano
OATP 1B1/1B3/2B1	organski anionski transportni polipeptid 1B1/1B3/2B1 (engl. <i>Organic Anion-Transporting Polypeptide</i>)
OCT 1/2	organski kationski transporter (engl. <i>Organic Cation Transporter</i>)
p	pentet u NMR spektroskopiji
<i>P.aeruginosa</i>	lat. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pbf	pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilna zaštitna skupina
PBM	planetarni kuglični mlin (engl. <i>Planetary Ball Mill</i>)
PBP	protein koji veže penicilin (engl. <i>Penicillin Binding Protein</i>)
PD	farmakodinamika (engl. <i>Pharmacodynamic</i>)
<i>Perm_Skin</i>	permeabilnost kroz ljudsku kožu
Pgp	P-glikoprotein
Ph	fenilna skupina
PhysChem	fizikalno-kemijski i biofarmaceutski modul
<i>Pgp_Inh</i>	model predviđa je li spoj ili nije inhibitor pumpe P-gp
<i>Pgp_Substr</i>	model predviđa je li spoj ili nije supstrat membranske pumpe P-gp
PK	farmakokinetika (engl. <i>Pharmacokinetic</i>)
ppm	parts per million (dijelovi na milijun)
q	kvartet u NMR spektroskopiji
<i>Rat_Acute</i>	akutna toksičnost u štakora
<i>Rat_TD50</i>	kronična toksičnost u glodavaca
RBP	odnos koncentracije spoja u krvi i plazmi
R _f	faktor zadržavanja analita u kromatografiji (engl. <i>Retention Factor</i>)

RelPSA	relativna polarna površina
RuleOf5	broj parametara koji odstupaju od Lipinskijevog pravila pet
RuleOf5_Code	oznaka parametra koji odstupa od Lipinskijevog pravila pet
s	singlet u NMR spektroskopiji
<i>S. aureus</i>	lat. <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	lat. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S+CL_Mech	predviđa glavni put izlučivanja ispitivanog spoja (metabolizam/jetreni unos/bubrežna eliminacija),
S+fumic	udio slobodnog spoja u mikrosomima ljudske jetre
S+hum_fup	udio slobodnog/nevezanog spoja u ljudskoj plazmi
S+logP	koeficijent razdjeljenja (particije) između oktan-1-ola i vode (parametar lipofilnosti)
S+Peff	pasivna permeabilnost kroz stijenku jejunuma
S+Sw	topljivost u vodi
SD	standardna devijacija
SFC	superkritična fluidna kromatografija (engl. <i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
ShapeIndex	indeks oblika
SMILES	pojednostavljena specifikacija linijskog unosa podataka o strukturi molekula (engl. <i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i>)
t	triplet u NMR spektroskopiji
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsilil
TDDFT	vremenski ovisna teorija funkcionala gustoće (engl. <i>Time-Dependent Density Functional Theory</i>)
TFA	trifluoroctena kiselina (engl. <i>Trifluoroacetic Acid</i>)
Tf ₂ O	anhidrid trifluormetansulfonske kiseline
THF	tetrahidrofur
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMS	trimetilsilil
Tox	toksičnost
Tox_Code	ukupni rizik kada je toksičnost u pitanju
Tox_Risk	broj potencijalnih problema koje s toksičnošću može imati ispitivani spoj

TPSA	topološka ukupna polarna površina molekule (engl. <i>Topological Polar Surface Area</i>)
TSA	ukupna površina (engl. <i>Total Surface Area</i>)
TsCl	tosil-klorid
t_t	temperatura taljenja
UTP	UDP-glukoronozil-transferaze (uridin difosfat glukuronil-transferaza)
UV	ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje (engl. <i>Ultraviolet</i>)
VBM	vibracijski kuglični mlin (engl. <i>Vibrational Ball Mill</i>)
$\bar{x}$	aritmetička sredina
δ	kemijski pomak
μg	mikrogram
μL	mikrolitar

8. PRILOG

PRILOG 1 - HPLC enantioseparacija ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

Prilog 1.1. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

Tablica P1.1. Rezultati odjeljivanja enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v na deset odabranih polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza

β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12a	alil	Chiralcel OD-3	3,54	3,67	0,05	0,08	1,60	0,55
		Chirallica PST-10	3,48	4,48	0,14	0,47	3,36	3,59
		Chiralpak IB	3,68	3,81	0,1	0,13	1,30	0,66
		Chiralpak IC	3,82	3,82	0,16	0,16	1,00	0
		Chiralpak AD-3	5,17	6,2	0,63	0,96	1,52	1,37
		Chiralpak AS-3	3,48	3,65	0,07	0,12	1,71	1
		Chiralpak IA	4,15	4,91	0,27	0,5	1,85	1,97
		Chirallica PST-7	3,34	3,46	0,02	0,06	3,00	0
		Chirallica PST-8	3,84	3,84	0,25	0,25	1,00	0
		Chirallica PST-9	2,91	2,91	0,05	0,05	1,00	0
12b	heksil	Chiralcel OD-3	3,78	4,03	0,12	0,19	1,58	1,86
		Chirallica PST-10	3,67	5,13	0,20	0,68	3,40	6,05
		Chiralpak IB	3,85	4,08	0,15	0,21	1,40	1,47
		Chiralpak IC	4,09	4,15	0,23	0,26	1,13	0,22
		Chiralpak AD-3	7,58	13,33	1,39	3,2	2,30	3,11
		Chiralpak AS-3	3,69	4	0,14	0,24	1,71	1,5
		Chiralpak IA	5,71	6,21	0,75	0,9	1,20	0,2
		Chirallica PST-7	3,5	3,84	0,07	0,18	2,57	0,88
		Chirallica PST-8	4,51	4,51	0,47	0,47	1,00	0
		Chirallica PST-9	4,53	4,53	0,48	0,48	1,00	0
12c	ciklopentil	Chiralcel OD-3	3,63	3,84	0,01	0,14	14,00	1,68
		Chirallica PST-10	3,49	5,08	0,15	0,67	4,47	6,78
		Chiralpak IB	3,78	3,97	0,12	0,18	1,50	1,29
		Chiralpak AD-3	4,55	6,08	0,44	0,92	2,09	2,7
		Chiralpak AS-3	3,89	4,13	0,2	0,28	1,40	0,96
		Chiralpak IA	4	5,02	0,22	0,53	2,41	2,89
		Chiralpak IC	3,89	4,05	0,18	0,22	1,22	1,4
		Chirallica PST-7	3,41	3,71	0,05	0,14	2,80	0,88
		Chirallica PST-8	4,04	4,04	0,31	0,31	1,00	0
		Chirallica PST-9	4,03	4,03	0,32	0,32	1,00	0

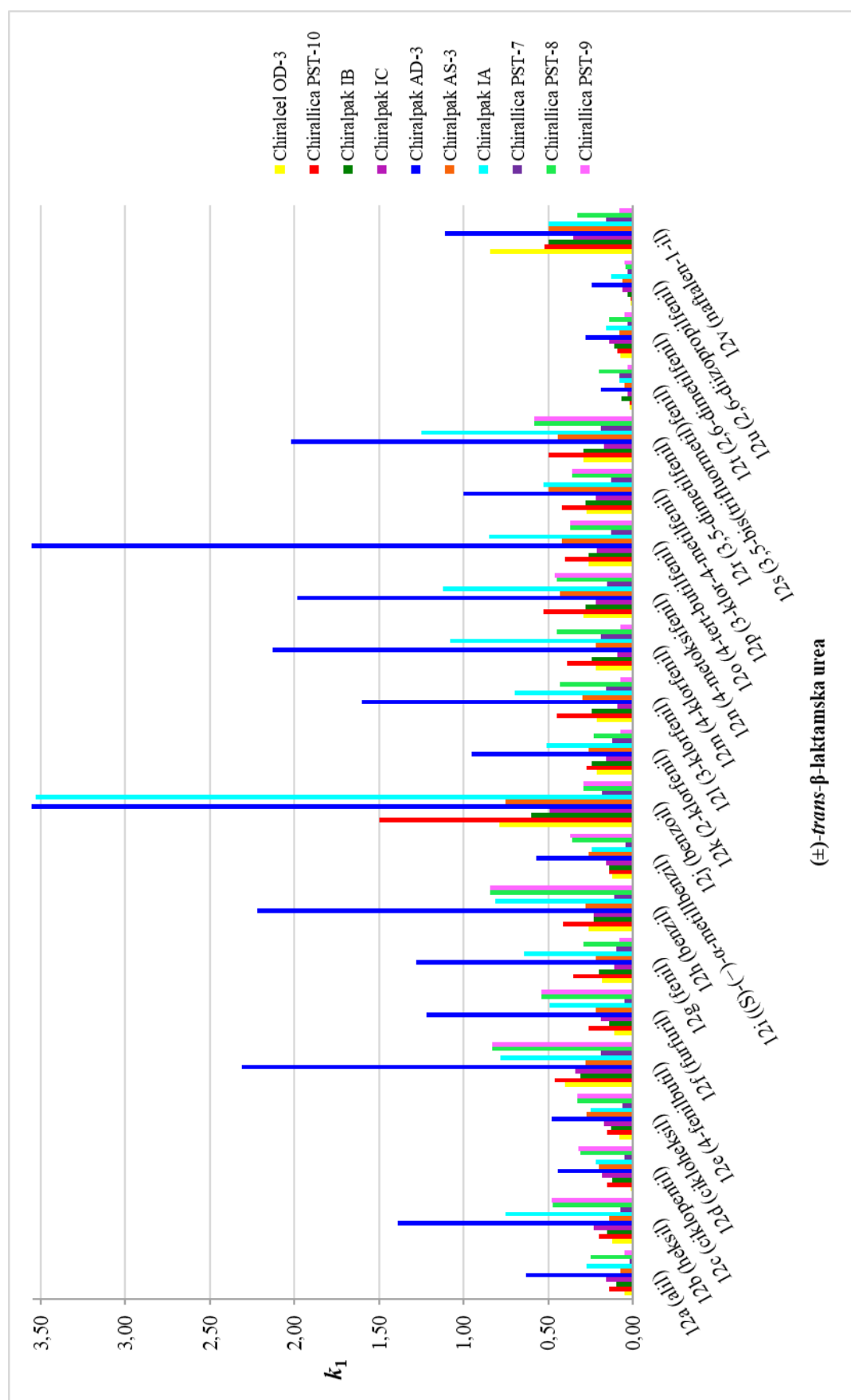
β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12d	cikloheksil	Chiralcel OD-3	3,64	3,99	0,08	0,18	2,25	2,7
		Chirallica PST-10	3,52	5,37	0,15	0,76	5,07	7,42
		Chiralpak IB	3,79	4,09	0,13	0,22	1,69	2,03
		Chiralpak AD-3	4,69	6,8	0,48	1,14	2,38	2,65
		Chiralpak AS-3	4,1	4,39	0,27	0,36	1,33	0,86
		Chiralpak IA	4,09	5,37	0,25	0,64	2,56	3,06
		Chiralpak IC	3,86	4,09	0,17	0,23	1,35	1,98
		Chirallica PST-7	3,47	3,83	0,06	0,18	3,00	0,95
		Chirallica PST-8	4,09	4,09	0,33	0,33	1,00	0
		Chirallica PST-9	4,08	4,08	0,33	0,33	1,00	0
12e	4-fenilbutil	Chiralcel OD-3	4,72	5,19	0,4	0,54	1,35	2,48
		Chirallica PST-10	4,47	6,52	0,46	1,14	2,48	6,64
		Chiralpak IB	4,39	4,7	0,31	0,4	1,29	1,8
		Chiralpak AD-3	10,49	10,49	2,31	2,31	1,00	0
		Chiralpak AS-3	4,14	4,75	0,28	0,47	1,68	2,15
		Chiralpak IA	5,84	7,43	0,78	1,27	1,63	1,42
		Chiralpak IC	4,43	4,43	0,34	0,34	1,00	0
		Chirallica PST-7	3,89	4,35	0,19	0,33	1,74	0,85
		Chirallica PST-8	5,63	7,57	0,83	1,47	1,77	0,76
		Chirallica PST-9	5,61	7,62	0,83	1,49	1,80	0,76
12f	furfuril	Chiralcel OD-3	3,74	3,9	0,11	0,15	1,36	1,28
		Chirallica PST-10	3,84	4,95	0,26	0,62	2,38	4,65
		Chiralpak IB	3,84	3,98	0,14	0,19	1,36	0,9
		Chiralpak AD-3	7,04	9,94	1,22	2,14	1,75	2,29
		Chiralpak AS-3	3,93	4,44	0,22	0,37	1,68	2,07
		Chiralpak IA	4,86	6,42	0,49	0,96	1,96	2,05
		Chiralpak IC	3,94	3,94	0,19	0,19	1,00	0
		Chirallica PST-7	3,41	3,81	0,05	0,17	3,40	1,08
		Chirallica PST-8	4,72	4,72	0,54	0,54	1,00	0
		Chirallica PST-9	4,73	4,73	0,54	0,54	1,00	0
12g	fenil	Chiralcel OD-3	3,98	4,72	0,18	0,40	2,22	4,15
		Chirallica PST-10	4,11	6,56	0,35	1,15	3,29	8,61
		Chiralpak IB	4,04	4,77	0,2	0,42	2,10	4,43
		Chiralpak AD-3	7,23	13,7	1,28	3,32	2,59	1,53
		Chiralpak AS-3	3,97	4,17	0,22	0,29	1,32	0,74
		Chiralpak IA	5,36	5,97	0,64	0,83	1,30	0,86
		Chiralpak IC	3,68	3,97	0,11	0,2	1,82	2,59
		Chirallica PST-7	3,6	4,6	0,1	0,41	4,10	1,76
		Chirallica PST-8	3,97	4,51	0,29	0,47	1,62	0,47
		Chirallica PST-9	2,82	2,82	0,08	0,08	1,00	0
12h	benzil	Chiralcel OD-3	4,25	4,51	0,26	0,34	1,31	1,69
		Chirallica PST-10	4,3	5,85	0,41	0,92	2,24	5,45
		Chiralpak IB	4,13	4,32	0,23	0,28	1,22	1,12
		Chiralpak AD-3	10,2	15,63	2,22	3,93	1,77	2,28
		Chiralpak AS-3	4,13	4,76	0,28	0,47	1,68	2,2
		Chiralpak IA	5,91	8,72	0,81	1,67	2,06	1,85
		Chiralpak IC	4,08	4,08	0,23	0,23	1,00	0
		Chirallica PST-7	3,62	5,04	0,11	0,54	4,91	1,82
		Chirallica PST-8	5,65	5,65	0,84	0,84	1,00	0
		Chirallica PST-9	5,64	5,64	0,84	0,84	1,00	0

β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	Chiralcel OD-3	3,77	3,98	0,12	0,18	1,50	1,56
		Chirallica PST-10	3,49	4,79	0,14	0,57	4,07	5,74
		Chiralpak IB	3,83	4	0,14	0,19	1,36	1,1
		Chiralpak AD-3	4,97	7,8	0,57	1,46	2,56	2,42
		Chiralpak AS-3	4,08	4,45	0,26	0,38	1,46	1,11
		Chiralpak IA	4,04	5,74	0,24	0,76	3,17	2,84
		Chiralpak IC	3,82	3,92	0,16	0,18	1,13	0,76
		Chirallica PST-7	3,39	3,77	0,04	0,16	4,00	1,06
		Chirallica PST-8	4,19	4,19	0,36	0,36	1,00	0
		Chirallica PST-9	4,2	4,2	0,37	0,37	1,00	0
12j	benzoil	Chiralcel OD-3	6,03	7,23	0,79	1,14	1,44	3,9
		Chirallica PST-10	7,64	8,21	1,5	1,69	1,13	1,13
		Chiralpak IB	5,37	5,8	0,6	0,73	1,22	1,92
		Chiralpak AD-3	24,45	25,45	7,03	7,03	1,00	0
		Chiralpak AS-3	5,65	9,52	0,75	1,95	2,60	5,03
		Chiralpak IA	14,81	14,81	3,53	3,53	1,00	0
		Chiralpak IC	4,94	6,3	0,49	0,9	1,84	7,39
		Chirallica PST-7	3,86	4,03	0,18	0,24	1,33	0,37
		Chirallica PST-8	3,96	4,31	0,29	0,4	1,38	0,42
		Chirallica PST-9	3,95	4,29	0,29	0,4	1,38	0,41
12k	2-klorfenil	Chiralcel OD-3	4,11	4,42	0,21	0,31	1,48	1,79
		Chirallica PST-10	3,87	5,21	0,27	0,71	2,63	5,88
		Chiralpak IB	4,08	4,41	0,22	0,31	1,41	2,10
		Chiralpak AD-3	6,17	9,04	0,95	1,85	1,95	2,54
		Chiralpak AS-3	4,1	4,54	0,26	0,4	1,54	1,58
		Chiralpak IA	4,95	5,8	0,51	0,77	1,51	1,66
		Chiralpak IC	3,82	4,07	0,16	0,23	1,44	2,09
		Chirallica PST-7	3,65	3,99	0,12	0,22	1,83	0,95
		Chirallica PST-8	3,79	4,16	0,23	0,36	1,57	0,45
		Chirallica PST-9	2,83	2,83	0,07	0,07	1,00	0
12l	3-klorfenil	Chiralcel OD-3	4,11	5,13	0,21		2,48	5,23
		Chirallica PST-10	4,43	7,87	0,45	1,58	3,51	9,65
		Chiralpak IB	4,17	5,13	0,24	0,53	2,21	5,47
		Chiralpak AD-3	8,23	15,68	1,6	3,95	2,47	1,44
		Chiralpak AS-3	4,22	4,46	0,3	0,37	1,23	0,63
		Chiralpak IA	5,57	6,71	0,7	1,05	1,50	1,27
		Chiralpak IC	3,62	3,87	0,09	0,17	1,89	2,1
		Chirallica PST-7	3,8	6,51	0,16	1	6,25	2,13
		Chirallica PST-8	4,39	5,73	0,43	0,87	2,02	0,93
		Chirallica PST-9	2,83	2,83	0,07	0,07	1,00	0
12m	4-klorfenil	Chiralcel OD-3	4,13	5,05	0,22	0,5	2,27	4,62
		Chirallica PST-10	4,23	7,3	0,39	1,39	3,56	9,33
		Chiralpak IB	4,16	5,06	0,24	0,51	2,13	5,20
		Chiralpak AD-3	9,91	21,84	2,13	5,89	2,77	2,14
		Chiralpak AS-3	3,97	4,27	0,22	0,32	1,45	1,13
		Chiralpak IA	6,76	7,44	1,08	1,27	1,18	0,49
		Chiralpak IC	3,6	3,88	0,09	0,17	1,89	2,44
		Chirallica PST-7	3,89	5,57	0,19	0,71	3,74	1,81
		Chirallica PST-8	4,45	5,15	0,45	0,68	1,51	0,2
		Chirallica PST-9	2,83	2,83	0,07	0,07	1,00	0

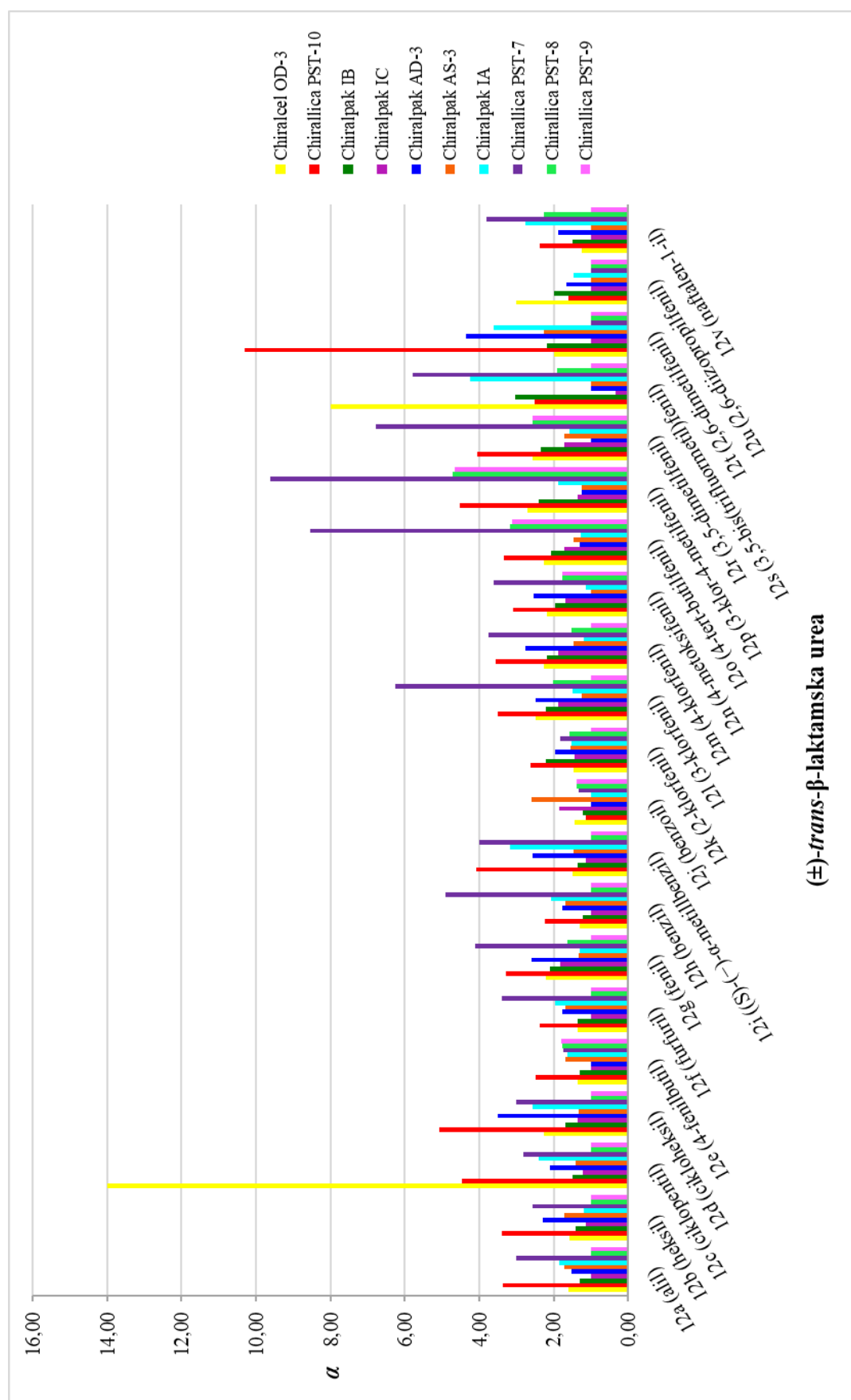
β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12n	4-metoksifenil	Chiralcel OD-3	4,37	5,49	0,29	0,63	2,17	5,62
		Chirallica PST-10	4,67	8,03	0,53	1,63	3,08	9,19
		Chiralpak IB	4,3	5,21	0,28	0,55	1,96	4,85
		Chiralpak AD-3	9,43	19,17	1,98	5,05	2,55	2,19
		Chiralpak AS-3	4,6	4,6	0,43	0,43	1,00	0
		Chiralpak IA	6,93	7,43	1,12	1,27	1,13	0,2
		Chiralpak IC	4,05	4,54	0,22	0,37	1,68	3,54
		Chirallica PST-7	3,75	5,04	0,15	0,54	3,60	1,71
		Chirallica PST-8	4,46	5,51	0,45	0,79	1,76	0,66
		Chirallica PST-9	4,48	5,53	0,46	0,81	1,76	0,6
12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	Chiralcel OD-3	4,26	5,36	0,26	0,59	2,27	5,26
		Chirallica PST-10	4,27	7,12	0,4	1,33	3,33	8,54
		Chiralpak IB	4,23	5,16	0,26	0,54	2,08	4,96
		Chiralpak AD-3	16,97	21,11	4,35	5,66	1,30	nm
		Chiralpak AS-3	4,6	5,21	0,42	0,61	1,45	1,15
		Chiralpak IA	6,05	6,76	0,85	1,07	1,26	0,73
		Chiralpak IC	3,99	4,51	0,21	0,36	1,71	3,61
		Chirallica PST-7	3,68	6,87	0,13	1,11	8,54	2
		Chirallica PST-8	4,21	6,65	0,37	1,17	3,16	1,27
		Chirallica PST-9	4,2	6,58	0,37	1,15	3,11	1,21
12p	3-klor-4-metilfenil	Chiralcel OD-3	4,28	5,83	0,27	0,73	2,70	7,45
		Chirallica PST-10	4,33	8,86	0,42	1,9	4,52	11,62
		Chiralpak IB	4,29	5,63	0,28	0,67	2,39	6,84
		Chiralpak AD-3	6,33	7,1	1	1,24	1,24	0,3
		Chiralpak AS-3	4,85	5,24	0,5	0,62	1,24	0,67
		Chiralpak IA	4,99	6,54	0,53	1	1,89	2,29
		Chiralpak IC	4,03	4,32	0,22	0,3	1,36	2,12
		Chirallica PST-7	3,7	7,32	0,13	1,25	9,62	2,03
		Chirallica PST-8	4,18	8,28	0,36	1,7	4,72	1,79
		Chirallica PST-9	4,17	8,19	0,36	1,68	4,67	1,76
12r	3,5-dimetilfenil	Chiralcel OD-3	4,36	5,87	0,29	0,74	2,55	7,13
		Chirallica PST-10	4,56	9,22	0,5	2,02	4,04	11,32
		Chiralpak IB	4,34	5,64	0,29	0,68	2,34	6,52
		Chiralpak AD-3	9,56	9,56	2,02	2,02	1,00	0
		Chiralpak AS-3	4,65	5,64	0,44	0,75	1,70	2,16
		Chiralpak IA	7,35	9,72	1,25	1,97	1,58	0,83
		Chiralpak IC	3,88	4,27	0,17	0,29	1,71	2,94
		Chirallica PST-7	3,88	7,45	0,19	1,29	6,79	1,94
		Chirallica PST-8	4,85	7,65	0,58	1,49	2,57	1,25
		Chirallica PST-9	4,83	7,58	0,58	1,48	2,55	1,2
12s	3,5-bis(trifluorometil)fenil	Chiralcel OD-3	3,45	3,92	0,02	0,16	8,00	3,16
		Chirallica PST-10	3,1	4,62	0,02	0,51	25,50	7,32
		Chiralpak IB	3,58	4,03	0,07	0,20	3,05	3,16
		Chiralpak AD-3	3,78	3,78	0,19	0,19	1,00	0
		Chiralpak AS-3	3,42	3,42	0,05	0,05	1,00	0
		Chiralpak IA	3,52	4,39	0,08	0,34	4,25	2,55
		Chiralpak IC	3,2	3,27	-	-	0,33	0,56
		Chirallica PST-7	3,23	4,33	0,08	0,44	5,78	1,68
		Chirallica PST-8	3,68	4,23	0,2	0,38	1,90	0,51
		Chirallica PST-9	2,78	2,78	0,03	0,03	1,00	0

β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12t	2,6-dimetilfenil	Chiralcel OD-3	3,61	3,85	0,07	0,14	2,00	1,61
		Chirallica PST-10	3,32	4,02	0,09	9,32	103,56	3,76
		Chiralpak IB	3,72	4,17	0,11	0,24	2,18	2,3
		Chiralpak AD-3	4,04	7,05	0,28	1,22	4,36	2,1
		Chiralpak AS-3	3,51	3,84	0,08	0,18	2,25	1,54
		Chiralpak IA	3,79	5,15	0,16	0,58	3,63	2,55
		Chiralpak IC	3,76	3,76	0,14	0,14	1,00	0
		Chirallica PST-7	3,36	3,36	0,03	0,03	1,00	0
		Chirallica PST-8	3,51	3,51	0,14	0,14	1,00	0
		Chirallica PST-9	2,81	2,81	0,05	0,05	1,00	0
12u	2,6-diizopropilfenil	Chiralcel OD-3	3,36	3,47	0,01	0,03	3,00	0,92
		Chirallica PST-10	3,05	3,52	0,01	0,16	16,00	2,66
		Chiralpak IB	3,46	3,57	0,03	0,06	2,00	0,74
		Chiralpak IC	3,5	3,5	0,06	0,06	1,00	0
		Chiralpak AD-3	3,94	4,45	0,24	0,4	1,67	0,1
		Chiralpak AS-3	3,43	3,43	0,06	0,06	1,00	0
		Chiralpak IA	3,71	3,9	0,13	0,19	1,46	0,48
		Chirallica PST-7	3,15	3,15	0,03	0,03	1,00	0
		Chirallica PST-8	3,21	3,21	0,04	0,04	1,00	0
		Chirallica PST-9	3,2	3,2	0,05	0,05	1,00	0
12v	1-naftil	Chiralcel OD-3	6,22	6,94	0,84	1,05	1,25	2,12
		Chirallica PST-10	4,65	6,8	0,52	1,23	2,37	6,92
		Chiralpak IB	5,04	5,86	0,50	0,74	1,48	3,71
		Chiralpak IC	4,46	4,46	0,35	0,35	1,00	0
		Chiralpak AD-3	6,68	9,75	1,11	2,07	1,86	1,95
		Chiralpak AS-3	4,86	4,86	0,5	0,5	1,00	0
		Chiralpak IA	4,91	7,79	0,5	1,38	2,76	3,34
		Chirallica PST-7	3,78	5,26	0,16	0,61	3,81	1,95
		Chirallica PST-8	4,09	5,36	0,33	0,75	2,27	1,09
		Chirallica PST-9	2,84	2,84	0,08	0,08	1,00	0

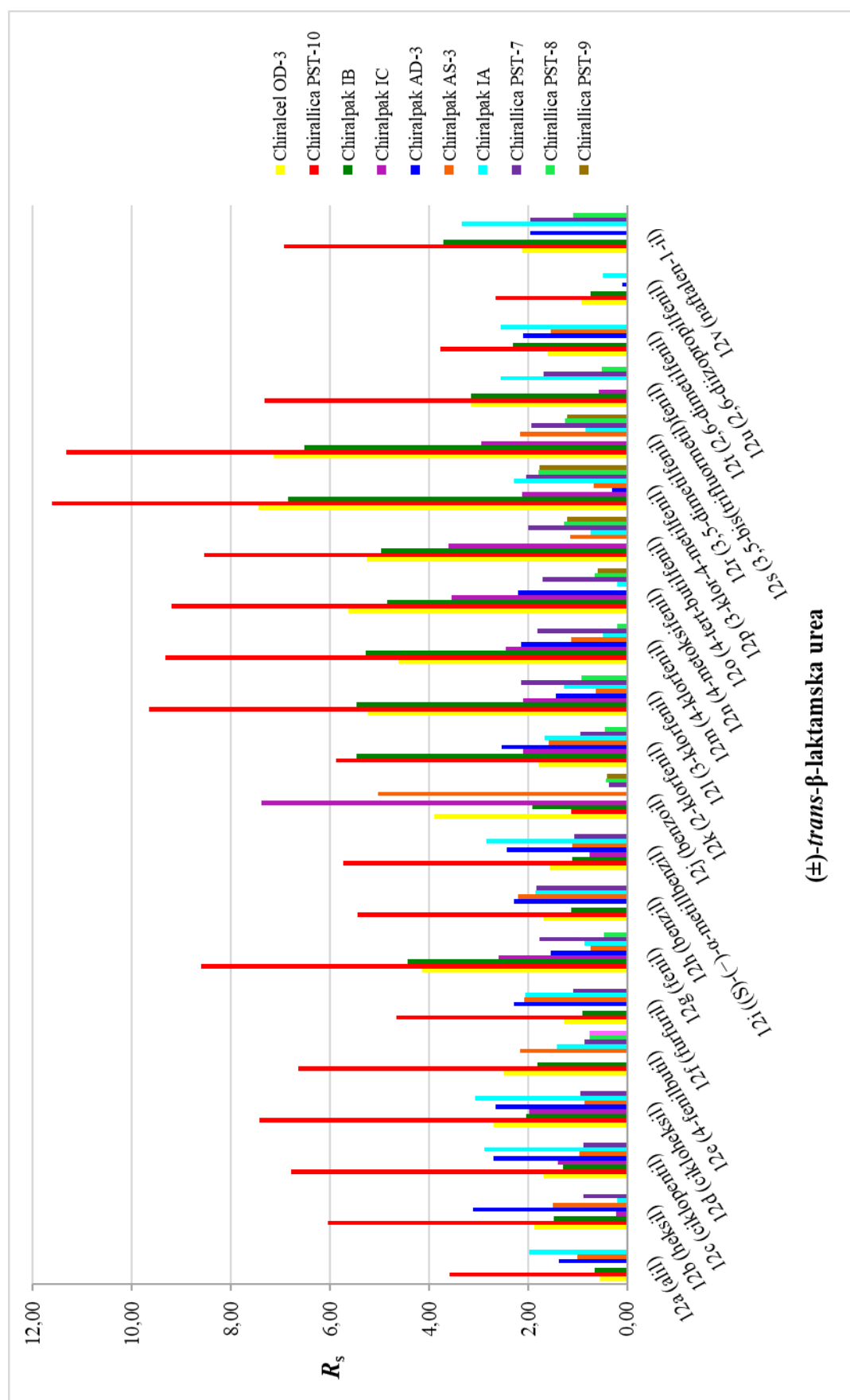
Kolone: Chiralpak AD-3, Chiralpak IA, Chiralcel OD-3, Chiralpak IB, Chiralcel OJ, Chirallica PST-10, Chiralpak IC, Chirallica PST-7, Chirallica PST-8 i Chirallica PST-9, pokretna faza metanol, protok 1 mL min⁻¹, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 30 °C. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



Slika P1.1. Usporedba faktora zadržavanja proizlazećih enantiomera $(\pm)$ -trans- β -laktamskih urea **12a-v** na deset polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza



Slika P1.2. Usporedba separacijskih faktora α enantiomera $(\pm)$ -trans- β -laktamskih urea **12a-v** na deset polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza



Slika P1.3. Usporedba razlučivanja R_s enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na deset polisaharidnih kiralnih nepokretnih faza

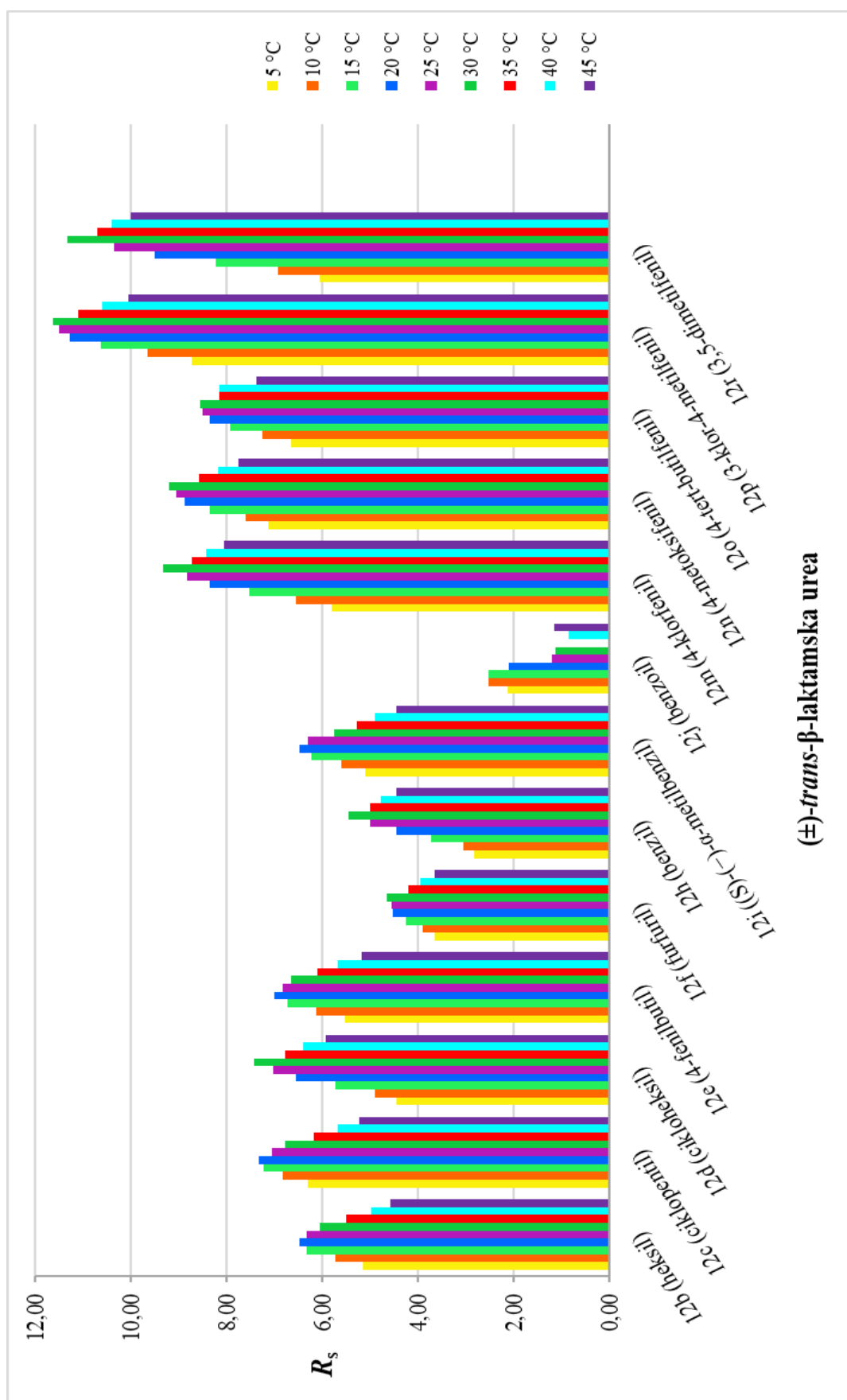
Prilog 1.2. Utjecaj temperature na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v****Tablica P1.2.** Utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12b-f**, **12h-j** i **12m-r** na koloni Chirallica PST-10 primjenom HPLC uz metanol kao pokretnu fazu

β -Laktamska urea	Supstituent	Temperatura kolone ($^{\circ}\text{C}$)	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12b	heksil	5	4,10	7,10	0,29	1,14	3,93	5,15
		10	4,02	6,60	0,28	1,09	3,89	5,72
		15	3,92	6,10	0,26	0,96	3,69	6,32
		20	3,82	5,70	0,23	0,84	3,65	6,48
		25	3,75	5,37	0,22	0,74	3,36	6,32
		30	3,67	5,13	0,20	0,68	3,40	6,05
		35	3,59	4,84	0,19	0,60	3,16	5,50
		40	3,54	4,63	0,17	0,54	3,18	4,98
		45	3,48	4,43	0,16	0,48	3,00	4,56
12c	ciklopentil	5	3,78	6,62	0,19	1,09	5,74	6,30
		10	3,72	6,25	0,18	0,98	5,44	6,81
		15	3,66	5,87	0,17	0,88	5,18	7,22
		20	3,59	5,55	0,16	0,79	4,94	7,31
		25	3,55	5,28	0,15	0,71	4,73	7,05
		30	3,49	5,08	0,15	0,67	4,47	6,78
		35	3,44	4,79	0,13	0,58	4,46	6,16
		40	3,4	4,6	0,13	0,53	4,08	5,67
		45	3,35	4,42	0,12	0,48	4,00	5,22
12d	cikloheksil	5	3,98	7,00	0,25	1,21	4,84	4,46
		10	3,92	6,61	0,25	1,10	4,40	4,90
		15	3,82	6,23	0,22	1,00	4,55	5,71
		20	3,71	5,89	0,2	0,9	4,50	6,54
		25	3,62	5,59	0,18	0,81	4,50	7,01
		30	3,52	5,37	0,15	0,76	5,07	7,42
		35	3,47	5,05	0,15	0,67	4,47	6,76
		40	3,42	4,83	0,14	0,6	4,29	6,4
		45	3,37	4,62	0,13	0,55	4,23	5,93
12e	4-fenilbutil	5	5,33	9,68	0,68	2,05	3,01	5,53
		10	5,16	8,92	0,64	1,83	2,86	6,11
		15	4,96	8,14	0,59	1,61	2,73	6,73
		20	4,77	7,50	0,54	1,42	2,63	7,00
		25	4,62	6,95	0,50	1,26	2,52	6,81
		30	4,47	6,52	0,46	1,14	2,48	6,64
		35	4,34	6,08	0,43	1,01	2,35	6,09
		40	4,23	5,75	0,41	0,91	2,22	5,68
		45	4,13	5,45	0,38	0,82	2,16	5,17

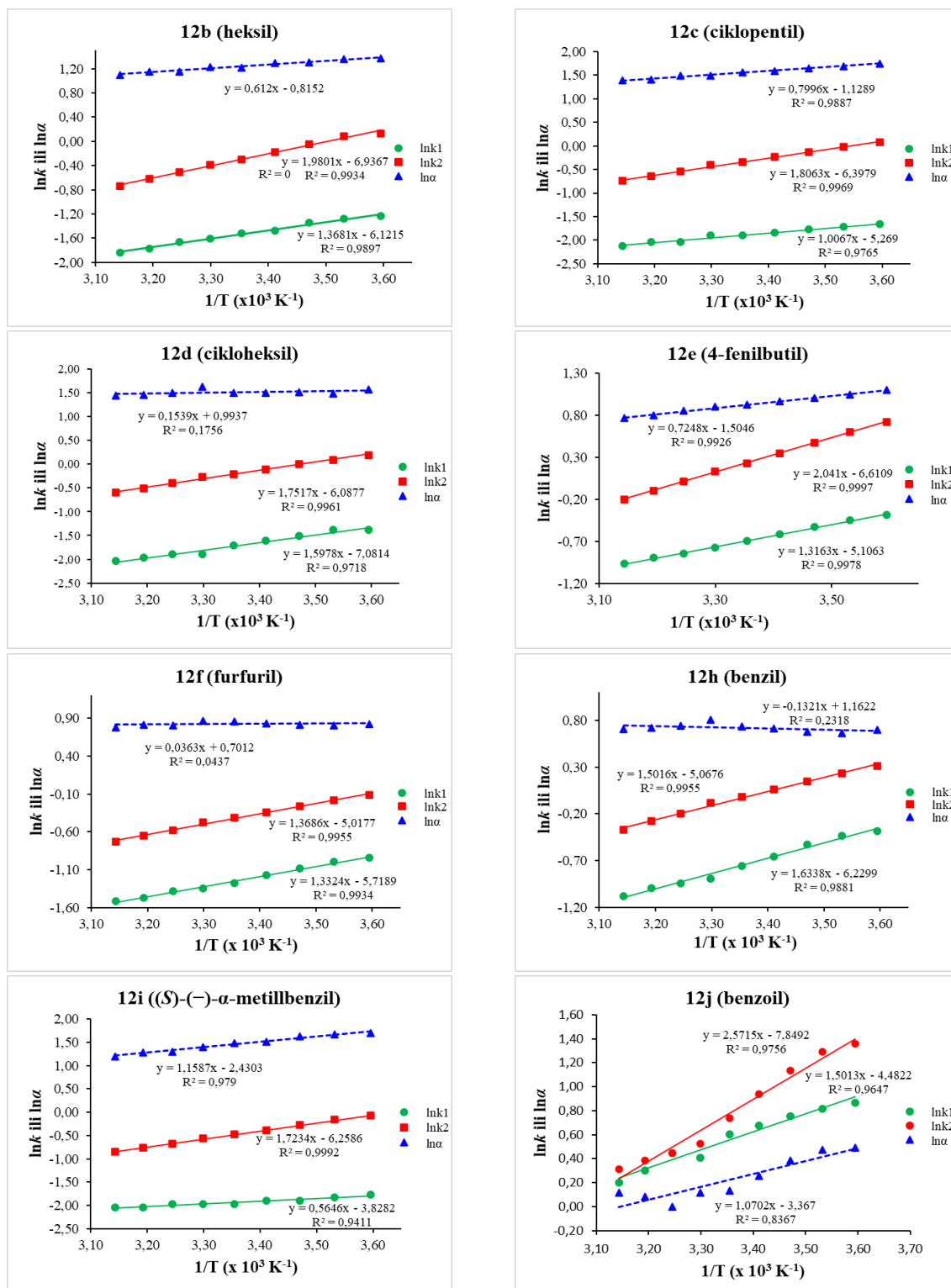
β -Laktamska urea	Supstituent	Temperatura kolone (°C)	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12f	furfuril	5	4,39	6,01	0,39	0,89	2,28	3,65
		10	4,31	5,77	0,37	0,83	2,24	3,90
		15	4,18	5,52	0,34	0,77	2,26	4,26
		20	4,05	5,30	0,31	0,71	2,29	4,52
		25	3,96	5,10	0,28	0,66	2,36	4,54
		30	3,84	4,95	0,26	0,62	2,38	4,65
		35	3,78	4,72	0,25	0,56	2,24	4,21
		40	3,71	4,57	0,23	0,52	2,26	3,95
		45	3,65	4,41	0,22	0,48	2,18	3,66
12h	benzil	5	5,31	7,51	0,68	1,37	2,01	2,83
		10	5,2	7,11	0,65	1,26	1,94	3,05
		15	4,96	6,74	0,59	1,16	1,97	3,72
		20	4,71	6,39	0,52	1,06	2,04	4,44
		25	4,51	6,08	0,47	0,98	2,09	5,00
		30	4,3	5,85	0,41	0,92	2,24	5,45
		35	4,21	5,51	0,39	0,82	2,10	4,99
		40	4,11	5,29	0,37	0,76	2,05	4,77
		45	4,01	5,07	0,34	0,69	2,03	4,45
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	5	3,7	6,13	0,17	0,93	5,47	5,09
		10	3,66	5,84	0,16	0,85	5,31	5,59
		15	3,6	5,50	0,15	0,76	5,07	6,23
		20	3,55	5,22	0,15	0,68	4,53	6,46
		25	3,52	4,98	0,14	0,62	4,43	6,30
		30	3,49	4,79	0,14	0,57	4,07	5,74
		35	3,44	4,58	0,14	0,51	3,64	5,27
		40	3,41	4,42	0,13	0,47	3,62	4,89
		45	3,37	4,27	0,13	0,43	3,31	4,45
12j	benzoil	5	10,73	15,51	2,38	3,89	1,63	2,12
		10	10,27	14,61	2,26	3,64	1,61	2,52
		15	9,74	12,82	2,12	3,11	1,47	2,53
		20	9,21	11,01	1,97	2,55	1,29	2,09
		25	8,7	9,52	1,83	2,09	1,14	1,21
		30	7,64	8,21	1,50	1,69	1,13	1,13
		35	7,77	7,77	1,56	1,56	1,00	0
		40	7,07	7,43	1,35	1,47	1,09	0,85
		45	6,64	7,08	1,22	1,37	1,12	1,15
12m	4-klorfenil	5	5,06	9,45	0,60	1,98	3,30	5,80
		10	4,94	8,95	0,57	1,84	3,23	6,55
		15	4,75	8,46	0,52	1,71	3,29	7,52
		20	4,57	8,03	0,47	1,59	3,38	8,34
		25	4,42	7,62	0,44	1,47	3,34	8,81
		30	4,23	7,30	0,39	1,39	3,56	9,33
		35	4,18	6,84	0,38	1,26	3,32	8,71
		40	4,1	6,51	0,36	1,16	3,22	8,42
		45	4,02	6,2	0,34	1,07	3,15	8,05

β -Laktamska urea	Supstituent	Temperatura kolone (°C)	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12n	4-metoksifenil	5	5,67	11,25	0,86	2,69	3,13	7,11
		10	5,51	10,47	0,75	2,32	3,09	7,59
		15	5,28	9,75	0,69	2,13	3,09	8,35
		20	5,05	9,08	0,63	1,93	3,06	8,88
		25	4,86	8,47	0,58	1,75	3,02	9,05
		30	4,67	8,03	0,53	1,63	3,08	9,19
		35	4,55	7,41	0,50	1,44	2,88	8,56
		40	4,43	6,98	0,47	1,32	2,81	8,17
		45	4,32	6,58	0,44	1,20	2,73	7,74
12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	5	4,79	9,33	0,51	1,94	3,80	6,64
		10	4,68	8,80	0,49	1,79	3,65	7,25
		15	4,57	8,31	0,46	1,66	3,61	7,92
		20	4,46	7,85	0,44	1,53	3,48	8,35
		25	4,36	7,42	0,42	1,41	3,36	8,5
		30	4,27	7,12	0,4	1,33	3,33	8,54
		35	4,16	6,64	0,37	1,19	3,22	8,14
		40	4,16	6,64	0,38	1,2	3,16	8,14
		45	3,99	5,98	0,33	1,00	3,03	7,38
12p	3-klor-4-metilfenil	5	4,84	12,13	0,53	2,83	5,34	8,73
		10	4,73	11,37	0,50	2,61	5,22	9,64
		15	4,61	10,63	0,48	2,41	5,02	10,6
		20	4,50	9,95	0,45	2,21	4,91	11,2
		25	4,40	9,29	0,43	2,02	4,70	11,4
		30	4,33	8,86	0,42	1,90	4,52	11,6
		35	4,2	8,07	0,39	1,66	4,26	11,0
		40	4,12	7,55	0,37	1,51	4,08	10,6
		45	4,03	7,05	0,35	1,36	3,89	10,0
12r	3,5-dimetilfenil	5	5,61	12,88	0,77	3,06	3,97	6,05
		10	5,47	12,09	0,74	2,84	3,84	6,93
		15	5,24	11,26	0,68	2,61	3,84	8,21
		20	5,01	10,48	0,62	2,38	3,84	9,50
		25	4,81	9,78	0,56	2,17	3,88	10,3
		30	4,56	9,22	0,50	2,02	4,04	11,3
		35	4,50	8,53	0,49	1,81	3,69	10,6
		40	4,39	7,99	0,46	1,65	3,59	10,3
		45	4,29	7,50	0,43	1,51	3,51	9,98

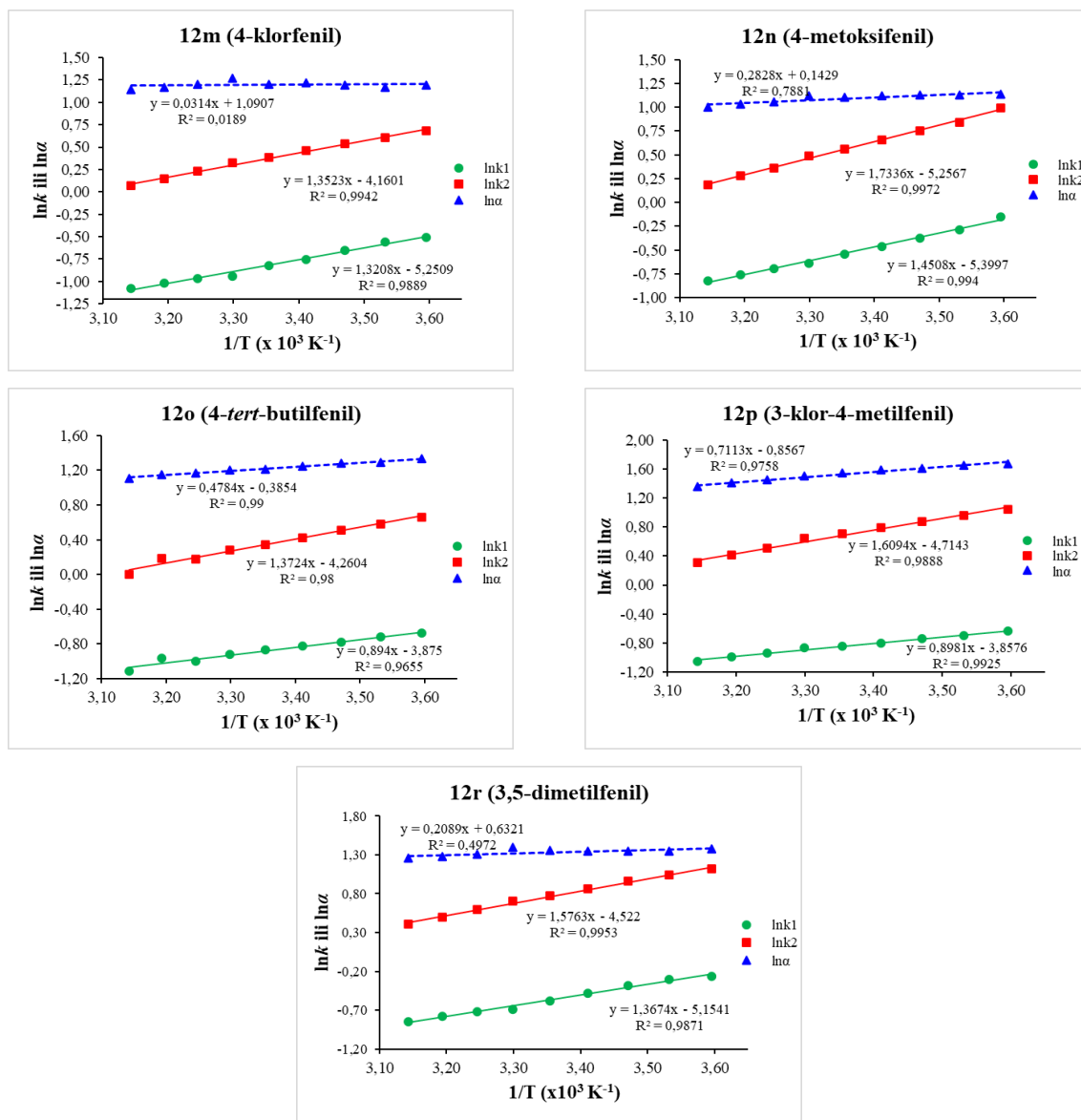
Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: metanol, protok 1 mL min⁻¹, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 5 - 45 °C. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



Slika P1.4. Ujecaj temperature kolone na razlučivanje R_s enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12b-f, 12h-j i 12m-r



Slika P1.5. Ovisnost $\ln k$ ili $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12b-f** i **12h-j** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza 100% MeOH, protok 1 mL min⁻¹, UV detekcija 254 nm i temperatura kolone 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 i 45 °C



Slika P1.6. Ovisnost $\ln k$ ili $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12m-r** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza 100% MeOH, protok 1 mL min $^{-1}$, UV detekcija 254 nm i temperatura kolone 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 i 45 °C

Tablica P1.3. Termodinamički parametri ispitivanih (±)-*trans*-β-laktamskih urea **12b-f**, **12h-j** i **12m-r**

Spoj	$\ln k = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R$	R^2	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/molK)	$\ln \alpha = -\Delta\Delta H^\circ/RT + \Delta\Delta S^\circ/R$	R^2	$\Delta\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/molK)	T_{iso} (K)
12b	$\ln k_1 = 1,3681x - 6,1215$	0,9934	-11,38	-50,90	$\ln \alpha = 0,612x - 0,8152$	0,9628	-5,09	-6,78	750,74
	$\ln k_2 = 1,9801x - 6,9367$	0,9897	-16,46	-57,67					
12c	$\ln k_1 = 1,0067x - 5,269$	0,9765	-8,37	-43,81	$\ln \alpha = 0,7996x - 1,1289$	0,9887	-6,65	-9,39	708,30
	$\ln k_2 = 1,8063x - 6,3979$	0,9969	-15,02	-53,20					
12d	$\ln k_1 = 1,5978x - 7,0814$	0,9718	-13,28	-58,88	$\ln \alpha = 0,1539x + 0,9937$ Nije linearna	0,1756	-	-	-
	$\ln k_2 = 1,7517x - 6,0877$	0,9961	-14,56	-50,62					
12e	$\ln k_1 = 1,3163x - 5,1063$	0,9978	-10,94	-42,46	$\ln \alpha = 0,7248x - 1,5046$	0,9926	-6,03	-12,51	481,72
	$\ln k_2 = 2,041x - 6,6109$	0,9997	-16,97	-54,97					
12f	$\ln k_1 = 1,3324x - 5,7189$	0,9934	-11,08	-47,55	$\ln \alpha = 0,0363x + 0,7012$ Nije linearna	0,0437	-	-	-
	$\ln k_2 = 1,3686x - 5,0177$	0,9955	-11,38	-41,72					
12h	$\ln k_1 = 1,6338x - 6,2299$	0,9881	-13,58	-51,80	$\ln \alpha = -0,1321x + 1,1622$ Nije linearna	0,2318	-	-	-
	$\ln k_2 = 1,5016x - 5,0676$	0,9955	-12,49	-42,13					
12i	$\ln k_1 = 0,5646x - 3,8282$	0,9411	-4,69	-31,83	$\ln \alpha = 1,1587x - 2,4303$	0,979	-9,63	-20,21	476,77
	$\ln k_2 = 1,7234x - 6,2586$	0,9992	-14,33	-52,04					
12j	$\ln k_1 = 1,5013x - 4,4822$	0,9647	-12,48	-37,27	$\ln \alpha = 1,0702x - 3,367$	0,8367	-8,90	-27,99	317,85
	$\ln k_2 = 2,5715x - 7,8492$	0,9756	-21,38	-65,26					
12m	$\ln k_1 = 1,3208x - 5,2509$	0,9889	-10,98	-43,66	$\ln \alpha = 0,0314x + 1,0907$ Nije linearna	0,0189	-	-	-
	$\ln k_2 = 1,3523x - 4,1601$	0,9942	-11,24	-34,59					
12n	$\ln k_1 = 1,4508x - 5,3997$	0,994	-12,06	-44,90	$\ln \alpha = 0,2828x + 0,1429$ nije linearna	0,7881	-	-	-
	$\ln k_2 = 1,7336x - 5,2567$	0,9972	-14,41	-43,71					
12o	$\ln k_1 = 0,894x - 3,875$	0,9655	-7,43	-32,22	$\ln \alpha = 0,4784x - 0,3854$	0,99	-3,98	-3,20	1241,31
	$\ln k_2 = 1,3724x - 4,2604$	0,98	-11,41	-35,42					
12p	$\ln k_1 = 0,8981x - 3,8576$	0,9925	-7,47	-32,07	$\ln \alpha = 0,7113x - 0,8567$	0,9758	-5,91	-7,12	830,28
	$\ln k_2 = 1,6094x - 4,7143$	0,9888	-13,38	-39,20					
12r	$\ln k_1 = 1,3674x - 5,1541$	0,9871	-11,37	-42,85	$\ln \alpha = 0,2089x + 0,6321$ Nije linearna	0,4972	-	-	-
	$\ln k_2 = 1,5763x - 4,522$	0,9953	-13,11	-37,60					

Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: metanol, protok 1 mLmin⁻¹, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 5 - 45 °C.

ΔH° - entalpija prijenosa otopljenosti tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, ΔS° - entropija prijenosa otopljenosti tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, T - apsolutna temperatura, R - opća plinska konstanta ($R=8,314472$ J/molK). $\Delta\Delta H^\circ$ - razlika slobodne entropije drugoizlazećeg i prvoizlazećeg enantiomera ($\Delta\Delta H^\circ = \Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$), $\Delta\Delta S^\circ$ - razlika slobodne entropije između dva enantiomera ($\Delta\Delta S^\circ = \Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$) i T_{iso} - izoenantioselektivna temperatura.

PRILOG 2 - SFC enantioseparacija ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

Prilog 2.1. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

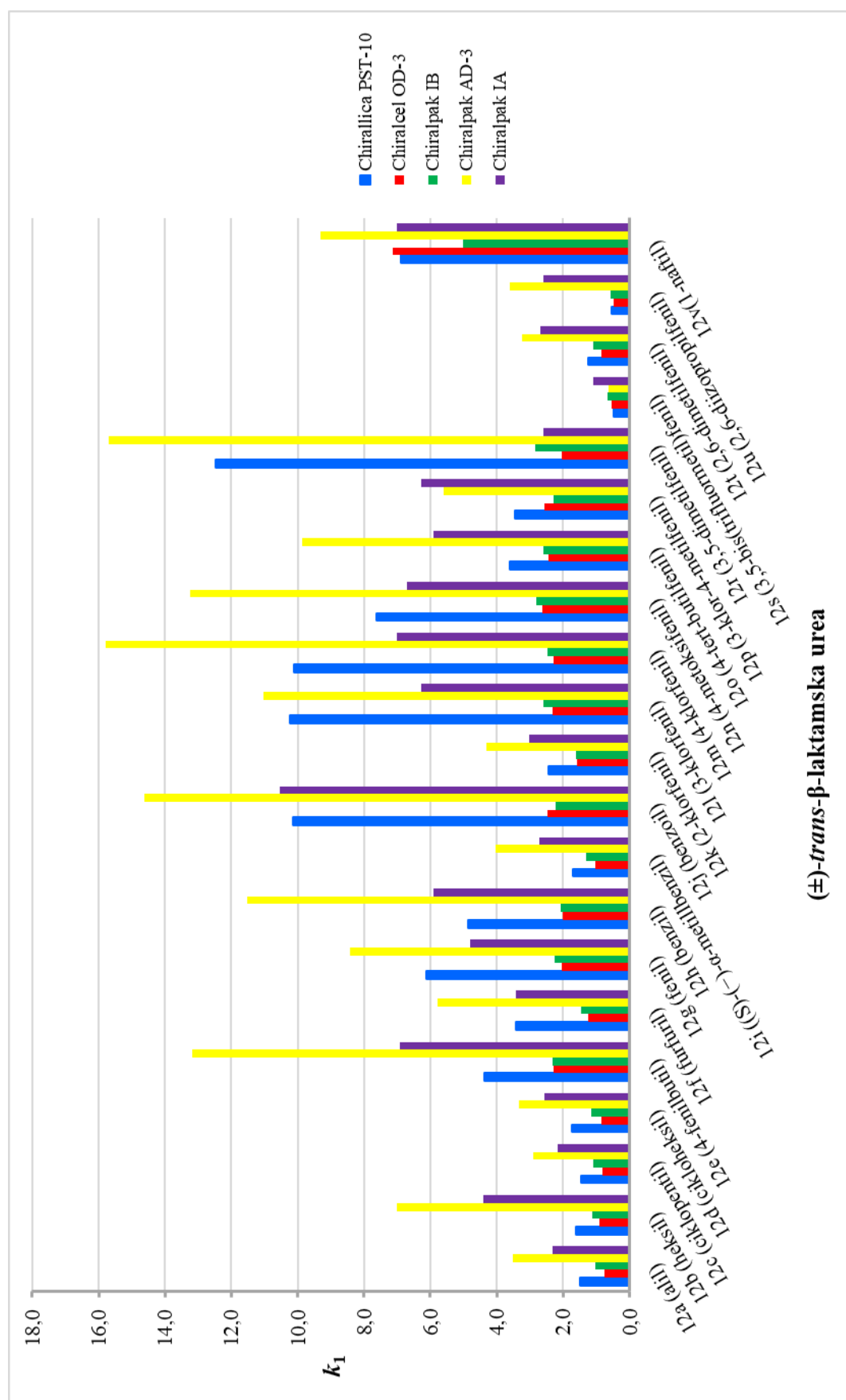
Tablica P2.1. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12a	alil	Chirallica PST-10	1,69	2,85	1,49	3,19	2,15	6,24
		Chiralcel OD-3	1,34	1,62	0,75	1,11	1,49	2,54
		Chiralpak IB	1,56	1,82	1,02	1,36	1,33	2,33
		Chiralpak AD-3	3,37	4,89	3,52	5,55	1,58	5,06
		Chiralpak IA	2,49	3,41	2,32	3,54	1,53	4,16
12b	heksil	Chirallica PST-10	1,77	3,09	1,60	3,54	2,21	6,30
		Chiralcel OD-3	1,47	1,9	0,92	1,48	1,61	3,75
		Chiralpak IB	1,63	2,02	1,11	1,62	1,45	3,40
		Chiralpak AD-3	5,98	7,49	7,02	9,04	1,29	2,36
		Chiralpak IA	4,05	4,37	4,39	4,82	1,10	0,75
12c	ciklopentil	Chirallica PST-10	1,68	3,36	1,47	3,94	2,68	7,68
		Chiralcel OD-3	1,38	1,74	0,80	1,27	1,59	3,31
		Chiralpak IB	1,62	1,98	1,10	1,56	1,42	3,13
		Chiralpak AD-3	2,92	5,23	2,91	6,01	2,06	6,78
		Chiralpak IA	2,39	3,81	2,18	4,07	1,87	5,60
12d	cikloheksil	Chirallica PST-10	1,86	3,91	1,74	4,75	2,74	7,91
		Chiralcel OD-3	1,42	1,96	0,85	1,56	1,83	4,69
		Chiralpak IB	1,65	2,18	1,14	1,82	1,60	4,38
		Chiralpak AD-3	3,23	6,83	3,33	8,16	2,45	7,68
		Chiralpak IA	2,67	4,96	2,56	5,60	2,19	6,61
12e	4-fenilbutil	Chirallica PST-10	3,66	6,83	4,38	9,04	2,06	7,38
		Chiralcel OD-3	2,51	3,48	2,28	3,54	1,56	5,63
		Chiralpak IB	2,57	3,27	2,33	3,24	1,39	4,59
		Chiralpak AD-3	10,58	12,45	13,18	15,69	1,19	2,05
		Chiralpak IA	5,95	8,33	6,92	10,09	1,46	3,76
12f	furfuril	Chirallica PST-10	3,01	3,86	3,43	4,68	1,36	3,04
		Chiralcel OD-3	1,71	2,06	1,23	1,69	1,37	2,83
		Chiralpak IB	1,9	2,19	1,46	1,84	1,26	2,38
		Chiralpak AD-3	5,05	9,75	5,77	12,07	2,09	8,69
		Chiralpak IA	3,33	5,61	3,43	6,47	1,88	6,75
12g	fenil	Chirallica PST-10	4,85	9,54	6,13	13,03	2,12	8,60
		Chiralcel OD-3	2,34	4,42	2,05	4,77	2,32	10,55
		Chiralpak IB	2,51	4,45	2,25	4,76	2,12	10,76
		Chiralpak AD-3	7,02	7,66	8,41	9,27	1,10	1,07
		Chiralpak IA	4,35	5,69	4,79	6,58	1,37	3,44
12h	benzil	Chirallica PST-10	3,98	5,63	4,85	7,28	1,50	4,26
		Chiralcel OD-3	2,3	2,82	2,00	2,68	1,34	3,49
		Chiralpak IB	2,37	2,77	2,07	2,59	1,25	2,83
		Chiralpak AD-3	9,35	19,39	11,53	24,99	2,17	9,41
		Chiralpak IA	5,19	9,79	5,91	12,04	2,04	7,53

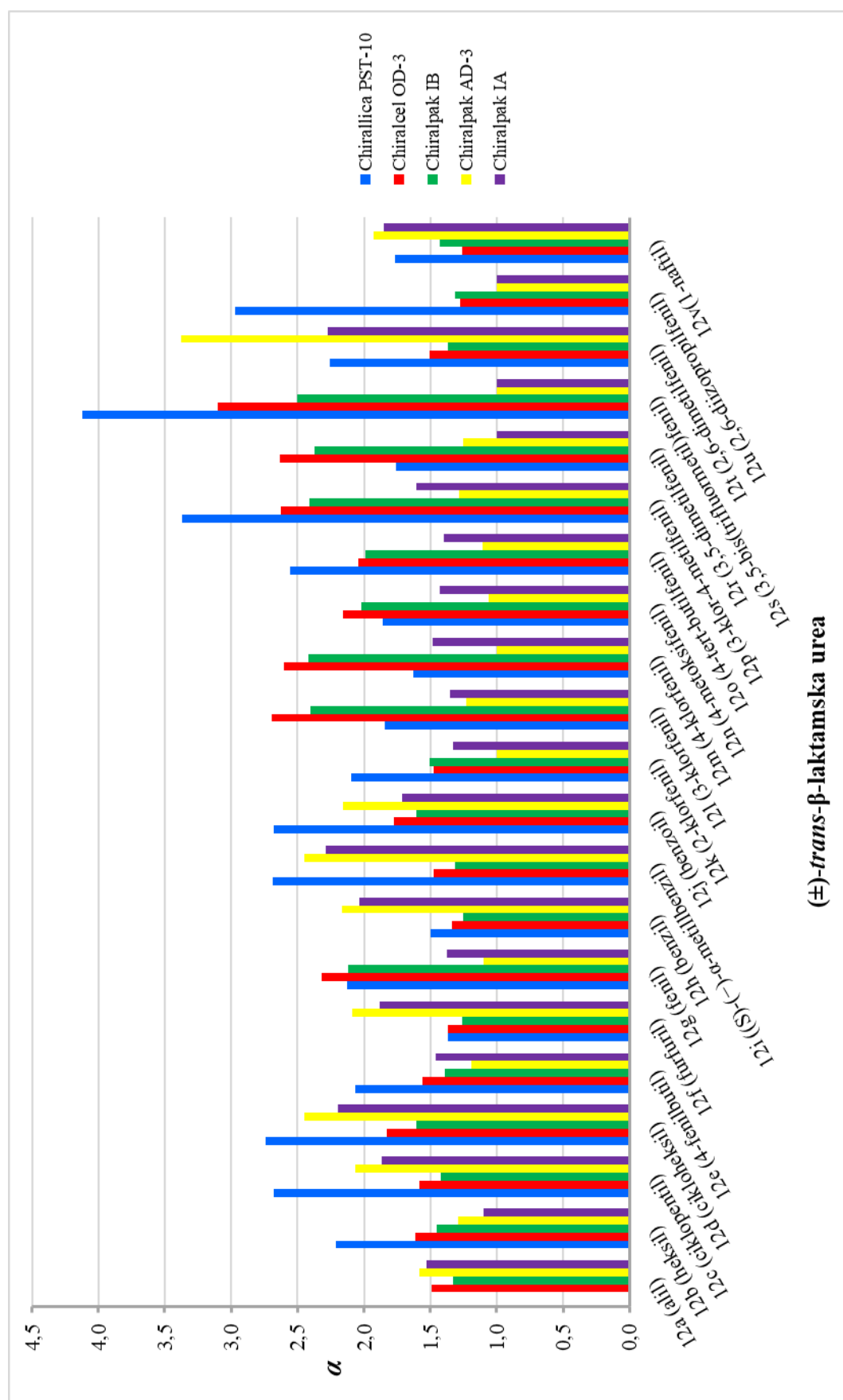
β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	Chirallica PST-10	1,83	3,77	1,69	4,54	2,69	7,79
		Chiralcel OD-3	1,55	1,92	1,02	1,51	1,47	3,17
		Chiralpak IB	1,79	2,11	1,32	1,73	1,31	2,68
		Chiralpak AD-3	3,76	8,12	4,04	9,88	2,45	7,63
		Chiralpak IA	2,8	5,44	2,73	6,24	2,29	6,55
12j	benzoil	Chirallica PST-10	7,58	19,18	10,15	27,21	2,68	11,75
		Chiralcel OD-3	2,66	4,12	2,47	4,38	1,77	8,13
		Chiralpak IB	2,50	3,54	2,24	3,59	1,60	6,70
		Chiralpak AD-3	11,66	24,28	14,63	31,55	2,16	11,28
		Chiralpak IA	8,66	14,27	10,53	18,00	1,71	5,37
12k	2-klorfenil	Chirallica PST-10	2,33	4,14	2,43	5,09	2,10	7,34
		Chiralcel OD-3	1,98	2,56	1,58	2,34	1,48	4,37
		Chiralpak IB	2,01	2,64	1,60	2,42	1,51	4,86
		Chiralpak AD-3	3,97	3,97	4,32	4,32	1,00	0,00
		Chiralpak IA	3,02	3,77	3,02	4,02	1,33	2,77
12l	3-klorfenil	Chirallica PST-10	7,63	13,48	10,22	18,82	1,84	6,89
		Chiralcel OD-3	2,54	5,55	2,32	6,25	2,70	12,81
		Chiralpak IB	2,77	5,57	2,59	6,22	2,40	12,90
		Chiralpak AD-3	8,97	10,85	11,02	13,54	1,23	2,41
		Chiralpak IA	5,46	7,12	6,27	8,48	1,35	3,25
12m	4-klorfenil	Chirallica PST-10	7,55	11,87	10,10	16,46	1,63	5,49
		Chiralcel OD-3	2,53	5,36	2,30	6,00	2,60	12,36
		Chiralpak IB	2,68	5,39	2,47	5,98	2,42	13,23
		Chiralpak AD-3	12,53	12,53	15,80	15,80	1,00	0,00
		Chiralpak IA	6,01	8,54	7,00	10,37	1,48	4,26
12n	4-metoksifenil	Chirallica PST-10	5,87	10,34	7,63	14,21	1,86	6,69
		Chiralcel OD-3	2,79	5,14	2,64	5,71	2,16	10,15
		Chiralpak IB	2,93	5,13	2,80	5,65	2,02	10,52
		Chiralpak AD-3	10,63	11,24	13,25	14,07	1,06	0,58
		Chiralpak IA	5,79	7,97	6,71	9,61	1,43	3,95
12o	4-tert-butilfenil	Chirallica PST-10	3,14	6,97	3,62	9,25	2,56	8,56
		Chiralcel OD-3	2,64	4,6	2,45	5,01	2,05	8,88
		Chiralpak IB	2,77	4,74	2,59	5,14	1,99	10,02
		Chiralpak AD-3	8,12	8,92	9,88	10,96	1,11	0,87
		Chiralpak IA	5,18	6,96	5,90	8,27	1,40	3,17
12p	3-klor-4-metilfenil	Chirallica PST-10	3,03	8,60	3,46	11,65	3,37	11,04
		Chiralcel OD-3	2,73	5,92	2,56	6,73	2,62	12,77
		Chiralpak IB	2,54	5,03	2,29	5,52	2,41	12,35
		Chiralpak AD-3	4,93	6,11	5,61	7,19	1,28	2,56
		Chiralpak IA	5,46	8,32	6,27	10,08	1,61	5,88
12r	3,5-dimetilfenil	Chirallica PST-10	9,15	15,61	12,46	21,96	1,76	6,00
		Chiralcel OD-3	2,34	4,91	2,05	5,41	2,63	11,89
		Chiralpak IB	2,97	5,99	2,85	6,76	2,37	12,59
		Chiralpak AD-3	12,46	15,41	15,70	19,66	1,25	2,20
		Chiralpak IA	2,69	2,69	2,58	2,58	1,00	0,00
12s	3,5-bis(trifluorometil)fenil	Chirallica PST-10	1,01	2,04	0,49	2,00	4,12	6,08
		Chiralcel OD-3	1,17	2,02	0,53	1,64	3,10	7,25
		Chiralpak IB	1,29	2,07	0,67	1,68	2,51	7,09
		Chiralpak AD-3	1,22	1,22	0,64	0,64	1,00	0,00
		Chiralpak IA	1,57	1,57	1,09	1,09	1,00	0,00

β -Laktamska urea	Supstituent	Kolona	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12t	2,6-dimetilfenil	Chirallica PST-10	1,53	2,6	1,25	2,82	2,26	5,69
		Chiralcel OD-3	1,42	1,75	0,85	1,28	1,50	2,96
		Chiralpak IB	1,61	1,92	1,09	1,49	1,37	2,79
		Chiralpak AD-3	3,16	8,9	3,24	10,93	3,38	14,76
		Chiralpak IA	2,78	5,36	2,70	6,14	2,27	6,33
12u	2,6-diizopropilfenil	Chirallica PST-10	1,04	1,75	0,53	1,57	2,97	3,87
		Chiralcel OD-3	1,13	1,23	0,48	0,61	1,27	1,02
		Chiralpak IB	1,22	1,36	0,58	0,76	1,31	1,41
		Chiralpak AD-3	3,43	3,43	3,60	3,60	1,00	0,00
		Chiralpak IA	2,69	2,69	2,58	2,58	1,00	0,00
12v	1-naftil	Chirallica PST-10	5,37	8,96	6,90	12,18	1,77	6,29
		Chiralcel OD-3	6,22	7,65	7,12	8,99	1,26	3,65
		Chiralpak IB	4,64	6,30	5,01	7,16	1,43	5,84
		Chiralpak AD-3	7,69	14,15	9,31	17,97	1,93	7,89
		Chiralpak IA	6,01	10,49	7,00	12,97	1,85	6,13

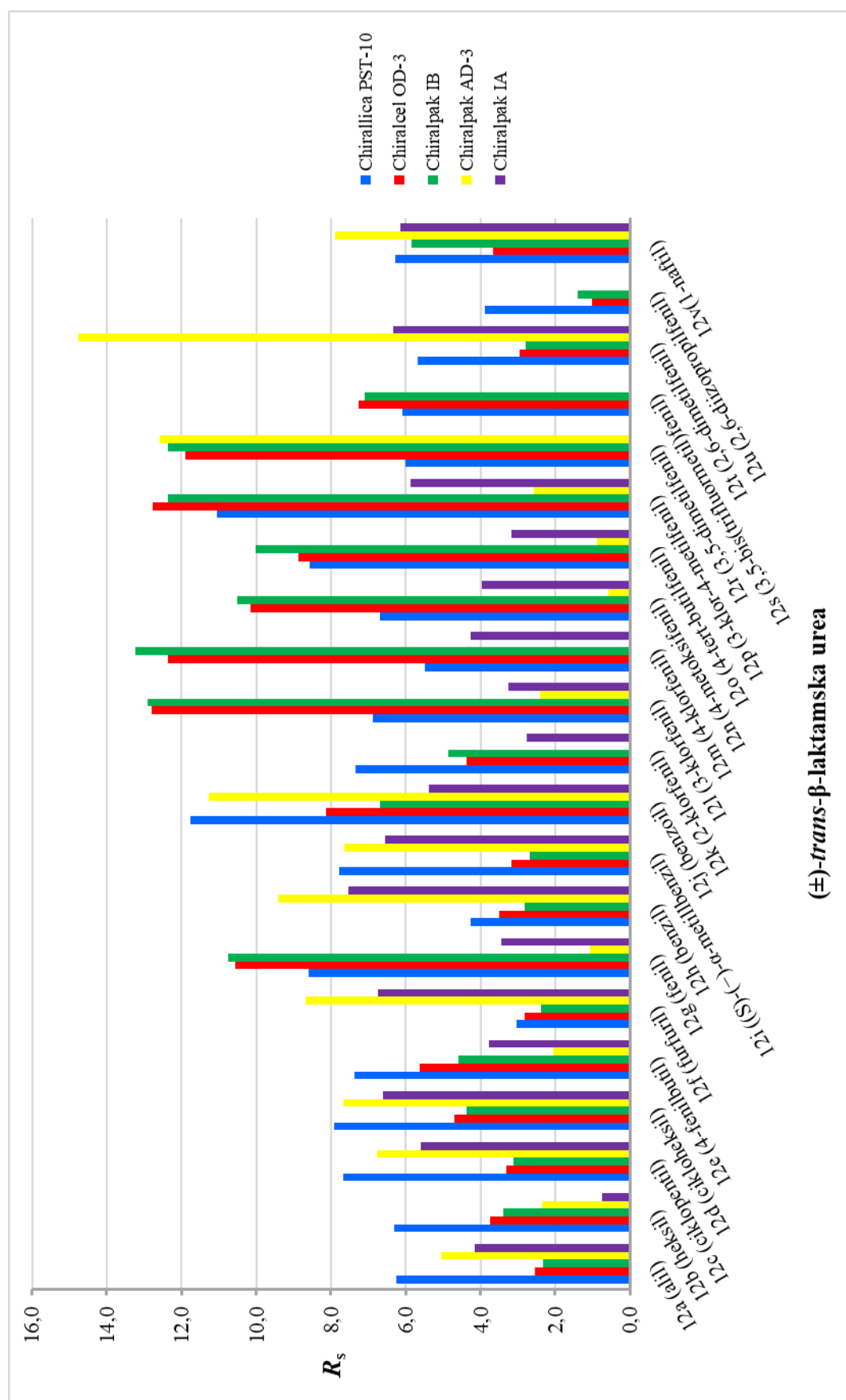
Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: CO₂/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



Slika P2.1.1. Ujjecaj kiralnih nepokretnih faza na faktor zadržavanja proizlazećih enantiomera $(\pm)$ -*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**



Slika P2.2. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na separacijski faktor α enantiomera (±)-*trans*-β-laktamskih urea **12a-v**



Slika P2.3. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na razlučivanje R_s enantiomera (±)-trans-β-laktamskih urea **12a-v**

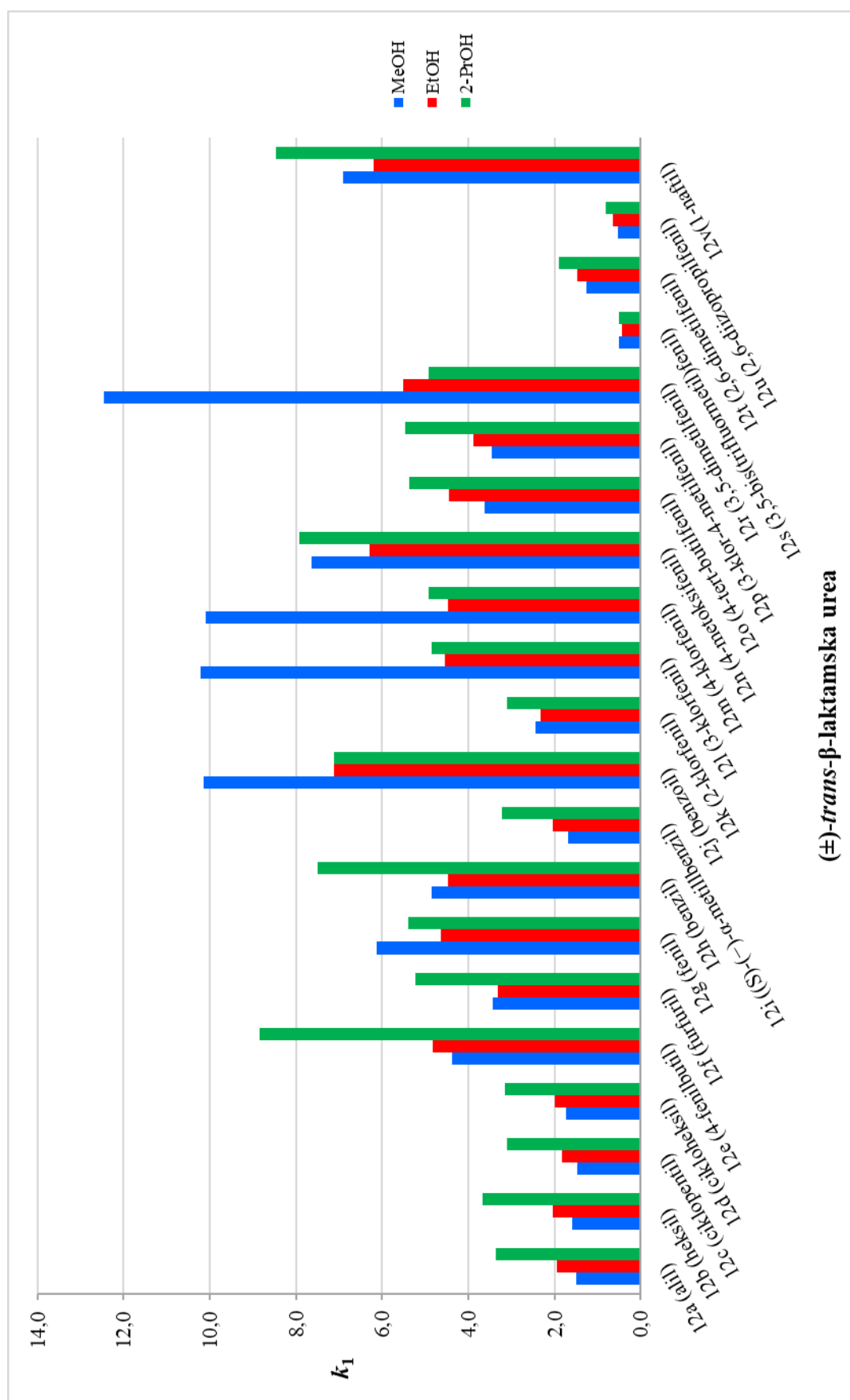
Prilog 2.2. Utjecaj vrste alkoholnog modifikatora na enantioseparacija ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

Tablica P2.2. Utjecaj alkoholnih modifikatora u pokretnoj fazi na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

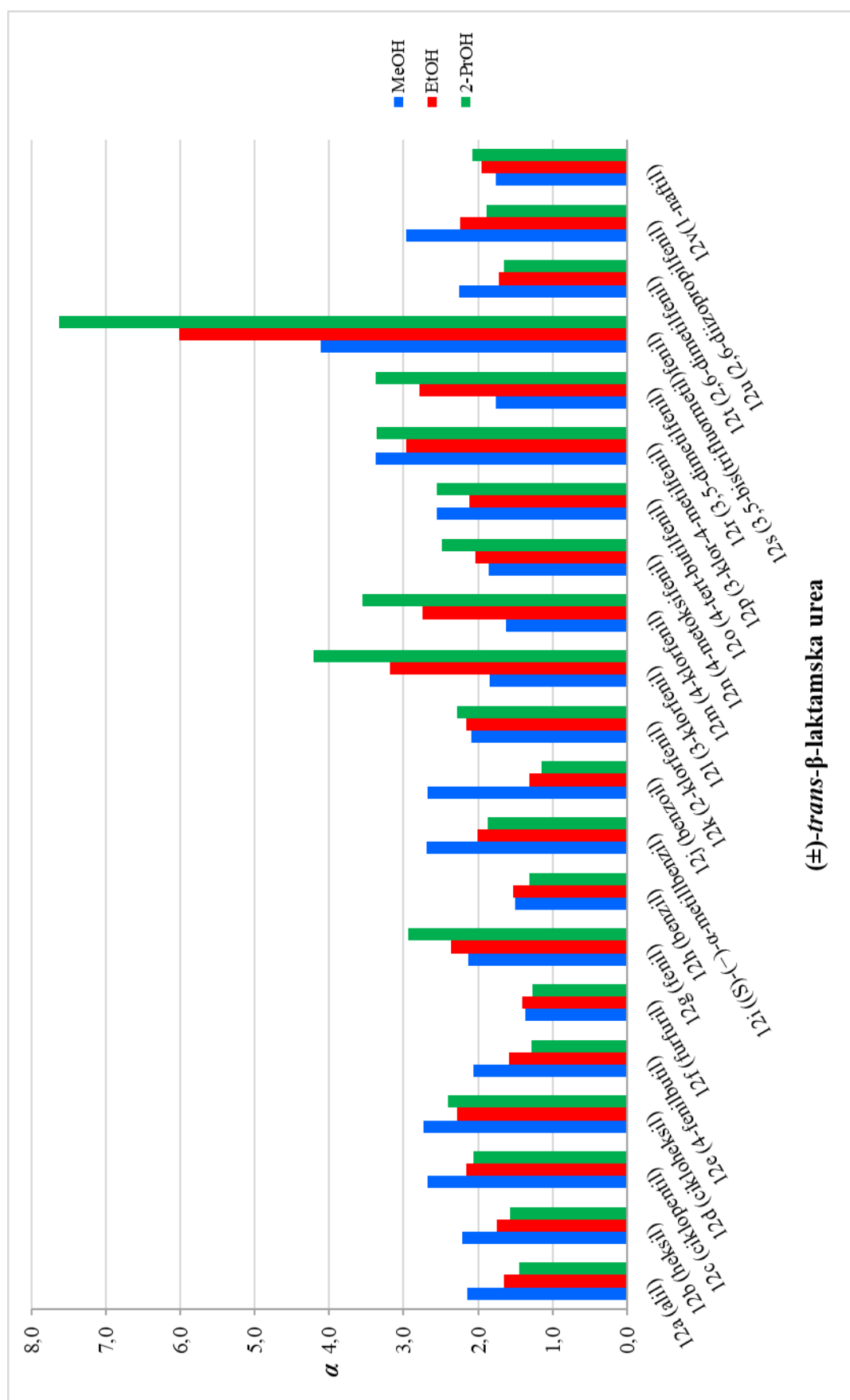
β -Laktamska urea	Supstituent	Modifikator	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12a	alil	MeOH	1,69	2,85	1,49	3,19	2,15	6,24
		EtOH	1,92	2,75	1,94	3,21	1,66	4,26
		2-PrOH	2,82	3,78	3,35	4,83	1,44	3,24
12b	heksil	MeOH	1,77	3,09	1,60	3,54	2,21	6,30
		EtOH	1,98	2,98	2,03	3,56	1,75	4,75
		2-PrOH	3,02	4,37	3,66	5,74	1,57	3,62
12c	ciklopentil	MeOH	1,68	3,36	1,47	3,94	2,68	7,68
		EtOH	1,85	3,24	1,83	3,96	2,16	6,52
		2-PrOH	2,65	4,78	3,09	6,38	2,06	5,98
12d	cikloheksil	MeOH	1,86	3,91	1,74	4,75	2,74	7,91
		EtOH	1,96	3,64	2,00	4,57	2,29	7,08
		2-PrOH	2,68	5,53	3,14	7,53	2,40	7,00
12e	4-fenilbutil	MeOH	3,66	6,83	4,38	9,04	2,06	7,38
		EtOH	3,8	5,64	4,82	7,64	1,58	4,94
		2-PrOH	6,38	7,97	8,85	11,30	1,28	2,37
12f	furfuril	MeOH	3,01	3,86	3,43	4,68	1,36	3,04
		EtOH	2,82	3,70	3,32	4,67	1,41	3,53
		2-PrOH	4,03	4,95	5,22	7,05	1,35	2,41
12g	fenil	MeOH	4,85	9,54	6,13	13,03	2,12	8,60
		EtOH	3,68	7,79	4,64	10,93	2,36	9,00
		2-PrOH	4,15	10,92	5,40	15,85	2,93	10,74
12h	benzil	MeOH	3,98	5,63	4,85	7,28	1,50	4,26
		EtOH	3,57	5,13	4,47	6,86	1,53	4,75
		2-PrOH	5,51	7,05	7,50	9,88	1,32	2,90
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	MeOH	1,83	3,77	1,69	4,54	2,69	7,79
		EtOH	1,98	3,32	2,03	4,08	2,01	6,14
		2-PrOH	2,74	4,57	3,23	6,05	1,87	5,39
12j	benzoil	MeOH	7,58	19,18	10,15	27,21	2,68	11,75
		EtOH	5,30	6,77	7,12	9,37	1,32	3,43
		2-PrOH	5,26	5,92	7,12	8,14	1,14	1,57
12k	2-klorfenil	MeOH	2,33	4,14	2,43	5,09	2,10	7,34
		EtOH	2,17	3,92	2,32	5,00	2,15	7,35
		2-PrOH	2,65	5,21	3,09	7,04	2,28	7,77
12l	3-klorfenil	MeOH	7,63	13,48	10,22	18,82	1,84	6,89
		EtOH	3,62	10,1	4,54	14,47	3,18	11,63
		2-PrOH	3,79	13,89	4,85	20,44	4,21	13,07
12m	4-klorfenil	MeOH	7,55	11,87	10,10	16,46	1,63	5,49
		EtOH	3,57	8,66	4,47	12,26	2,74	10,4
		2-PrOH	3,84	11,99	4,93	17,50	3,55	11,8
12n	4-metoksifenil	MeOH	5,87	10,34	7,63	14,21	1,86	6,69
		EtOH	4,77	9,03	6,30	12,83	2,03	8,12
		2-PrOH	5,78	13,43	7,92	19,73	2,49	9,41

β -Laktamska urea	Supstituent	Modifikator	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	MeOH	3,14	6,97	3,62	9,25	2,56	8,56
		EtOH	3,56	6,81	4,45	9,43	2,12	7,52
		2-PrOH	4,13	9,53	5,37	13,71	2,55	8,23
12p	3-klor-4-metilfenil	MeOH	3,03	8,60	3,46	11,65	3,37	11,04
		EtOH	3,18	8,16	3,87	11,50	2,97	10,92
		2-PrOH	4,19	12,55	5,47	18,37	3,36	11,05
12r	3,5-dimetilfenil	MeOH	9,15	15,61	12,46	21,96	1,76	6,00
		EtOH	4,26	10,73	5,52	15,43	2,79	11,15
		2-PrOH	3,84	11,4	4,93	16,59	3,37	10,96
12s	3,5-bis(trifluormetil)fenil	MeOH	1,01	2,04	0,49	2,00	4,12	6,08
		EtOH	0,94	2,38	0,44	2,64	6,02	7,91
		2-PrOH	0,98	3,18	0,51	3,91	7,63	8,79
12t	2,6-dimetilfenil	MeOH	1,53	2,6	1,25	2,82	2,26	5,69
		EtOH	1,61	2,3	1,47	2,52	1,72	4,15
		2-PrOH	1,87	2,66	1,89	3,10	1,65	3,83
12u	2,6-diizopropilfenil	MeOH	1,04	1,75	0,53	1,57	2,97	3,87
		EtOH	1,08	1,61	0,65	1,47	2,24	3,83
		2-PrOH	1,18	1,65	0,82	1,55	1,88	3,22
12v	1-naftil	MeOH	5,37	8,96	6,90	12,18	1,77	6,29
		EtOH	4,70	8,57	6,20	12,12	1,96	7,29
		2-PrOH	6,13	12,00	8,46	17,52	2,07	7,67

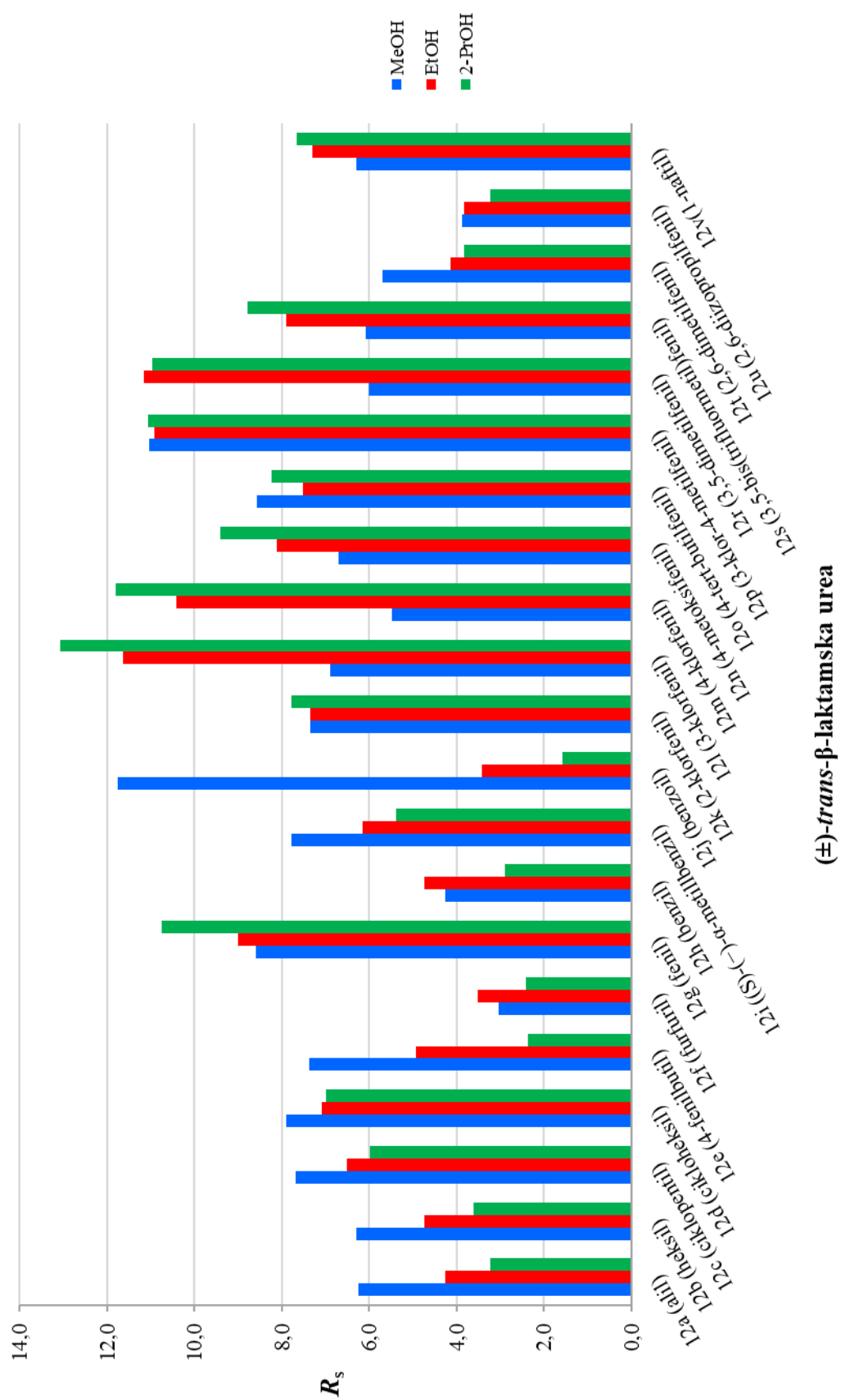
Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: CO₂/MeOH (70:30, v/v), CO₂/EtOH (70:30, v/v), CO₂/2-PrOH (70:30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



Slika P2.4. Utjecaj alkoholnih modifikatora na faktor zadržavanja proizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10



Slika P2.5. Utjecaj alkoholnih modifikatora na separacijski faktor α enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10



Slika P2.6. Utjecaj alkoholnih modifikatora na razlučivanje R_s enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10

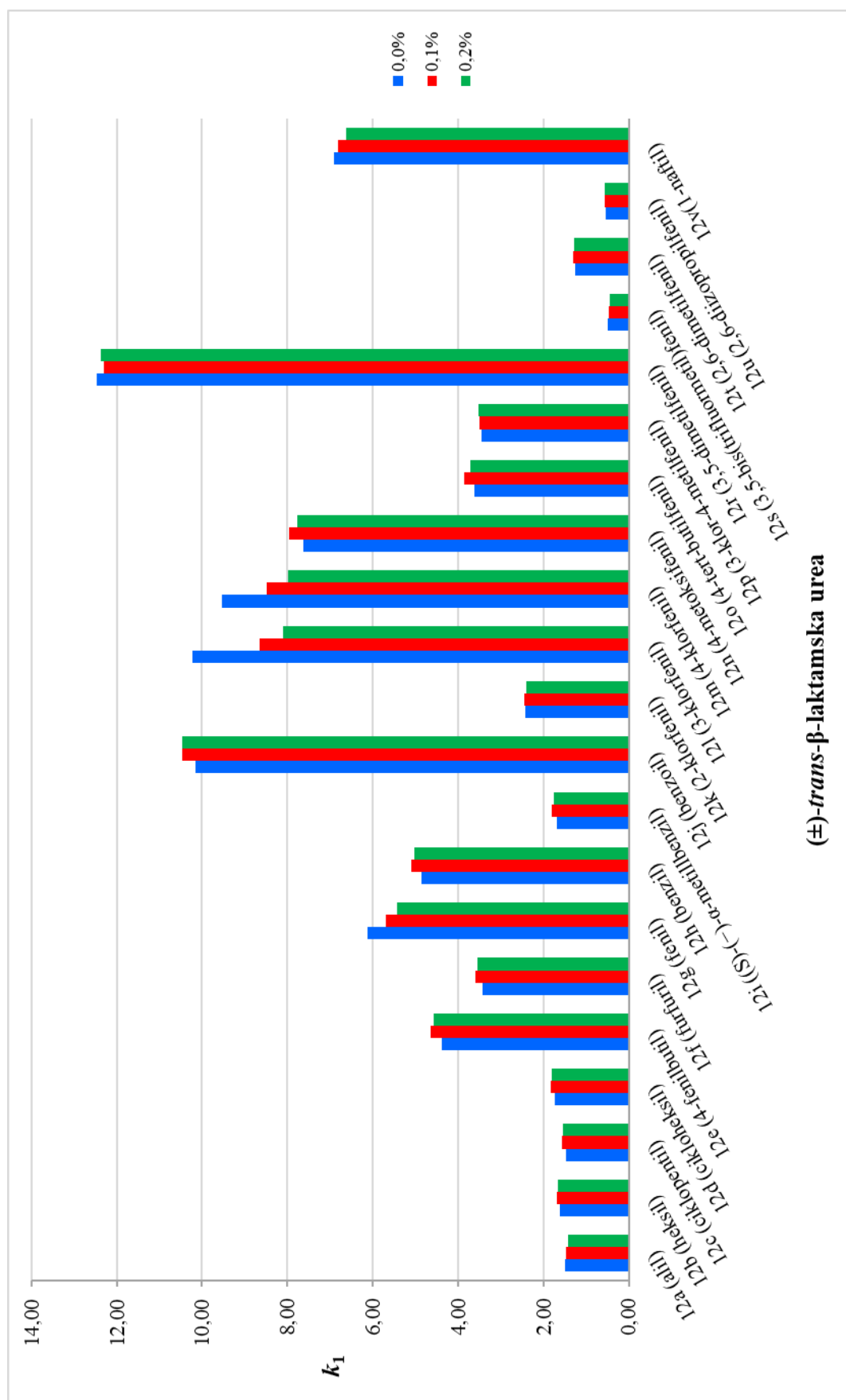
Prilog 2.3. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

Tablica P2.3. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina (IPA) u pokretnoj fazi na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

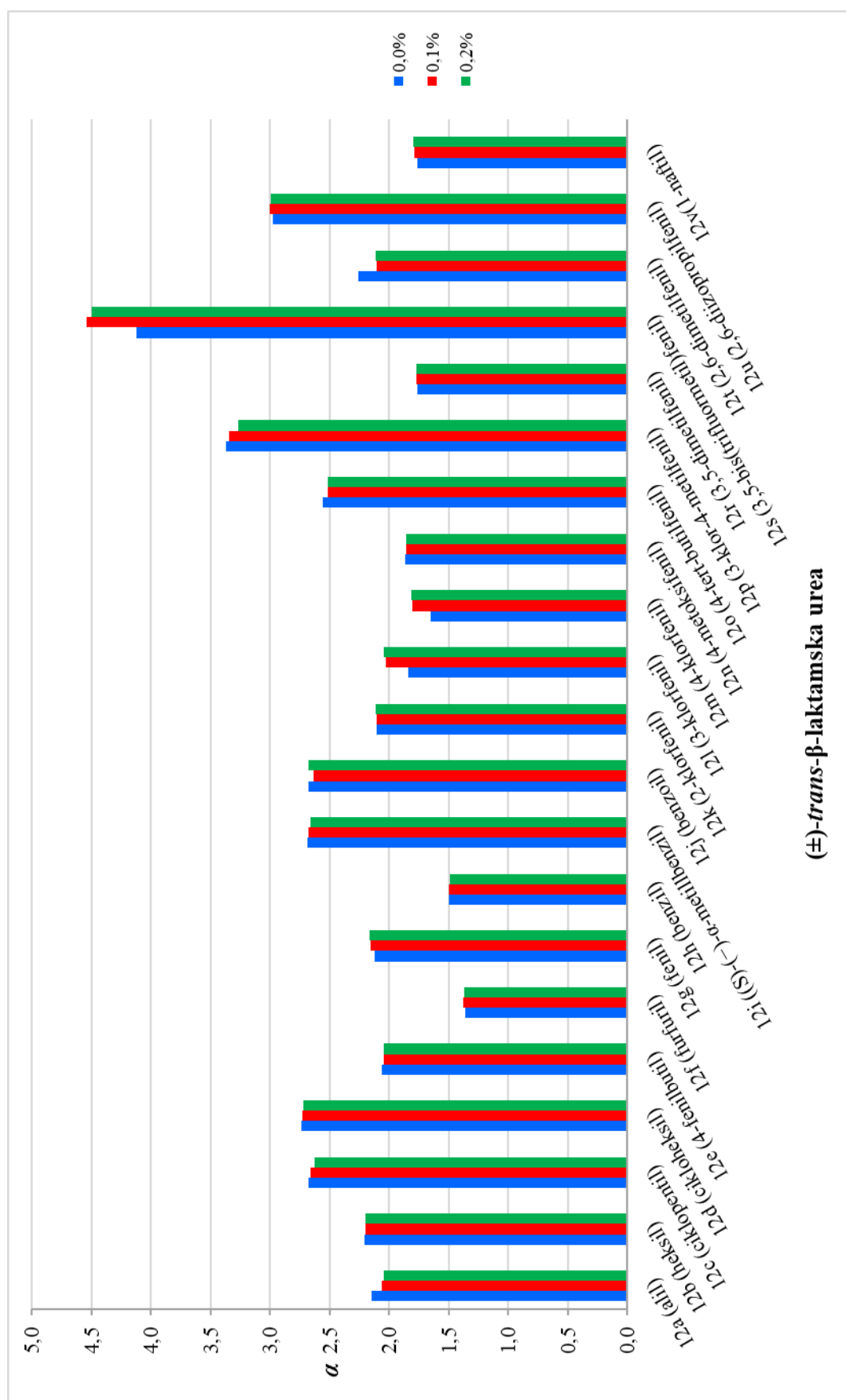
β -Laktamska urea	Supstituent	IPA %	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12a	alil	0	1,69	2,85	1,49	3,19	2,15	6,24
		0,1	1,68	2,74	1,47	3,02	2,06	5,61
		0,2	1,66	2,68	1,43	2,92	2,05	5,57
12b	heksil	0	1,77	3,09	1,60	3,54	2,21	6,3
		0,1	1,83	3,21	1,69	3,71	2,20	6,6
		0,2	1,82	3,18	1,66	3,65	2,20	6,49
12c	ciklopentil	0	1,68	3,36	1,47	3,94	2,68	7,68
		0,1	1,74	3,5	1,56	4,14	2,66	8,03
		0,2	1,74	3,46	1,54	4,06	2,63	7,96
12d	cikloheksil	0	1,86	3,91	1,74	4,75	2,74	7,91
		0,1	1,93	4,09	1,83	5,01	2,73	8,35
		0,2	1,92	4,05	1,81	4,92	2,72	8,26
12e	4-fenilbutil	0	3,66	6,83	4,38	9,04	2,06	7,38
		0,1	3,84	7,15	4,64	9,50	2,05	7,74
		0,2	3,8	7,05	4,56	9,31	2,04	7,67
12f	furfuril	0	3,01	3,86	3,43	4,68	1,36	3,04
		0,1	3,12	4,04	3,58	4,93	1,38	3,28
		0,2	3,11	4,00	3,55	4,85	1,37	3,21
12g	fenil	0	4,85	9,54	6,13	13,03	2,12	8,6
		0,1	4,55	9,03	5,68	12,26	2,16	7,44
		0,2	4,4	8,71	5,43	11,73	2,16	7,43
12h	benzil	0	3,98	5,63	4,85	7,28	1,50	4,26
		0,1	4,15	5,89	5,09	7,65	1,50	4,53
		0,2	4,12	5,8	5,02	7,48	1,49	4,43
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	0	1,83	3,77	1,69	4,54	2,69	7,79
		0,1	1,9	3,94	1,79	4,79	2,67	8,21
		0,2	1,89	3,89	1,76	4,69	2,66	8,09
12j	benzoil	0	7,58	19,18	10,15	27,21	2,68	11,75
		0,1	7,81	19,47	10,47	27,59	2,64	11,06
		0,2	7,84	19,83	10,46	27,99	2,68	11,28
12k	2-klorfenil	0	2,33	4,14	2,43	5,09	2,10	7,34
		0,1	2,35	4,19	2,45	5,15	2,10	6,91
		0,2	2,32	4,14	2,39	5,05	2,11	6,89
12l	3-klorfenil	0	7,63	13,48	10,22	18,82	1,84	6,89
		0,1	6,57	12,62	8,65	17,53	2,03	6,97
		0,2	6,22	11,99	8,09	16,53	2,04	6,87
12m	4-klorfenil	0	7,17	11,41	9,54	15,78	1,65	5,47
		0,1	6,46	11,1	8,49	15,30	1,80	5,76
		0,2	6,14	10,58	7,98	14,47	1,81	5,79
12n	4-metoksifenil	0	5,87	10,34	7,63	14,21	1,86	6,69
		0,1	6,1	10,76	7,96	14,80	1,86	7,14
		0,2	5,99	10,52	7,76	14,38	1,85	7,03

β -Laktamska urea	Supstituent	IPA %	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	0	3,14	6,97	3,62	9,25	2,56	8,56
		0,1	3,3	7,27	3,85	9,68	2,52	8,96
		0,2	3,22	7,07	3,71	9,34	2,52	8,87
12p	3-klor-4-metilfenil	0	3,03	8,6	3,46	11,65	3,37	11,04
		0,1	3,06	8,63	3,49	11,67	3,34	11,64
		0,2	3,09	8,54	3,52	11,49	3,27	11,47
12r	3,5-dimetilfenil	0	9,15	15,61	12,46	21,96	1,76	6
		0,1	9,05	15,52	12,29	21,79	1,77	6,33
		0,2	9,14	15,63	12,36	21,85	1,77	6,23
12s	3,5-bis(trifluormetil)fenil	0	1,01	2,04	0,49	2,00	4,12	6,08
		0,1	1,00	2,13	0,47	2,13	4,54	6,17
		0,2	0,99	2,06	0,45	2,01	4,50	6,23
12t	2,6-dimetilfenil	0	1,53	2,6	1,25	2,82	2,26	5,69
		0,1	1,57	2,55	1,31	2,74	2,10	5,07
		0,2	1,55	2,51	1,27	2,67	2,11	5,07
12u	2,6-diizopropilfenil	0	1,04	1,75	0,53	1,57	2,97	3,87
		0,1	1,06	1,82	0,56	1,67	3,01	4,13
		0,2	1,06	1,81	0,55	1,65	2,99	4,07
12v	1-naftil	0	5,37	8,96	6,90	12,18	1,77	6,29
		0,1	5,32	8,99	6,81	12,20	1,79	5,80
		0,2	5,21	8,8	6,62	11,87	1,79	5,89

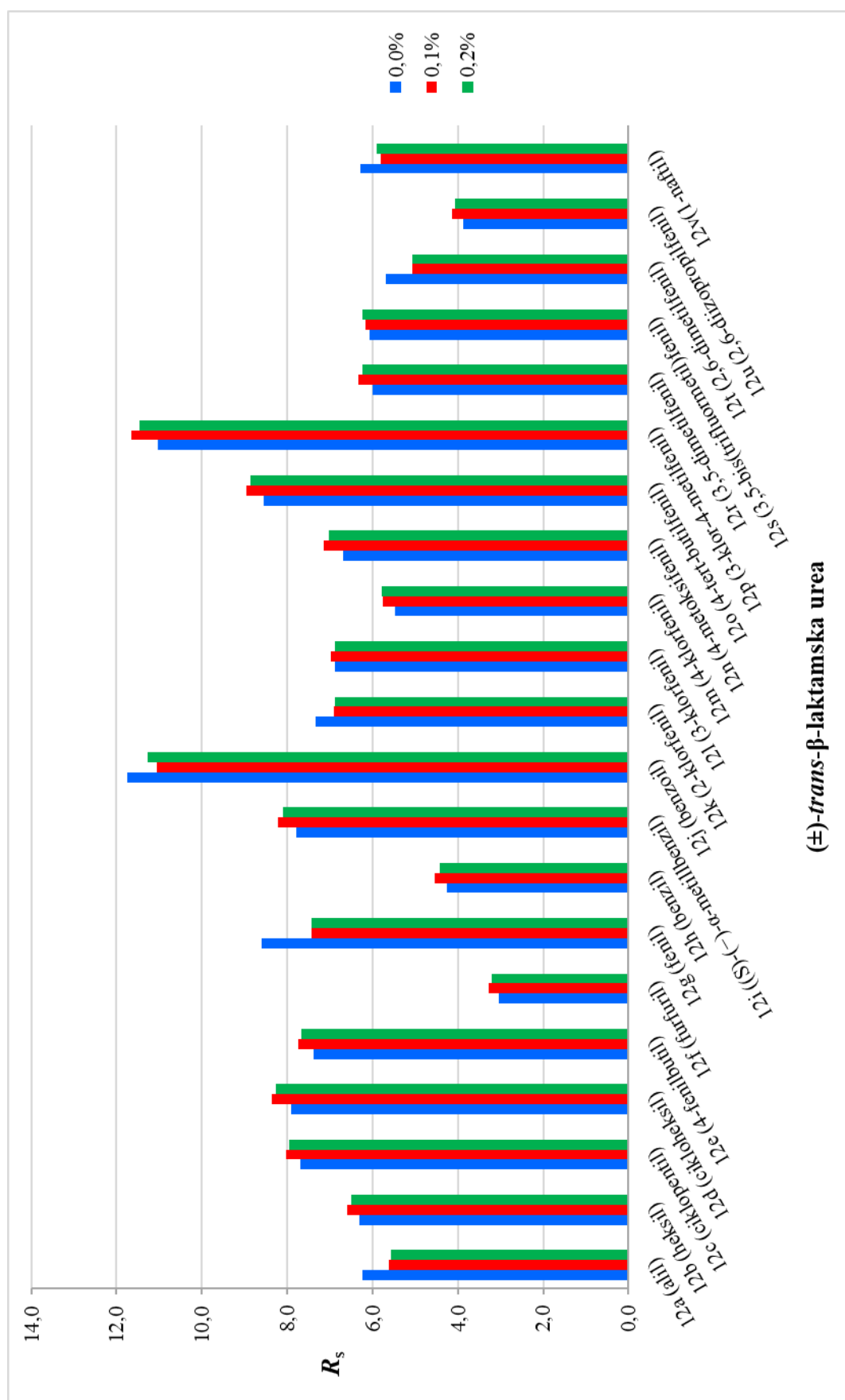
Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: CO₂/MeOH (70:30, v/v) + izopropilamin (0 %, 0,1% i 0,2%), protok 4 mL min⁻¹, temperatura kolone 35 °C, povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



Slika P2.7. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina na faktor zadržavanja proizlazećih enantiomera $(\pm)$ - $\text{trans-}\beta$ -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10



Slika P2.8. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina u pokretnoj fazi na separacijski faktor α enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chiralica PST-10



Slika P2.9. Utjecaj volumnog udjela izopropilamina na razlučivanje R_s enantiomera (±)-trans-β-laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10

Prilog 2.4. Utjecaj temperature kolone na enantioseparacija ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

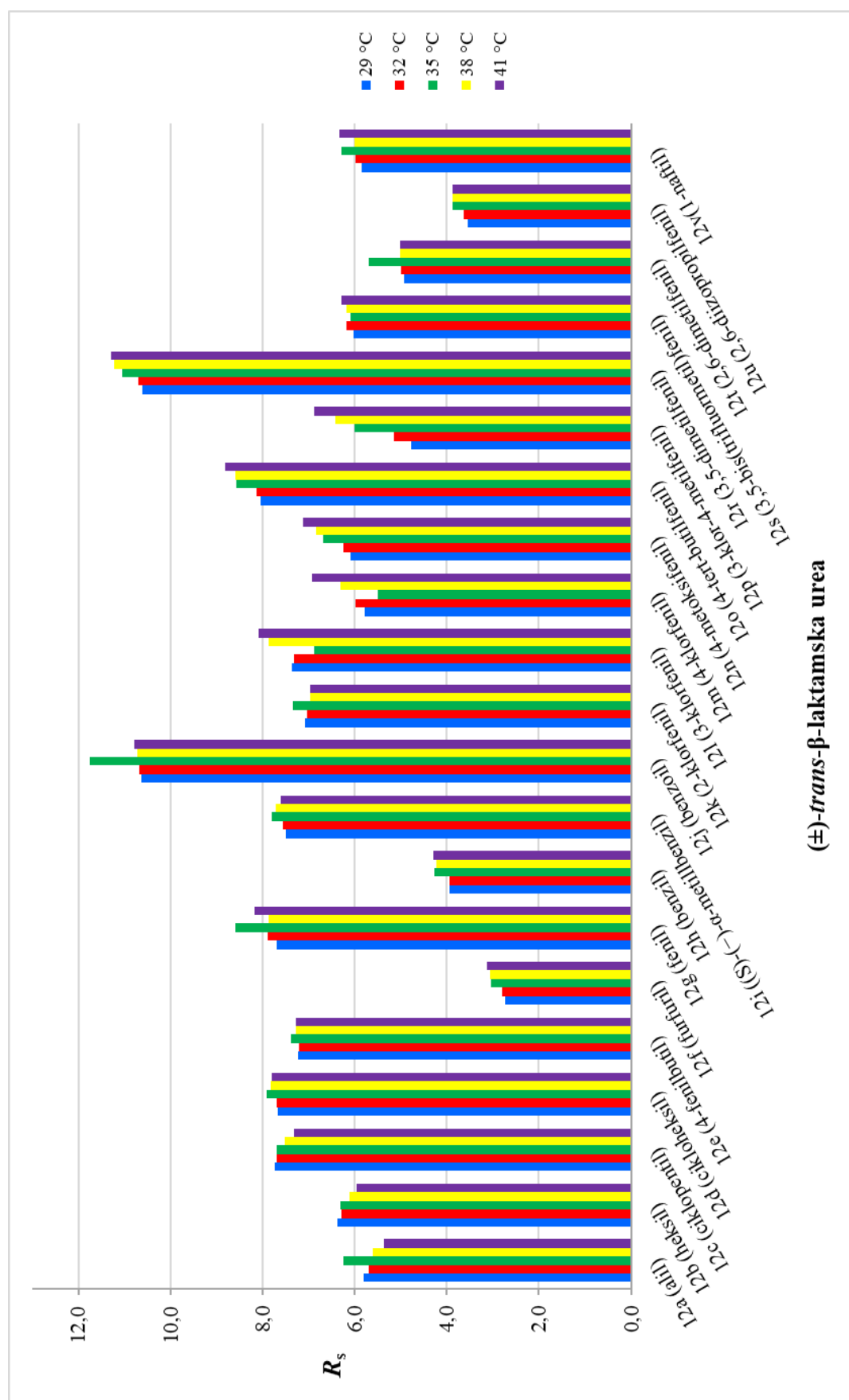
Tablica 2.4. Utjecaj temperature kolone na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10

β -Laktamska urea	Supstituent	Temperatura kolone ($^{\circ}\text{C}$)	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12a	alil	29	1,74	2,94	1,56	3,32	2,13	5,80
		32	1,72	2,85	1,56	3,23	2,08	5,69
		35	1,69	2,85	1,49	3,19	2,15	6,24
		38	1,68	2,73	1,49	3,05	2,04	5,60
		41	1,61	2,51	1,50	2,89	1,93	5,37
12b	heksil	29	1,88	3,48	1,76	4,12	2,33	6,38
		32	1,82	3,28	1,70	3,87	2,27	6,28
		35	1,77	3,09	1,60	3,54	2,21	6,30
		38	1,70	2,91	1,52	3,32	2,18	6,11
		41	1,67	2,78	1,59	3,31	2,08	5,96
12c	ciklopentil	29	1,75	3,78	1,57	4,56	2,90	7,73
		32	1,72	3,56	1,56	4,29	2,76	7,68
		35	1,68	3,36	1,47	3,94	2,68	7,68
		38	1,63	3,16	1,42	3,69	2,60	7,52
		41	1,60	3,01	1,48	3,67	2,48	7,31
12d	cikloheksil	29	1,98	4,45	1,91	5,54	2,90	7,67
		32	1,92	4,18	1,85	5,21	2,81	7,70
		35	1,86	3,91	1,74	4,75	2,74	7,91
		38	1,79	3,67	1,66	4,45	2,68	7,82
		41	1,74	3,48	1,70	4,40	2,59	7,80
12e	4-fenilbutil	29	3,98	7,80	4,85	10,47	2,16	7,23
		32	3,82	7,32	4,68	9,88	2,11	7,21
		35	3,66	6,83	4,38	9,04	2,06	7,38
		38	3,48	6,34	4,16	8,41	2,02	7,28
		41	3,37	6,00	4,22	8,30	1,97	7,27
12f	furfuril	29	3,31	4,24	3,87	5,24	1,35	2,74
		32	3,18	4,05	3,73	5,02	1,35	2,79
		35	3,01	3,86	3,43	4,68	1,36	3,04
		38	2,86	3,66	3,24	4,43	1,37	3,07
		41	2,76	3,52	3,28	4,46	1,36	3,12
12g	fenil	29	5,09	10,43	6,49	14,34	2,21	7,68
		32	4,79	9,65	6,12	13,34	2,18	7,89
		35	4,85	9,54	6,13	13,03	2,12	8,60
		38	4,59	9,18	5,81	12,62	2,17	7,86
		41	4,11	8,07	5,37	11,51	2,14	8,17
12h	benzil	29	4,39	6,23	5,46	8,16	1,50	3,94
		32	4,20	5,91	5,24	7,78	1,48	3,95
		35	3,98	5,63	4,85	7,28	1,50	4,26
		38	3,80	5,34	4,64	6,92	1,49	4,22
		41	3,65	5,08	4,66	6,88	1,48	4,30

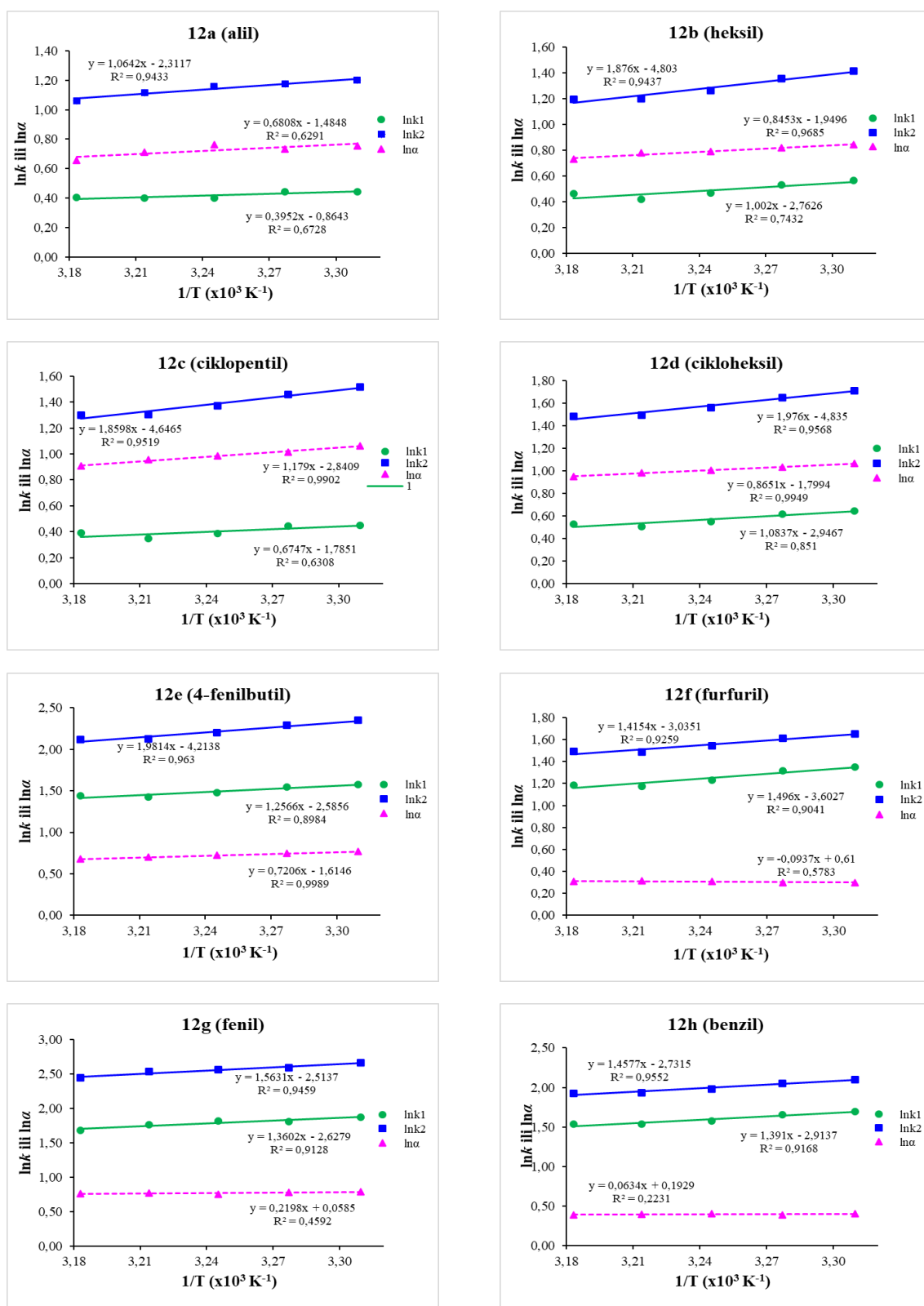
β -Laktamska urea	Supstituent	Temperatura kolone (°C)	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	29	1,90	4,16	1,79	5,12	2,85	7,49
		32	1,86	3,96	1,76	4,88	2,77	7,56
		35	1,83	3,77	1,69	4,54	2,69	7,79
		38	1,76	3,55	1,61	4,27	2,65	7,71
		41	1,74	3,40	1,70	4,27	2,52	7,60
12j	benzoil	29	8,54	23,68	11,5	33,82	2,93	10,6
		32	8,04	21,68	10,9	31,21	2,85	10,6
		35	7,58	19,18	10,1	27,21	2,68	11,7
		38	7,08	17,43	9,50	24,86	2,62	10,7
		41	6,71	15,98	9,40	23,78	2,53	10,7
12k	2-klorfenil	29	2,46	4,57	2,62	5,72	2,19	7,08
		32	2,38	4,33	2,54	5,43	2,14	7,03
		35	2,31	4,14	2,40	5,09	2,12	7,34
		38	2,35	4,21	2,49	5,25	2,11	6,96
		41	2,25	3,91	2,49	5,06	2,03	6,96
12l	3-klorfenil	29	7,31	14,58	9,75	20,44	2,10	7,37
		32	6,81	13,41	9,12	18,93	2,08	7,32
		35	7,63	13,48	10,2	18,82	1,84	6,89
		38	6,47	12,66	8,60	17,78	2,07	7,86
		41	5,77	11,36	7,95	16,61	2,09	8,09
12m	4-klorfenil	29	7,08	12,47	9,41	17,34	1,84	5,79
		32	6,76	11,83	9,04	16,58	1,83	5,99
		35	7,55	11,87	10,1	16,46	1,63	5,49
		38	6,43	11,28	8,54	15,74	1,84	6,31
		41	5,64	10,05	7,74	14,58	1,88	6,93
12n	4-metoksifenil	29	6,54	11,51	8,62	15,93	1,85	6,09
		32	6,20	10,90	8,21	15,20	1,85	6,25
		35	5,87	10,34	7,63	14,21	1,86	6,69
		38	5,51	9,70	7,18	13,39	1,87	6,84
		41	5,25	9,22	7,14	13,29	1,86	7,12
12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	29	3,36	7,81	3,94	10,49	2,66	8,05
		32	3,23	7,36	3,80	9,94	2,62	8,13
		35	3,14	6,97	3,62	9,25	2,56	8,56
		38	2,99	6,54	3,44	8,70	2,53	8,59
		41	2,90	6,20	3,50	8,61	2,46	8,80
12p	3-klor-4-metilfenil	29	3,23	9,89	3,75	13,54	3,61	10,6
		32	3,10	9,21	3,61	12,68	3,52	10,6
		35	3,03	8,60	3,46	11,65	3,37	11,0
		38	2,90	8,00	3,30	10,87	3,29	11,2
		41	2,81	7,51	3,36	10,64	3,17	11,2
12r	3,5-dimetilfenil	29	11,11	17,89	15,3	25,31	1,65	4,77
		32	10,25	16,79	14,2	23,95	1,68	5,15
		35	9,15	15,61	12,4	21,96	1,76	6,00
		38	8,40	14,55	11,4	20,59	1,80	6,42
		41	7,78	13,68	11,0	20,21	1,83	6,87
12s	3,5-bis(trifluormetil)fenil	29	1,05	2,39	0,54	2,51	4,62	6,02
		32	1,04	2,29	0,55	2,40	4,41	6,18
		35	1,01	2,04	0,49	2,00	4,12	6,08
		38	1,01	2,19	0,50	2,25	4,51	6,18
		41	0,99	2,02	0,53	2,13	3,99	6,29

β -Laktamska urea	Supstituent	Temperatura kolone (°C)	t_{R1} / min	t_{R2} / min	k_1	k_2	α	R_s
12t	2,6-dimetilfenil	29	1,65	2,74	1,43	3,03	2,12	4,93
		32	1,60	2,63	1,38	2,91	2,11	4,99
		35	1,53	2,60	1,25	2,82	2,26	5,69
		38	1,57	2,55	1,33	2,78	2,09	5,02
		41	1,51	2,37	1,34	2,67	1,99	5,02
12u	2,6-diizopropilfenil	29	1,06	1,89	0,56	1,78	3,18	3,54
		32	1,04	1,82	0,55	1,70	3,13	3,64
		35	1,04	1,75	0,53	1,57	2,97	3,87
		38	1,00	1,67	0,48	1,48	3,06	3,88
		41	1,00	1,62	0,55	1,51	2,75	3,88
12v	1-naftil	29	5,76	9,97	7,47	13,66	1,83	5,84
		32	5,63	9,68	7,37	13,38	1,82	5,97
		35	5,37	8,96	6,90	12,18	1,77	6,29
		38	5,39	9,18	7,00	12,62	1,80	6,00
		41	4,91	8,27	6,61	11,82	1,79	6,32

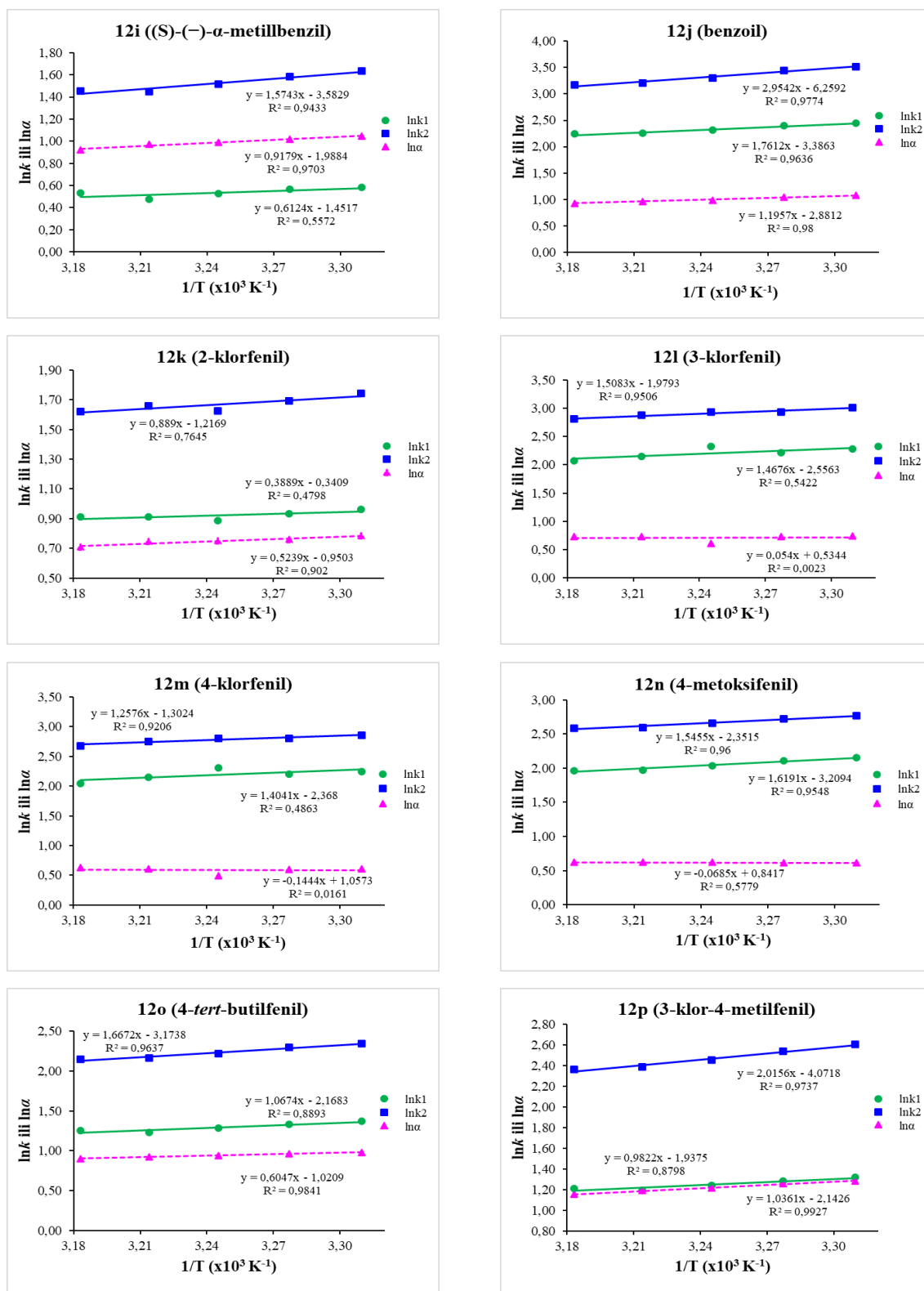
Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: CO₂/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 29 - 41 °C. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



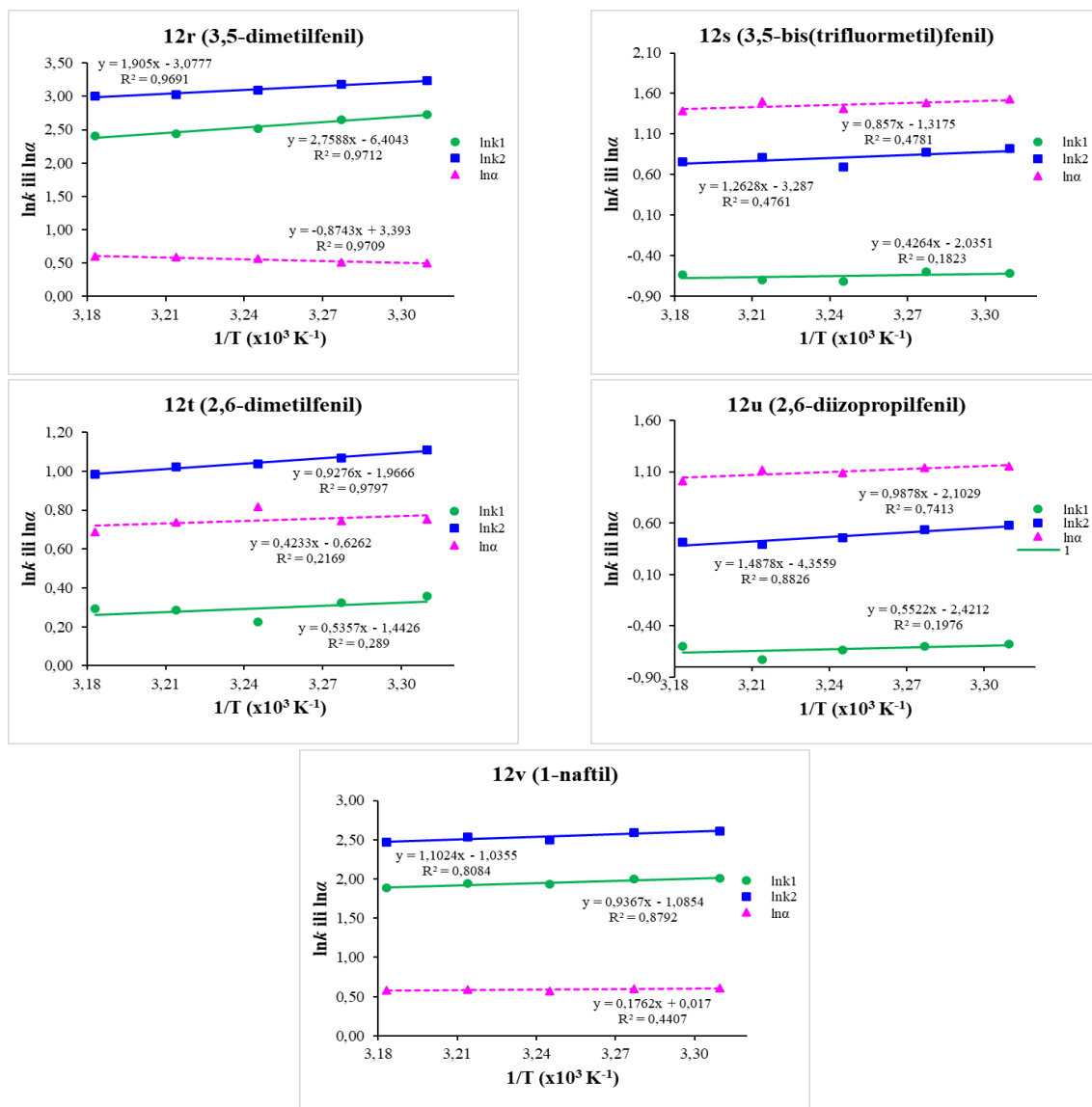
Slika P2.10. Utjecaj temperature kolone na razlučivanje R_s enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**



Slika P2.11. Ovisnost $\ln k$ ili $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12a-h** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza CO_2/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min^{-1} , povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm i temperatura kolone 29, 31, 35, 38 i 41°C



Slika P2.12. Ovisnost $\ln k$ ili $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12i-p** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza CO_2/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min^{-1} , povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm i temperatura kolone 29, 31, 35, 38 i 41°C



Slika P2.13. Ovisnost $\ln k$ ili $\ln \alpha$ o $1/T \times 10^3$ za ($\pm$)-*trans*- β -laktamske uree **12r-v** na koloni Chirallica PST-10. Kromatografski uvjeti: pokretna faza CO_2/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min^{-1} , povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm i temperatura kolone 29, 31, 35, 38 i 41 °C

Tablica P2.5. Termodinamički parametri ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea 12a-v

Spoj	$\ln k = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R$	R^2	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/molK)	$\ln \alpha = -\Delta\Delta H^\circ/RT + \Delta\Delta S^\circ/R$	R^2	$\Delta\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/molK)	T_{iso} (K)
12a	$\ln k_1 = 0,3952x - 0,8643$ $\ln k_2 = 1,0642x - 2,3117$	0,6728 0,9433	-3,29 -8,85	-7,19 -19,22	$\ln \alpha = 0,6808x - 1,4848$	0,6291	-5,66	-12,35	458,51
12b	$\ln k_1 = 1,002x - 2,7626$ $\ln k_2 = 1,876x - 4,803$	0,7432 0,9437	-8,33 -15,60	-22,97 -39,93	$\ln \alpha = 0,8453x - 1,9496$	0,9685	-7,03	-16,21	433,58
12c	$\ln k_1 = 0,6747x - 1,7851$ $\ln k_2 = 1,8598x - 4,6465$	0,6308 0,9519	-5,61 -15,46	-14,84 -38,63	$\ln \alpha = 1,179x - 2,8409$	0,9902	-9,80	-23,62	415,01
12d	$\ln k_1 = 1,0837x - 2,9467$ $\ln k_2 = 1,976x - 4,835$	0,851 0,9568	-9,01 -16,43	-24,50-40,20	$\ln \alpha = 0,8651x - 1,7994$	0,9949	-7,19	-14,96	480,77
12e	$\ln k_1 = 1,2566x - 2,5856$ $\ln k_2 = 1,9814x - 4,2138$	0,8984 0,963	-10,45 -16,47	-21,50 -35,04	$\ln \alpha = 0,7206x - 1,6146$	0,9989	-5,99	-13,42	446,30
12f	$\ln k_1 = 1,496x - 3,6027$ $\ln k_2 = 1,4154x - 3,0351$	0,9041 0,9259	-12,44 -11,77	-29,95 -25,24	$\ln \alpha = -0,0937x + 0,61$	0,5783	0,78	5,07	153,61
12g	$\ln k_1 = 1,3602x - 2,6279$ $\ln k_2 = 1,5631x - 2,5137$	0,9128 0,9459	-11,31 -13,00	-21,85 -20,90	$\ln \alpha = 0,2198x + 0,0585$	0,4592	-1,83	0,49	-3757,26
12h	$\ln k_1 = 1,391x - 2,9137$ $\ln k_2 = 1,4577x - 2,7315$	0,9168 0,9552	-11,57 -12,12	-24,23 -22,71	$\ln \alpha = 0,0634x + 0,1929$	0,2231	-0,53	1,60	-328,67
12i	$\ln k_1 = 0,6124x - 1,4517$ $\ln k_2 = 1,5743x - 3,5829$	0,5572 0,9433	-5,09 -13,09	-12,07 -29,79	$\ln \alpha = 0,9179x - 1,9884$	0,9703	-7,63	-16,53	461,63
12j	$\ln k_1 = 1,7612x - 3,3863$ $\ln k_2 = 2,9542x - 6,2592$	0,9636 0,9774	-14,64 -24,56	-28,16 -52,04	$\ln \alpha = 1,1957x - 2,8812$	0,98	-9,94	-23,96	415,00
12k	$\ln k_1 = 0,3889x - 0,3409$ $\ln k_2 = 0,889x - 1,2169$	0,4798 0,7645	-3,23 -7,39	-2,83 -10,12	$\ln \alpha = 0,5239x - 0,9503$	0,902	-4,36	-7,90	551,30
12l	$\ln k_1 = 1,4676x - 2,5563$ $\ln k_2 = 1,5083x - 1,9793$	0,5422 0,9506	-12,20 -12,54	-21,25 -16,46	$\ln \alpha = 0,054x + 0,5344$	0,0023	-0,45	4,44	-101,05
12m	$\ln k_1 = 1,4041x - 2,368$ $\ln k_2 = 1,2576x - 1,3024$	0,4863 0,9206	-11,67 -10,46	-19,69 -10,83	$\ln \alpha = -0,1444x + 1,0573$	0,0161	1,20	8,79	136,57
12n	$\ln k_1 = 1,6191x - 3,2094$ $\ln k_2 = 1,5455x - 2,3515$	0,9548 0,96	-13,46 -12,85	-26,68 -19,55	$\ln \alpha = -0,0685x + 0,8417$	0,5779	0,57	7,00	81,38
12o	$\ln k_1 = 1,0674x - 2,1683$ $\ln k_2 = 1,6672x - 3,1738$	0,8893 0,9637	-8,87 -13,86	-18,03 -26,39	$\ln \alpha = 0,6047x - 1,0209$	0,9841	-5,03	-8,49	592,32
12p	$\ln k_1 = 0,9822x - 1,9375$ $\ln k_2 = 2,0156x - 4,0718$	0,8798 0,9737	-8,17 -16,76	-16,11 -33,85	$\ln \alpha = 1,0361x - 2,1426$	0,9927	-8,61	-17,81	483,57

Spoj	$\ln k = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R$	R^2	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/molK)	$\ln \alpha = -\Delta\Delta H^\circ/RT + \Delta\Delta S^\circ/R$	R^2	$\Delta\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/molK)	T_{iso} (K)
12r	$\ln k_1 = 2,7588x - 6,4043$ $\ln k_2 = 1,905x - 3,0777$	0,9712 0,9691	-22,94 -15,84	-53,25 -25,59	$\ln \alpha = -0,8743x + 3,393$	0,9709	7,27	28,21	257,68
12s	$\ln k_1 = 0,4264x - 2,0351$ $\ln k_2 = 1,2628x - 3,287$	0,1823 0,4761	-3,55 -10,50	-16,92 -27,33	$\ln \alpha = 0,857x - 1,3175$	0,4781	-7,13	-10,95	650,47
12t	$\ln k_1 = 0,5357x - 1,4426$ $\ln k_2 = 0,9276x - 1,9666$	0,289 0,9797	-4,45 -7,71	-11,99 -16,35	$\ln \alpha = 0,4233x - 0,6262$	0,2169	-3,52	-5,21	675,98
12u	$\ln k_1 = 0,5522x - 2,4212$ $\ln k_2 = 1,4878x - 4,3559$	0,1976 0,8826	-4,59 -12,37	-20,13 -36,22	$\ln \alpha = 0,9878x - 2,1029$	0,7413	-8,21	-17,48	469,73
12v	$\ln k_1 = 0,9367x - 1,0854$ $\ln k_2 = 1,1024x - 1,0355$	0,8792 0,8084	-7,79 -9,17	-9,02 -8,61	$\ln \alpha = 0,1762x + 0,017$	0,4407	-1,47	0,14	-10364,71

Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: CO₂/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, povratni tlak 11 MPa, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 29 - 41 °C.

ΔH° - entalpija prijenosa otopljene tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, ΔS° - entropija prijenosa otopljene tvari iz pokretne na nepokretnu fazu, T - apsolutna temperatura, R - opća plinska konstanta ($R=8,314472$ J/molK). $\Delta\Delta H^\circ$ - razlika slobodne entropije drugoizlazećeg i prvoizlazećeg enantiomea ($\Delta\Delta H^\circ = \Delta H_2^\circ - \Delta H_1^\circ$), $\Delta\Delta S^\circ$ - razlika slobodne entropije između dva enantiomera ($\Delta\Delta S^\circ = \Delta S_2^\circ - \Delta S_1^\circ$) i T_{iso} - izoenantioselektivna temperatura.

Prilog 2.6. Utjecaj povratnog tlaka na enantioseparaciju ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v**

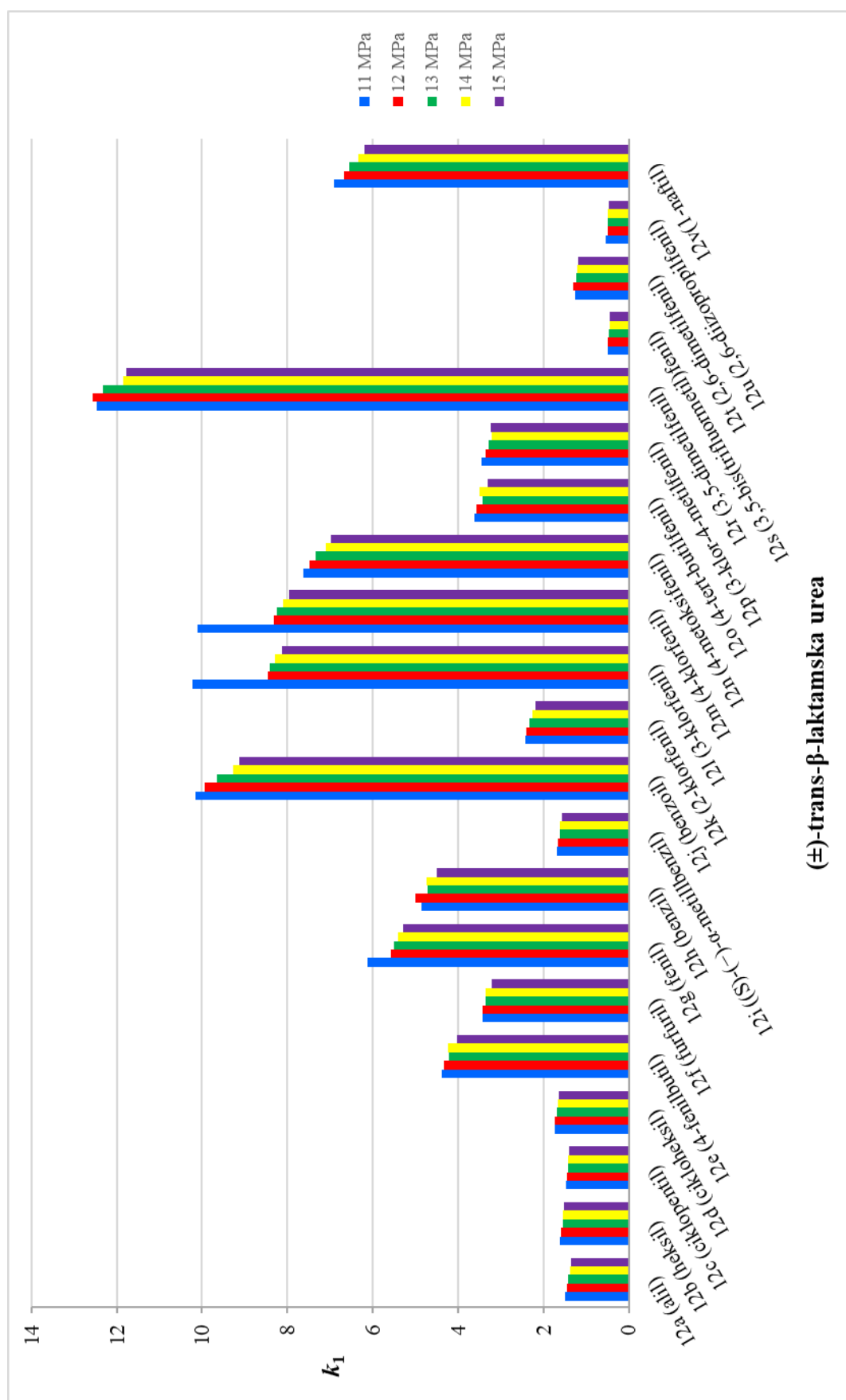
Tablica P2.6. Rezultati odjeljivanja enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 pri različitim povratnim tlakovima

β -Laktamska urea	Supstituent	Povratni tlak (MPa)	$t_{R1}/$ min	$t_{R2}/$ min	k_1	k_2	α	R_s
12a	alil	11	1,69	2,85	1,49	3,19	2,15	6,24
		12	1,66	2,68	1,45	2,96	2,04	5,48
		13	1,65	2,67	1,42	2,91	2,05	5,49
		14	1,64	2,65	1,38	2,85	2,06	5,45
		15	1,63	2,63	1,35	2,80	2,07	5,42
12b	heksil	11	1,77	3,09	1,60	3,54	2,21	6,30
		12	1,75	3,05	1,58	3,51	2,21	6,10
		13	1,74	3,03	1,55	3,44	2,22	6,13
		14	1,75	3,04	1,54	3,42	2,21	6,07
		15	1,74	2,99	1,51	3,31	2,19	6,10
12c	ciklopentil	11	1,68	3,36	1,47	3,94	2,68	7,68
		12	1,66	3,31	1,45	3,89	2,68	7,50
		13	1,66	3,29	1,43	3,82	2,67	7,50
		14	1,66	3,26	1,41	3,74	2,65	7,36
		15	1,66	3,24	1,40	3,68	2,63	7,44
12d	cikloheksil	11	1,86	3,91	1,74	4,75	2,74	7,91
		12	1,84	3,85	1,72	4,69	2,73	7,72
		13	1,83	3,83	1,68	4,62	2,74	7,69
		14	1,83	3,81	1,66	4,54	2,73	7,73
		15	1,83	3,76	1,64	4,43	2,70	7,65
12e	4-fenilbutil	11	3,66	6,83	4,38	9,04	2,06	7,38
		12	3,61	6,73	4,33	8,94	2,06	7,29
		13	3,55	6,59	4,21	8,66	2,06	7,44
		14	3,60	6,69	4,23	8,72	2,06	7,22
		15	3,47	6,4	4,01	8,24	2,06	7,19
12f	furfuril	11	3,01	3,86	3,43	4,68	1,36	3,04
		12	3,00	3,8	3,43	4,61	1,34	2,84
		13	2,97	3,76	3,35	4,51	1,35	2,83
		14	2,99	3,79	3,35	4,51	1,35	2,89
		15	2,92	3,69	3,21	4,32	1,35	2,81
12g	fenil	11	4,85	9,54	6,13	13,0	2,12	8,60
		12	4,45	8,88	5,57	12,1	2,17	7,78
		13	4,44	8,82	5,51	11,9	2,17	7,61
		14	4,40	8,71	5,40	11,6	2,16	7,59
		15	4,36	8,61	5,29	11,4	2,16	7,55
12h	benzil	11	3,98	5,63	4,85	7,28	1,50	4,26
		12	4,06	5,66	5,00	7,36	1,47	3,98
		13	3,90	5,42	4,72	6,95	1,47	4,00
		14	3,94	5,53	4,73	7,04	1,49	4,09
		15	3,81	5,29	4,50	6,63	1,47	4,00

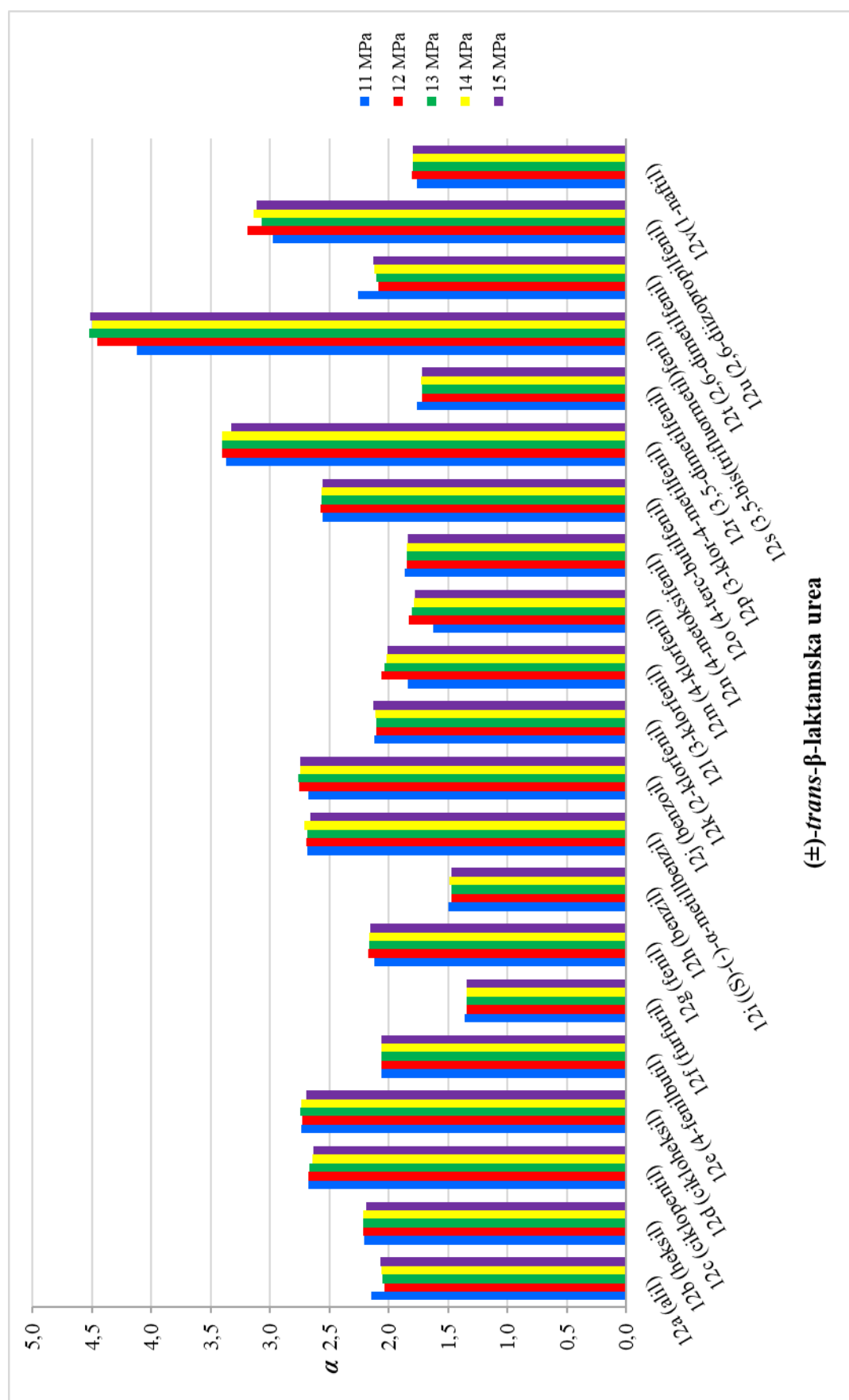
β -Laktamska urea	Supstituent	Povratni tlak (MPa)	t_{R1}/min	t_{R2}/min	k_1	k_2	α	R_s
12i	(S)-(-)- α -metilbenzil	11	1,83	3,77	1,69	4,54	2,69	7,79
		12	1,81	3,73	1,67	4,51	2,69	7,6
		13	1,79	3,66	1,62	4,37	2,69	7,53
		14	1,80	3,7	1,62	4,38	2,71	7,54
		15	1,78	3,58	1,57	4,17	2,66	7,47
12j	benzoil	11	7,58	19,18	10,1	27,2	2,68	11,7
		12	7,40	19,21	9,93	27,3	2,76	10,8
		13	7,26	18,86	9,65	26,6	2,76	10,7
		14	7,06	18,17	9,26	25,4	2,74	10,4
		15	7,01	18,05	9,12	25,0	2,75	10,7
12k	2-klorfenil	11	2,33	4,14	2,43	5,09	2,10	7,34
		12	2,30	4,09	2,40	5,04	2,10	6,91
		13	2,27	4,02	2,33	4,89	2,10	6,84
		14	2,24	3,97	2,26	4,77	2,11	6,75
		15	2,22	3,92	2,19	4,66	2,13	6,67
12l	3-klorfenil	11	7,63	13,48	10,2	18,8	1,84	6,89
		12	6,40	12,48	8,45	17,4	2,06	7,39
		13	6,41	12,32	8,40	17,0	2,03	7,19
		14	6,39	12,19	8,29	16,7	2,02	7,09
		15	6,33	12,03	8,13	16,3	2,01	6,99
12m	4-klorfenil	11	7,55	11,87	10,1	16,4	1,63	5,49
		12	6,30	10,96	8,31	15,1	1,83	6,14
		13	6,31	10,83	8,25	14,8	1,80	5,96
		14	6,27	10,68	8,11	14,5	1,79	5,82
		15	6,21	10,53	7,96	14,1	1,78	5,75
12n	4-metoksifenil	11	5,87	10,34	7,63	14,2	1,86	6,69
		12	5,75	10,05	7,49	13,8	1,85	6,46
		13	5,69	9,92	7,34	13,5	1,84	6,47
		14	5,58	9,74	7,11	13,1	1,85	6,35
		15	5,54	9,61	6,99	12,8	1,84	6,44
12o	4- <i>tert</i> -butilfenil	11	3,14	6,97	3,62	9,25	2,56	8,56
		12	3,10	6,91	3,58	9,21	2,57	8,34
		13	3,02	6,69	3,43	8,81	2,57	8,33
		14	3,09	6,85	3,49	8,96	2,57	8,36
		15	2,98	6,54	3,30	8,44	2,56	8,34
12p	3-klor-4-metilfenil	11	3,03	8,6	3,46	11,6	3,37	11,0
		12	2,95	8,4	3,36	11,4	3,40	10,9
		13	2,92	8,3	3,28	11,1	3,40	10,9
		14	2,89	8,18	3,20	10,8	3,40	10,9
		15	2,93	8,15	3,23	10,7	3,33	10,9
12r	3,5-dimetilfenil	11	9,15	15,61	12,4	21,9	1,76	6,00
		12	9,18	15,33	12,5	21,6	1,72	5,65
		13	9,09	15,16	12,3	21,2	1,72	5,66
		14	8,84	14,79	11,8	20,5	1,73	5,67
		15	8,86	14,72	11,7	20,2	1,72	5,64

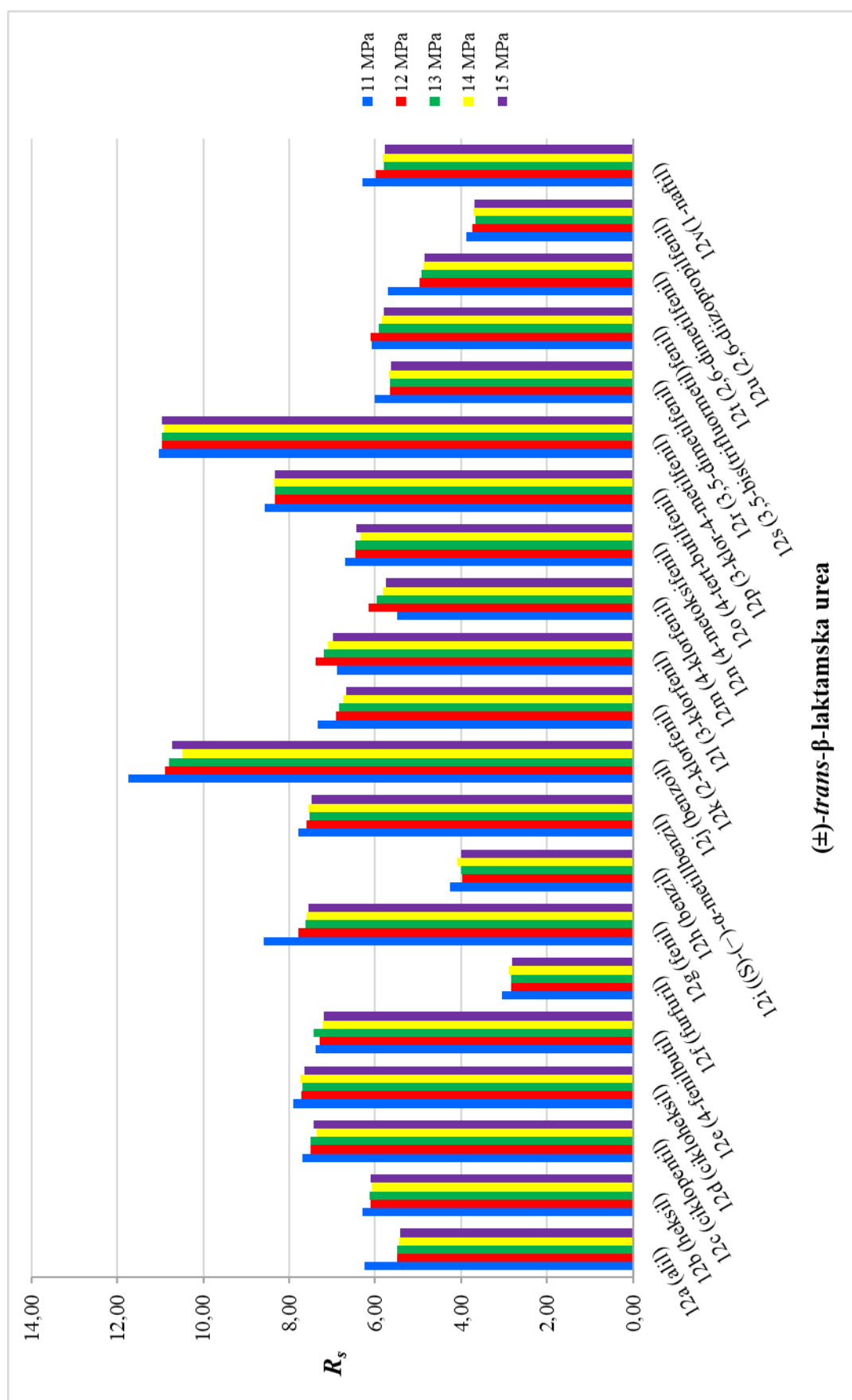
β -Laktamska urea	Supstituent	Povratni tlak (MPa)	$t_{R1}/$ min	t_{R2} min	k_1	k_2	α	R_s
12s	3,5-bis(trifluormetil)fenil	11	1,01	2,04	0,49	2,00	4,12	6,08
		12	1,01	2,16	0,49	2,19	4,45	6,10
		13	1,00	2,12	0,47	2,11	4,52	5,92
		14	1,00	2,09	0,45	2,04	4,49	5,84
		15	1,00	2,08	0,44	2,00	4,52	5,79
12t	2,6-dimetilfenil	11	1,53	2,6	1,25	2,82	2,26	5,69
		12	1,55	2,5	1,29	2,69	2,09	4,96
		13	1,53	2,47	1,24	2,62	2,11	4,93
		14	1,52	2,45	1,21	2,56	2,12	4,88
		15	1,51	2,43	1,18	2,51	2,13	4,85
12u	2,6-diizopropilfenil	11	1,04	1,75	0,53	1,57	2,97	3,87
		12	1,01	1,74	0,49	1,57	3,19	3,74
		13	1,02	1,72	0,50	1,52	3,07	3,66
		14	1,02	1,73	0,48	1,51	3,14	3,70
		15	1,02	1,71	0,47	1,47	3,11	3,68
12v	1-naftil	11	5,37	8,96	6,90	12,1	1,77	6,29
		12	5,20	8,84	6,68	12,0	1,80	5,98
		13	5,14	8,69	6,54	11,7	1,80	5,8
		14	5,05	8,54	6,34	11,4	1,80	5,82
		15	4,99	8,4	6,20	11,1	1,79	5,78

Kolona: Chirallica PST-10, pokretna faza: CO₂/MeOH (70:30, v/v), protok 4 mL min⁻¹, temperatura kolone 35 °C, UV detekcija 254 nm, povratni tlak 11 - 15 MPa. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.



Slika P2.14. Usporedba faktora zadržavanja prvoizlazećih enantiomera ($\pm$)-*trans*- β -laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 pri različitim povratnim tlakovima





Slika P2.16. Usporedba razlučivanja R_s enantiomera (±)-trans-β-laktamskih urea **12a-v** na koloni Chirallica PST-10 pri različitim povratnim tlakovim

PRILOG 3 - HPLC enantioseparacija ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i

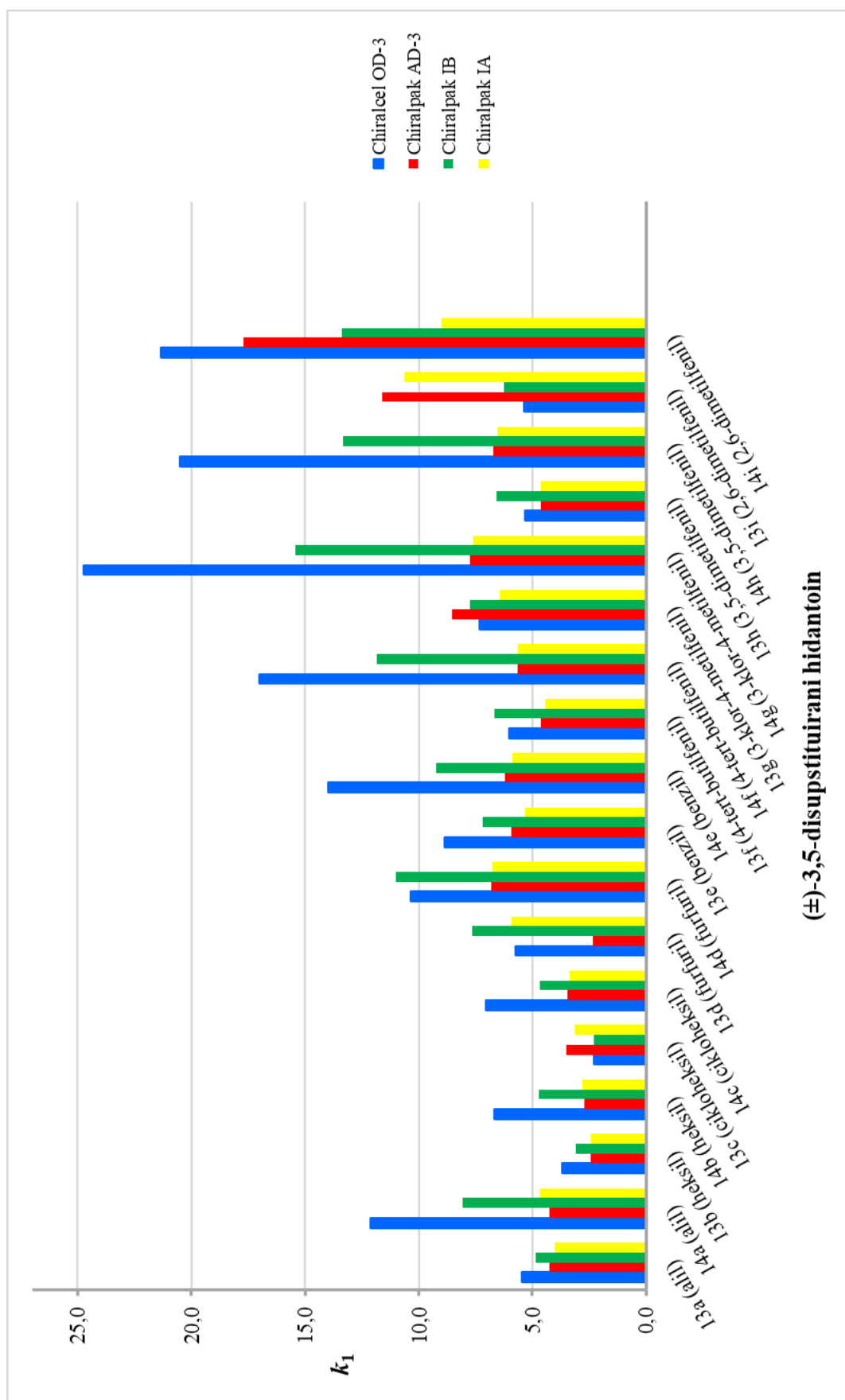
Prilog 3.1. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na enantioseparaciju ($\pm$)-3,5-disupstituiranih hidantoina 13a-i i 14a-i

Tablica P3.1. Utjecaj kiralne nepokretne faze na odjeljivanje enantiomera ($\pm$)-*cis*- i ($\pm$)-*trans*-3,5-disupstituiranih hidantoina

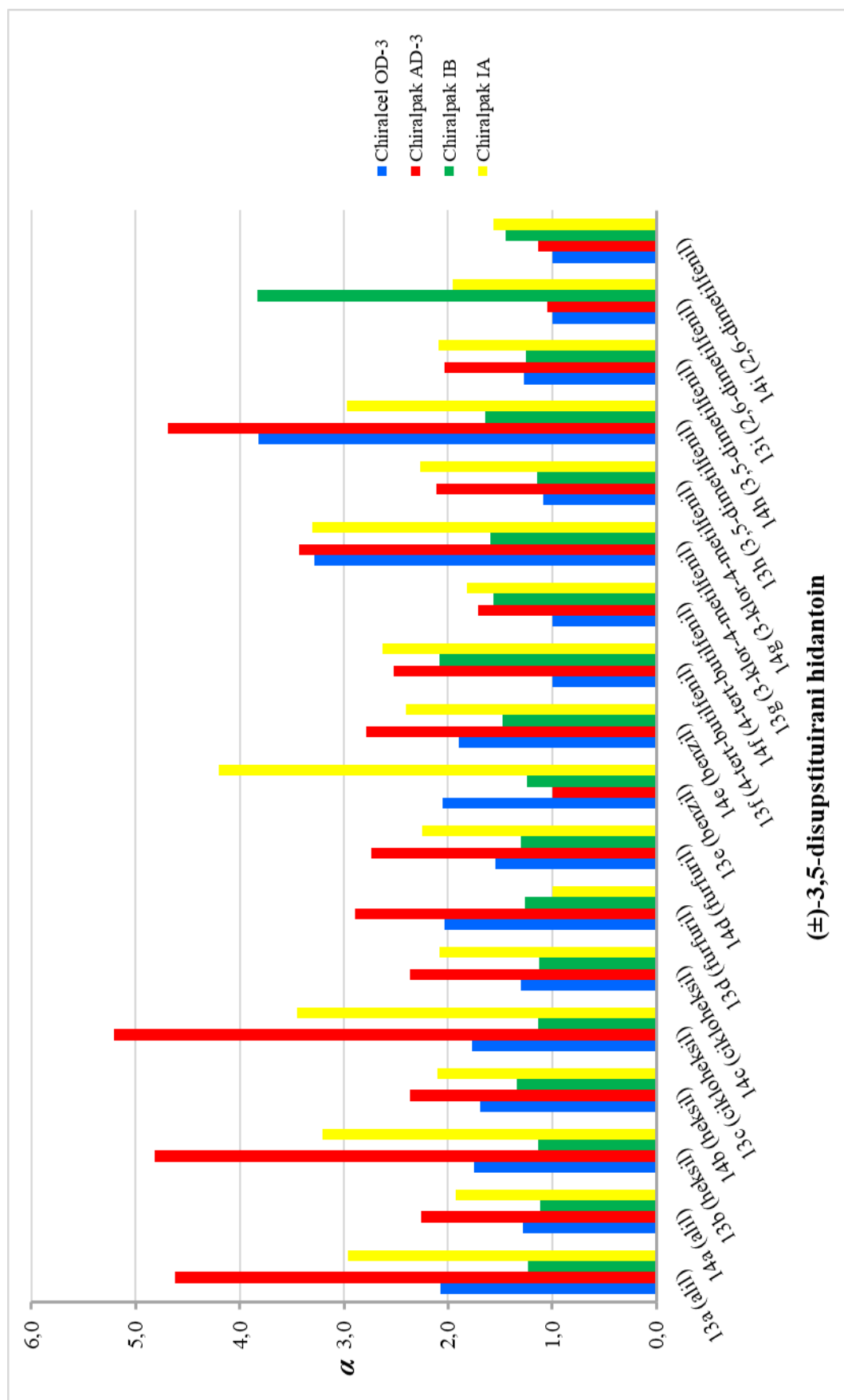
Hupstituent	Hidantoin	Kolona	$t_{R1}/$ min	t_{R2} min	k_1	k_2	α	R_s
alil	13a	Chiralcel OD-3	18,48	35,17	5,45	11,28	2,07	7,96
		Chiralpak AD-3	14,80	58,22	4,26	19,70	4,62	28,27
		Chiralpak IB	17,54	20,82	4,84	5,93	1,23	3,21
		Chiralpak IA	14,85	38,19	4,03	11,95	2,96	16,82
	14a	Chiralcel OD-3	37,59	47,47	12,13	15,57	1,28	3,12
		Chiralpak AD-3	14,74	29,74	4,24	9,57	2,26	14,67
		Chiralpak IB	27,16	30,10	8,05	9,02	1,12	2,14
		Chiralpak IA	16,68	29,43	4,66	8,98	1,93	10,45
heksil	13b	Chiralcel OD-3	13,40	21,28	3,68	6,43	1,75	5,59
		Chiralpak AD-3	9,75	36,21	2,46	11,87	4,82	24,49
		Chiralpak IB	12,32	13,59	3,10	3,52	1,14	1,98
		Chiralpak IA	10,18	26,11	2,45	7,85	3,21	17,09
	14b	Chiralcel OD-3	21,95	35,06	6,66	11,24	1,69	6,07
		Chiralpak AD-3	10,41	20,83	2,70	6,40	2,37	15,76
		Chiralpak IB	17,16	22,04	4,71	6,34	1,34	5,77
		Chiralpak IA	11,26	20,41	2,82	5,92	2,10	11,81
cikloheksil	13c	Chiralcel OD-3	9,42	14,44	2,29	4,04	1,77	4,51
		Chiralpak AD-3	12,70	54,35	3,51	18,32	5,21	26,26
		Chiralpak IB	9,85	10,81	2,28	2,60	1,14	1,83
		Chiralpak IA	12,28	35,09	3,16	10,90	3,45	18,44
	14c	Chiralcel OD-3	23,08	29,18	7,06	9,19	1,30	3,06
		Chiralpak AD-3	12,52	25,77	3,45	8,16	2,37	14,94
		Chiralpak IB	17,10	18,86	4,69	5,28	1,13	2,1
		Chiralpak IA	12,83	23,52	3,35	6,97	2,08	11,72
furfuril	13d	Chiralcel OD-3	19,37	36,40	5,76	11,71	2,03	8,79
		Chiralpak AD-3	9,36	21,72	2,33	6,72	2,89	4,92
		Chiralpak IB	25,95	32,00	7,64	9,65	1,26	3,64
		Chiralpak IA	20,43	20,43	5,92	5,92	1,00	0
	14d	Chiralcel OD-3	32,53	48,74	10,36	16,02	1,55	5,99
		Chiralpak AD-3	21,99	55,39	6,82	18,69	2,74	19,99
		Chiralpak IB	36,05	45,83	11,00	14,26	1,30	4,65
		Chiralpak IA	22,89	47,83	6,76	15,21	2,25	12,99
benzil	13e	Chiralcel OD-3	28,24	54,98	8,86	18,20	2,05	7,65
		Chiralpak AD-3	19,47	19,47	5,92	5,92	1,00	0,00
		Chiralpak IB	24,63	29,76	7,20	8,91	1,24	3,24
		Chiralpak IA	18,72	69,14	5,34	22,44	4,20	21,77
	14e	Chiralcel OD-3	42,84	78,93	13,96	26,56	1,90	9,67
		Chiralpak AD-3	20,23	51,41	6,19	17,28	2,79	19,94
		Chiralpak IB	30,74	44,05	9,23	13,67	1,48	7,16
		Chiralpak IA	20,34	44,71	5,90	14,16	2,40	14,42

Supstituent	Hidantoin	Kolona	$t_{R1}/$ min	t_{R2} min	k_1	k_2	α	R_s
4- <i>tert</i> -butilfenil hidantoin	13f	Chiralcel OD-3	20,08	20,08	6,01	6,01	1,00	0
		Chiralpak AD-3	15,82	35,58	4,62	11,65	2,52	14,26
		Chiralpak IB	23,05	44,77	6,68	13,91	2,08	10,31
		Chiralpak IA	16,07	37,51	4,45	11,71	2,63	11,97
	14f	Chiralcel OD-3	51,53	51,53	16,99	16,99	1,00	0
		Chiralpak AD-3	18,68	29,93	5,64	9,64	1,71	8,45
		Chiralpak IB	38,60	58,76	11,85	18,57	1,57	7,71
		Chiralpak IA	19,63	33,38	5,66	10,31	1,82	6,24
3-klor-4- metilfenil	13g	Chiralcel OD-3	23,80	71,45	7,31	23,95	3,28	11,47
		Chiralpak AD-3	26,77	85,00	8,52	29,22	3,43	13,02
		Chiralpak IB	26,23	39,97	7,74	12,31	1,59	6,14
		Chiralpak IA	22,02	65,86	6,46	21,32	3,30	16,38
	14g	Chiralcel OD-3	73,70	80,00	24,73	26,93	1,09	1,15
		Chiralpak AD-3	24,61	48,74	7,75	16,33	2,11	13,99
		Chiralpak IB	49,27	56,10	15,41	17,68	1,15	2,35
		Chiralpak IA	25,39	53,83	7,61	17,25	2,27	11,23
3,5-dimetilfenil	13h	Chiralcel OD-3	18,17	61,35	5,34	20,42	3,82	11,84
		Chiralpak AD-3	15,82	63,81	4,62	21,68	4,69	25,02
		Chiralpak IB	22,83	35,54	6,60	10,83	1,64	5,71
		Chiralpak IA	16,54	43,34	4,61	13,69	2,97	14,42
	14h	Chiralcel OD-3	61,64	77,57	20,52	26,09	1,27	2,91
		Chiralpak AD-3	21,70	41,11	6,71	13,62	2,03	12,15
		Chiralpak IB	43,02	53,18	13,33	16,71	1,25	3,66
		Chiralpak IA	22,19	43,24	6,52	13,66	2,09	8,91
2,6-dimetilfenil	13i	Chiralcel OD-3	18,28	18,28	5,38	5,38	1,00	0
		Chiralpak AD-3	35,53	37,05	11,63	12,17	1,05	1,07
		Chiralpak IB	21,84	75,15	6,27	24,03	3,83	16,56
		Chiralpak IA	34,28	64,19	10,62	20,76	1,96	7,67
	14i	Chiralcel OD-3	64,00	64,00	21,35	21,35	1,00	0
		Chiralpak AD-3	52,60	59,44	17,70	20,13	1,14	1,55
		Chiralpak IB	43,20	61,26	13,39	19,40	1,45	5,71
		Chiralpak IA	29,56	44,66	9,02	14,14	1,57	6,65

Kolone: Chiralcel OD-3, Chiralpak AD-3, Chiralpak IB i Chiralpak IA, pokretna faza heksan/2-PrOH (9:1, v/v), protok 1 mL min⁻¹, UV detekcija 254 nm, temperatura kolone 30 °C. t_{R1} - vrijeme zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, t_{R2} - vrijeme zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, k_1 - faktor zadržavanja prvoizlazećeg enantiomera, k_2 - faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera, α - separacijski faktor i R_s - razlučivanje enantiomera.

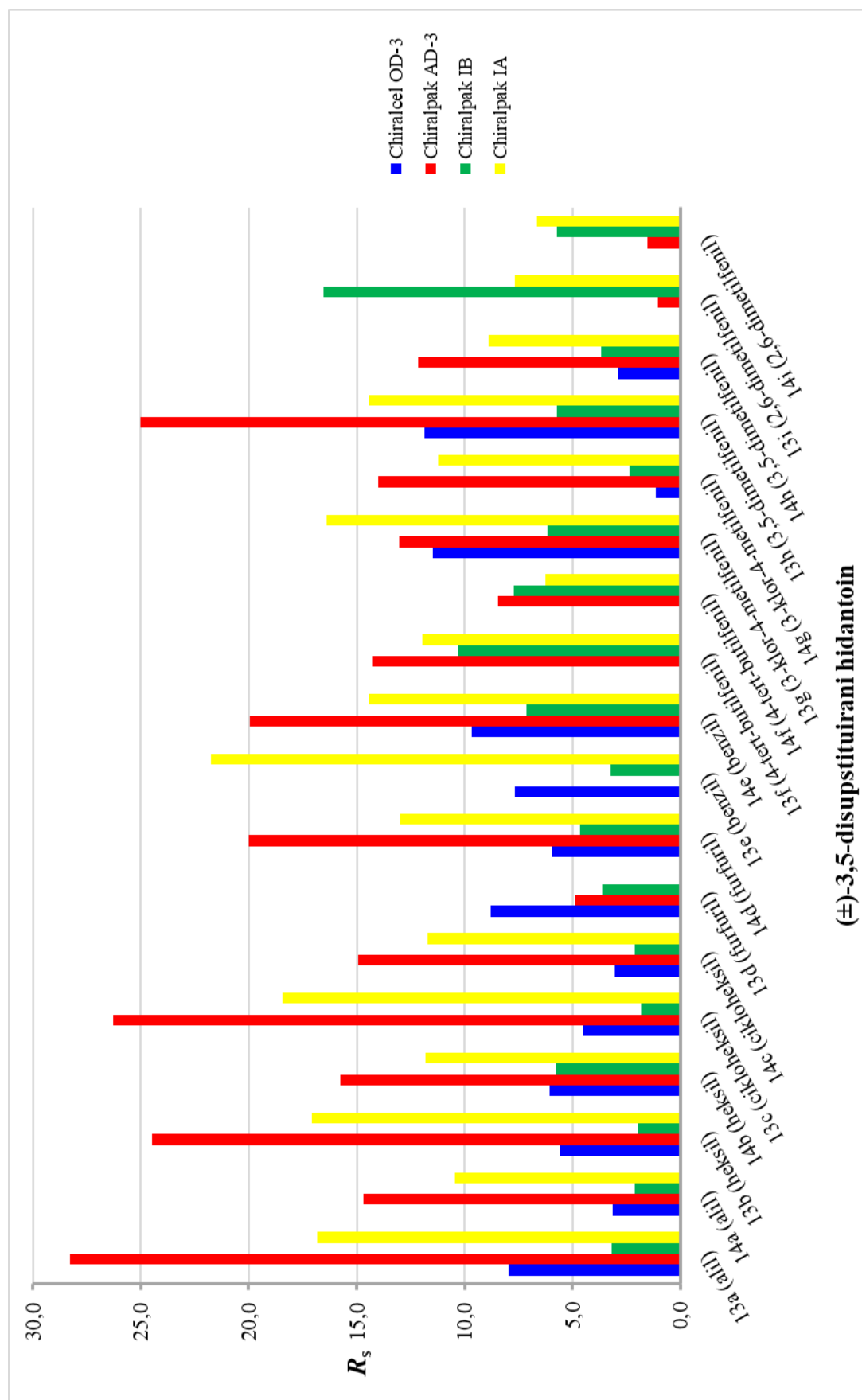


Slika P3.1. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na faktor zadržavanja proizlazećih enantiomera (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**



(±)-3,5-disupstituirani hidantoin

Slika P3.2. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na separacijskih faktor α enantiomera (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**

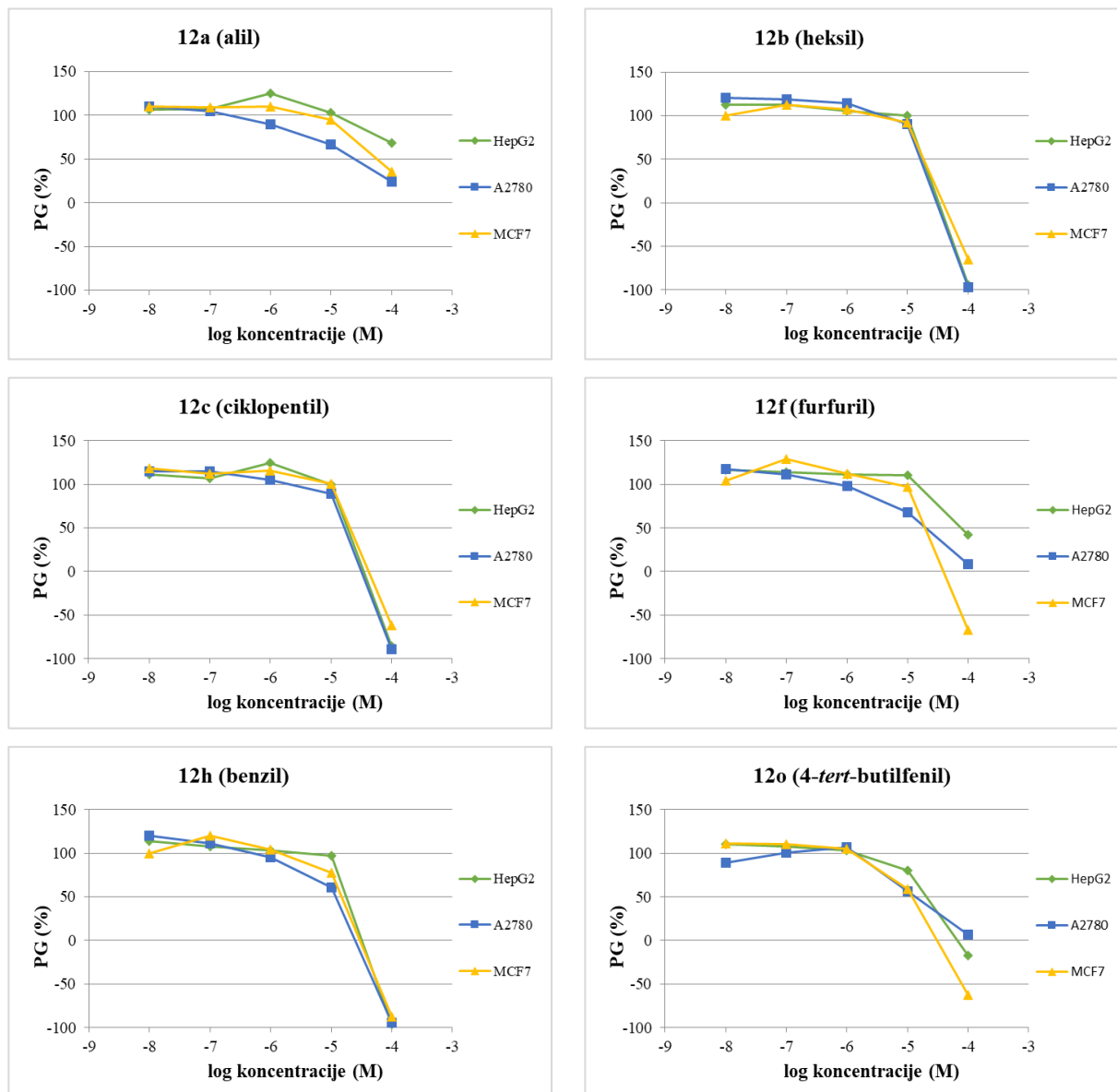


(±)-3,5-disupstituirani hidantoin

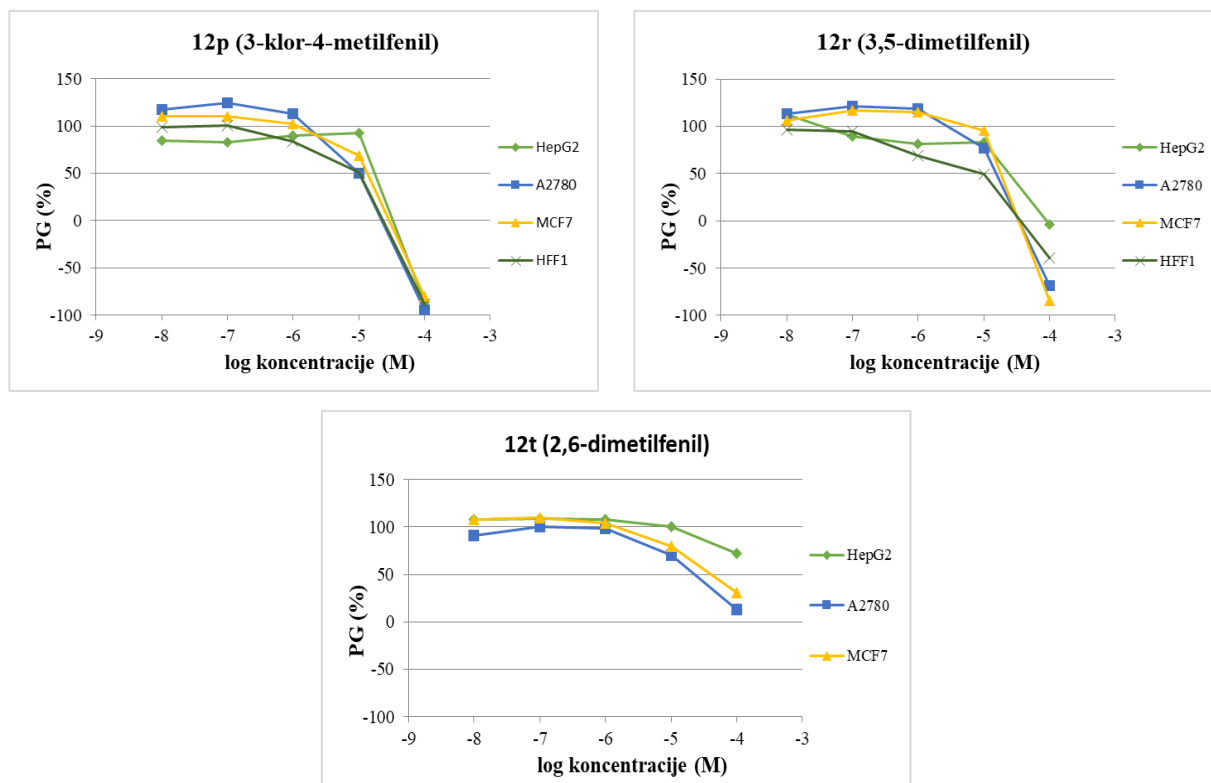
Slika P3.3. Utjecaj kiralnih nepokretnih faza na razlučivanja R_s enantiomera (±)-3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**

PRILOG 4 - BIOLOŠKA ISPITIVANJA

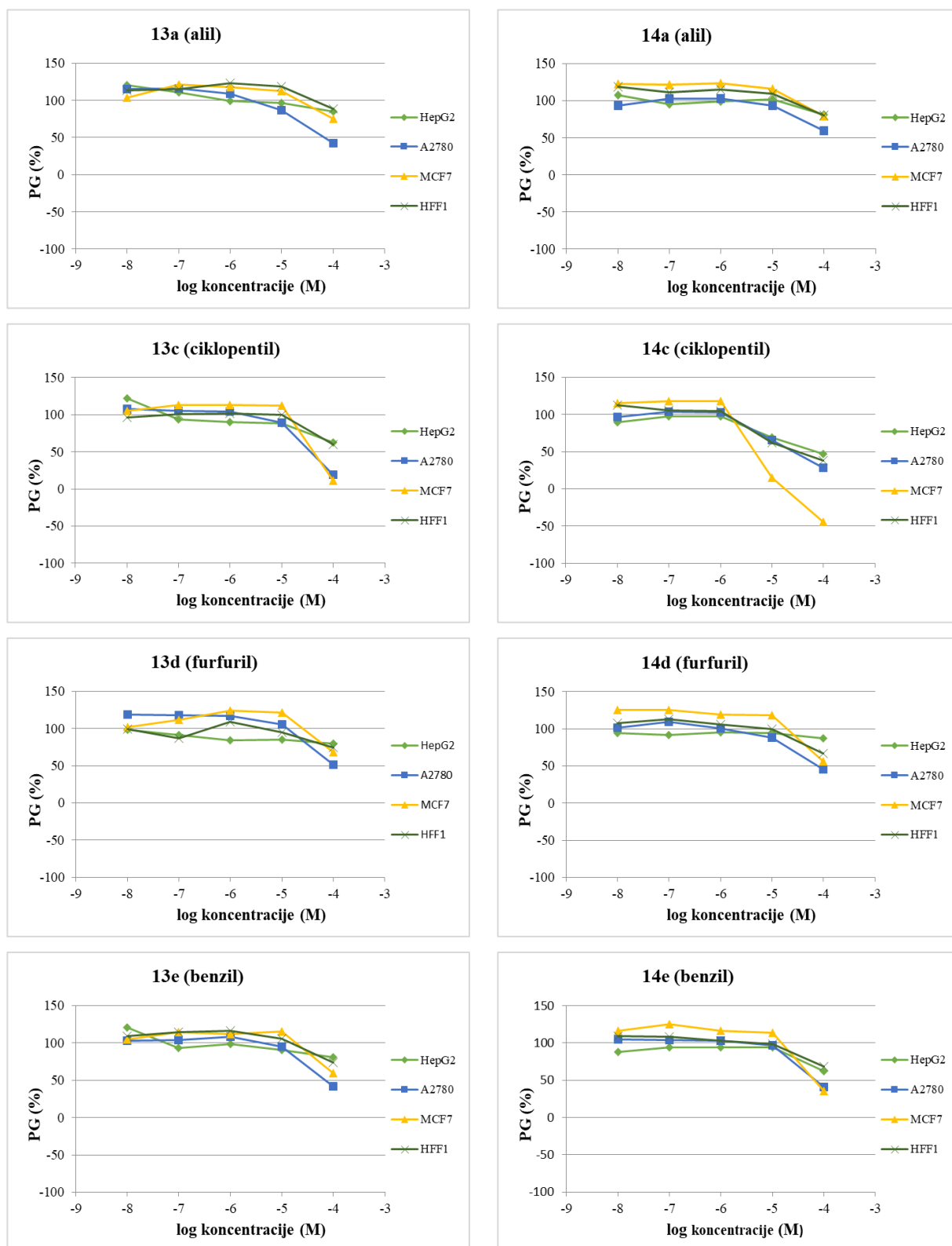
Prilog 4.1. Određivanje antitumorske aktivnosti *trans*- β -laktamskih urea **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h**, **12o**, **12p**, **12r** i **12t**



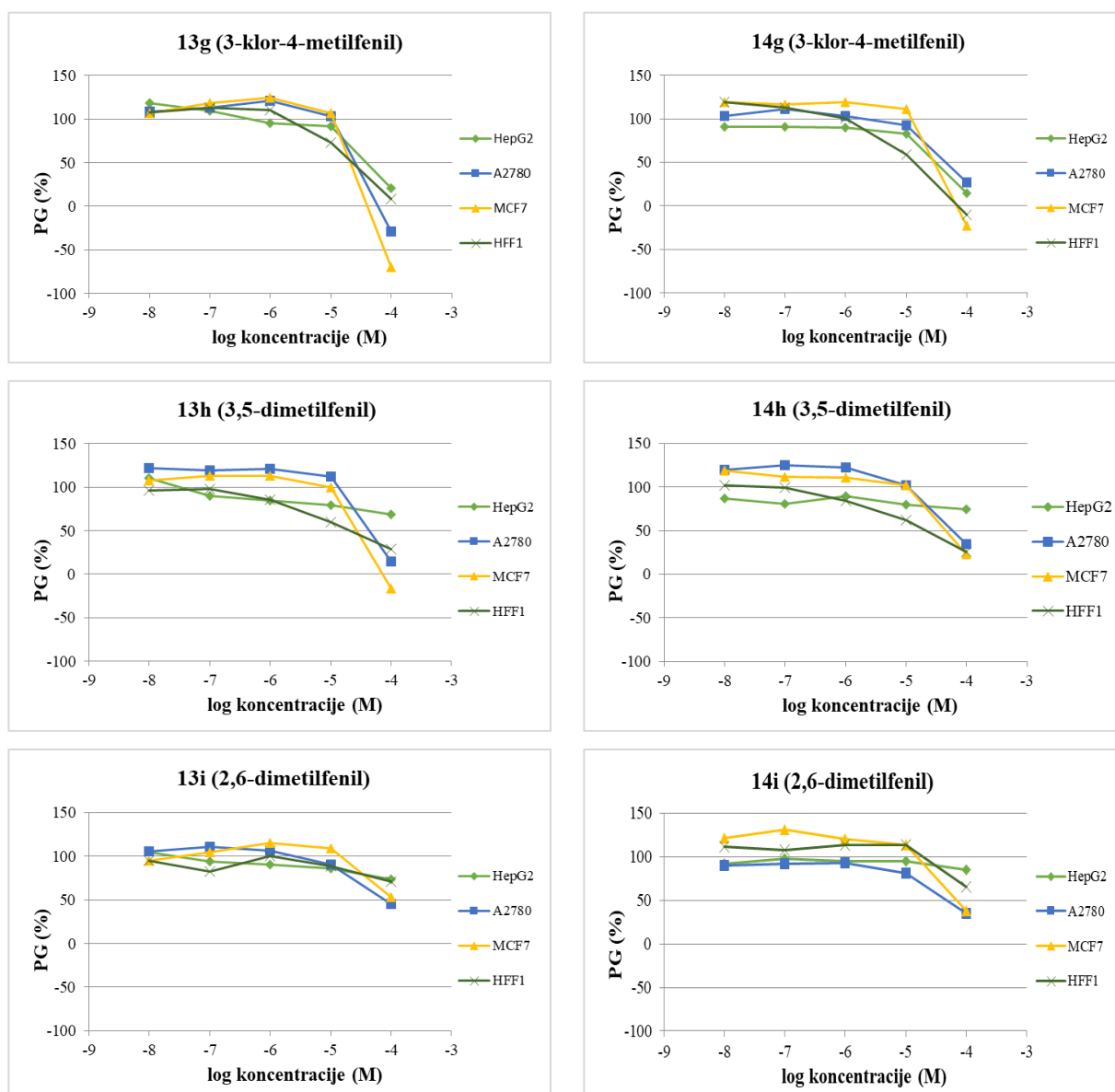
Slika P4.1. Krivulje rasta stanica HepG2, A2780 i MCF7 tretiranih s *trans*- β -laktamskim ureama **12a**, **12b**, **12c**, **12f**, **12h** i **12o**



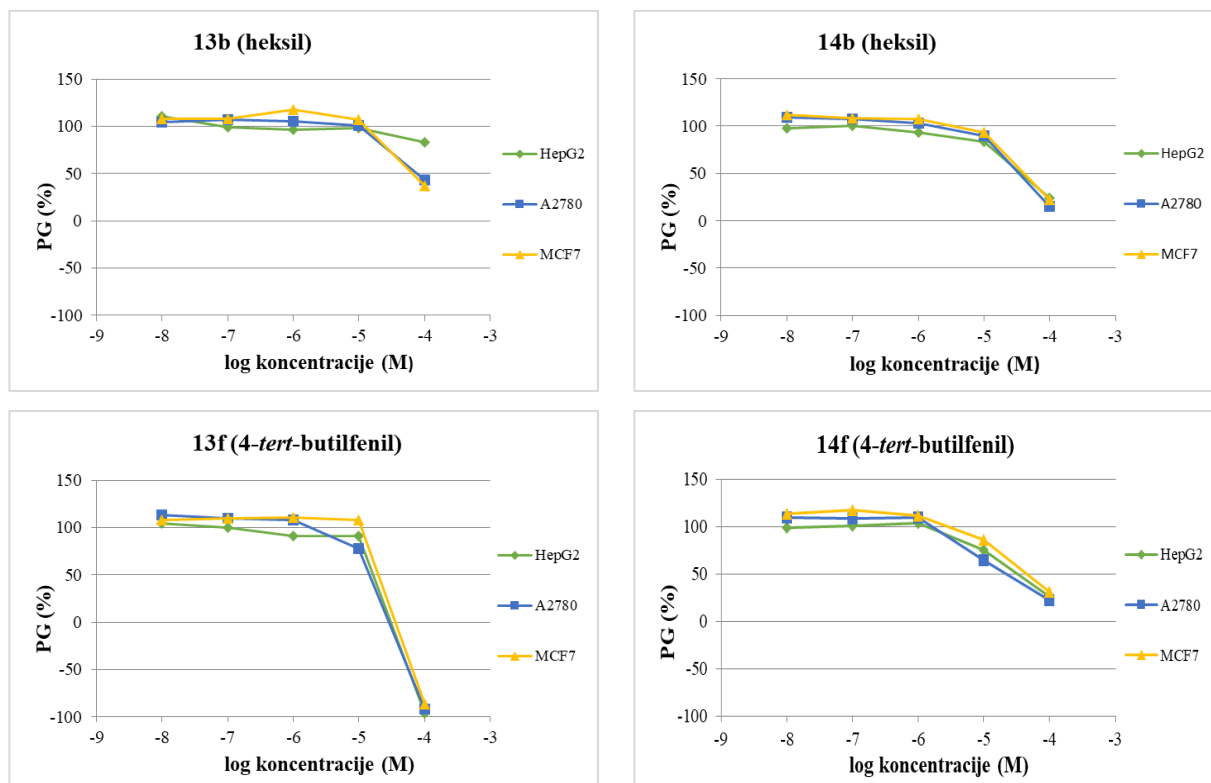
Slika P4.2. Krivulje rasta stanica HepG2, A2780, MCF7 i HFF1 tretiranih s *trans*- β -laktamskim ureama **12p**, **12r** i **12t**

Prilog 4.2. Određivanje antitumorske aktivnosti 3,5-disupstituiranih hidantoina **13a-i** i **14a-i**

Slika P4.3. Krivulje rasta stanica HepG2, A2780, MCF7 i HFF1 tretiranih s 3,5-disupstituiranim hidantoinima **13a**, **13c**, **13d**, **13e**, **14a**, **14c**, **14d** i **14e**

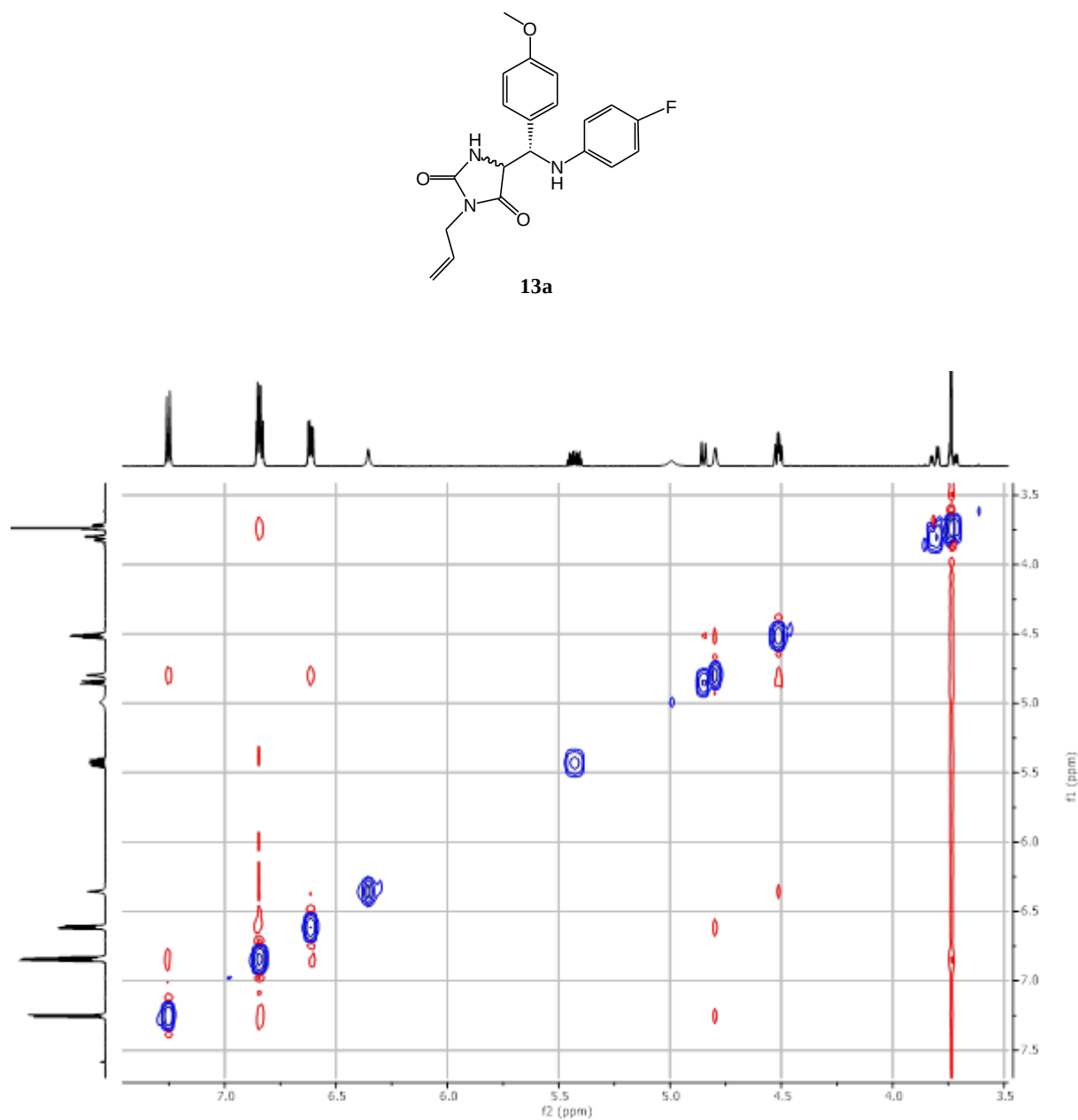


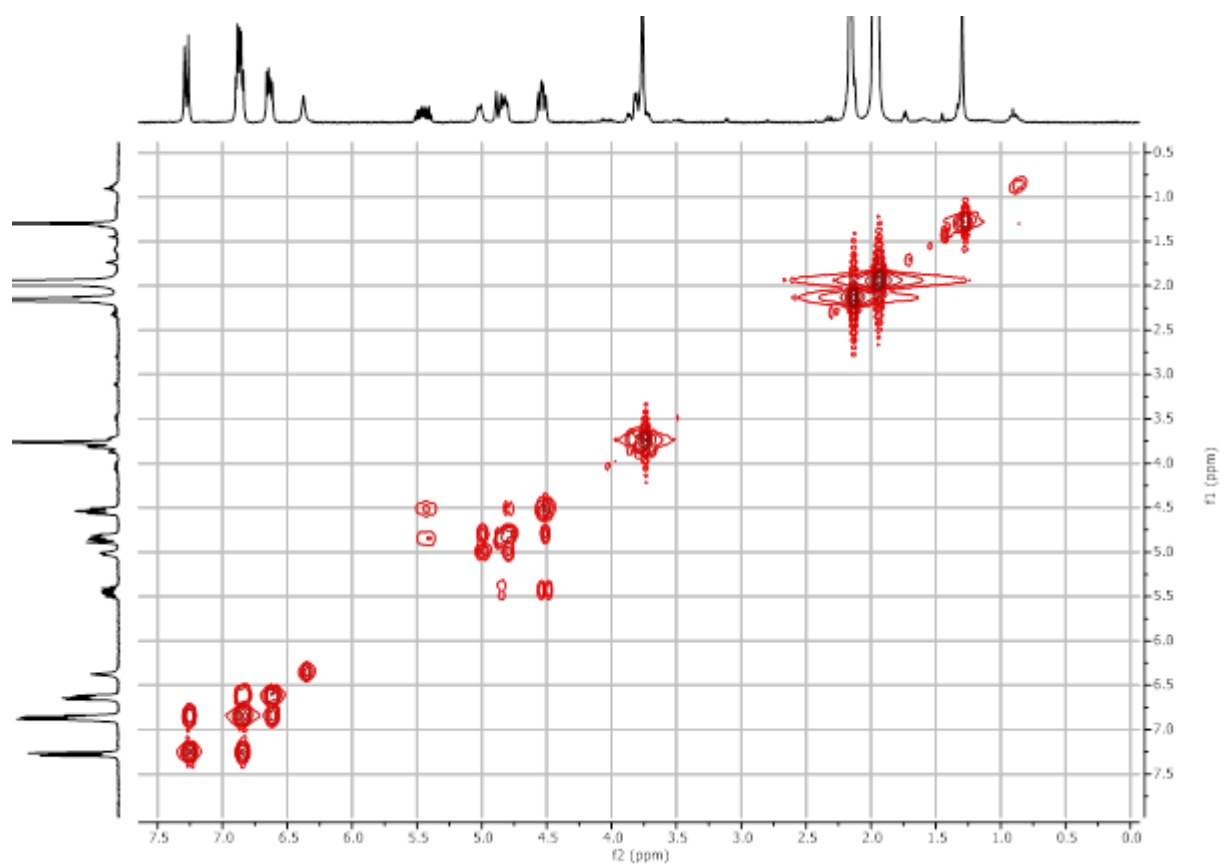
Slika P4.4. Krivulje rasta stanica HepG2, A2780, MCF7 i HFF1 tretiranih s 3,5-disupstituuiranim hidantoinima **13g**, **13h**, **13i**, **14g**, **14h** i **14i**



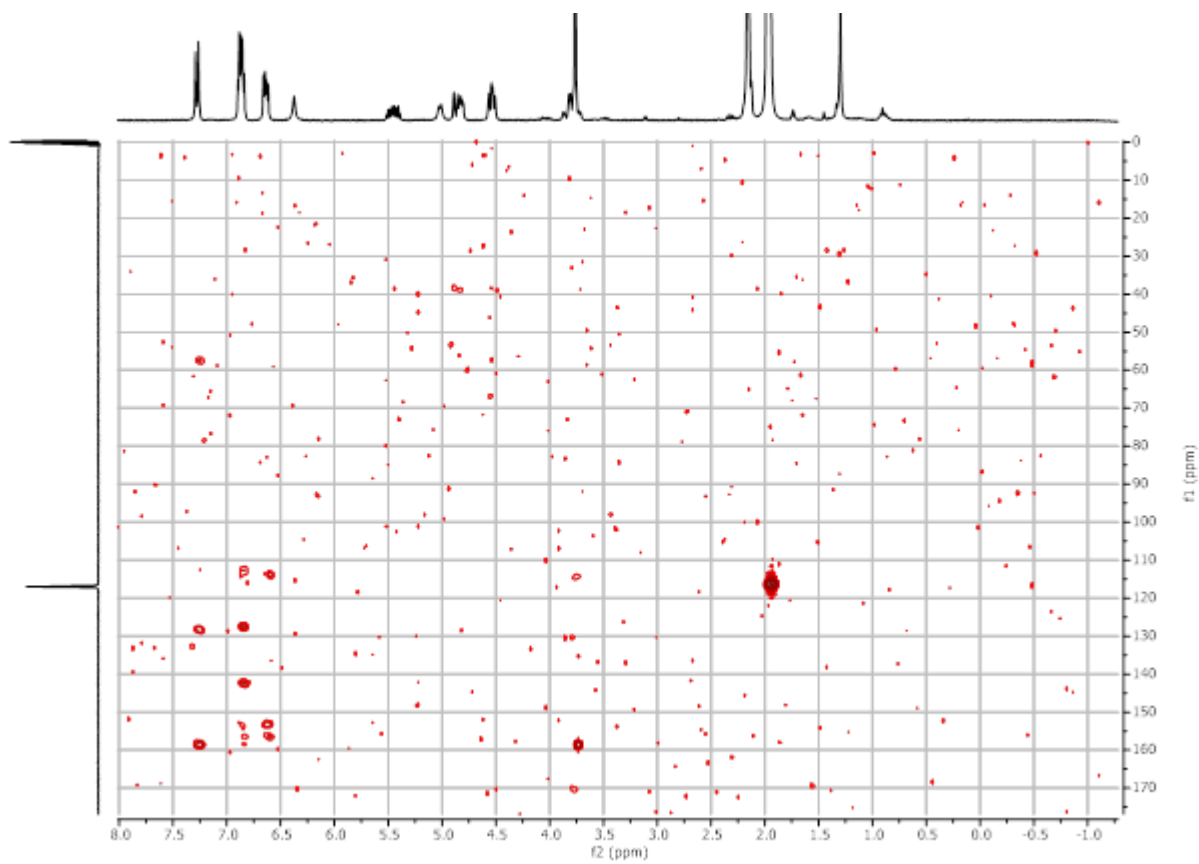
Slika P4.5. Krivulje rasta stanica HepG2, A2780 i MCF7 tretiranih s 3,5-disupstituiranim hidantoinima **13b**, **13f**, **14b** i **14f**

PRILOG 5 - 2D NMR SPEKTRI SPOJEVA 13a I 14a

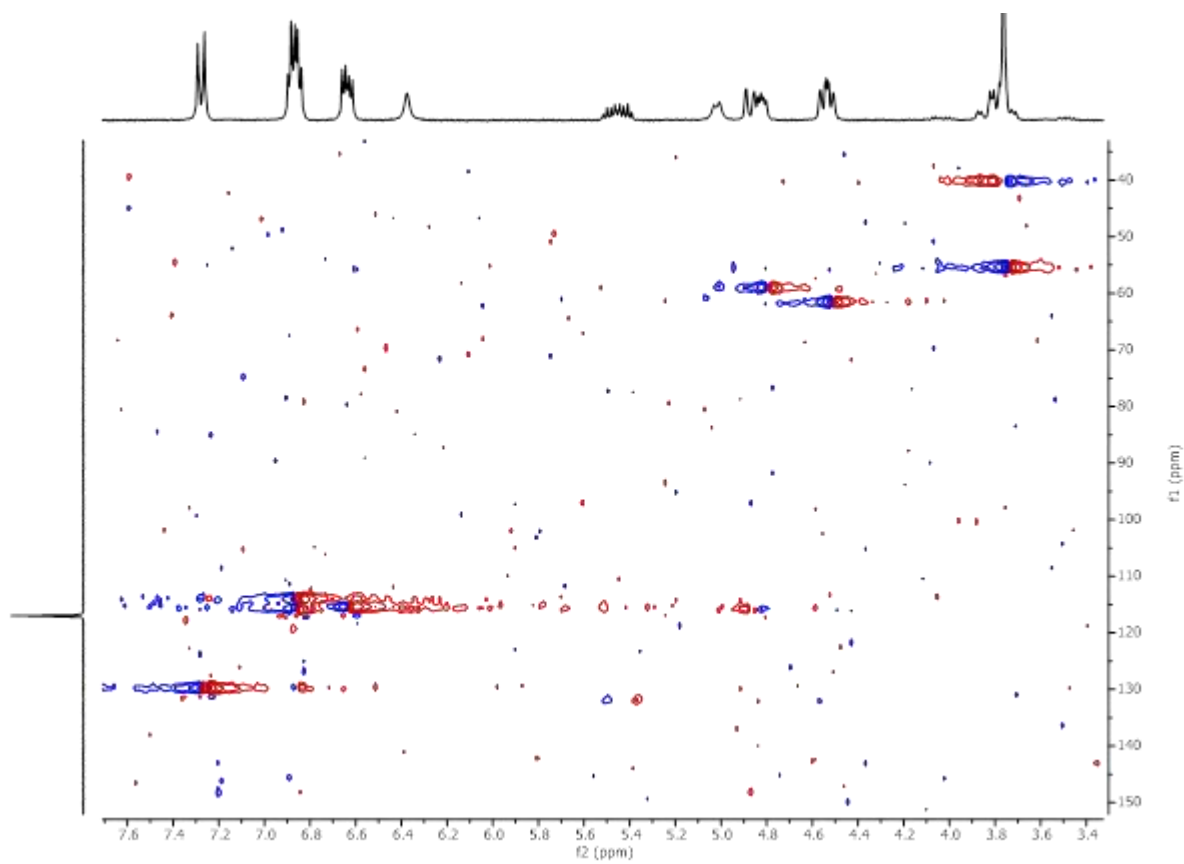
Prilog 5.1. 2D NMR spektri spoja **13a**Slika P5.1. NOSEY spektar spoja **13a** snimljen u CD₃CN



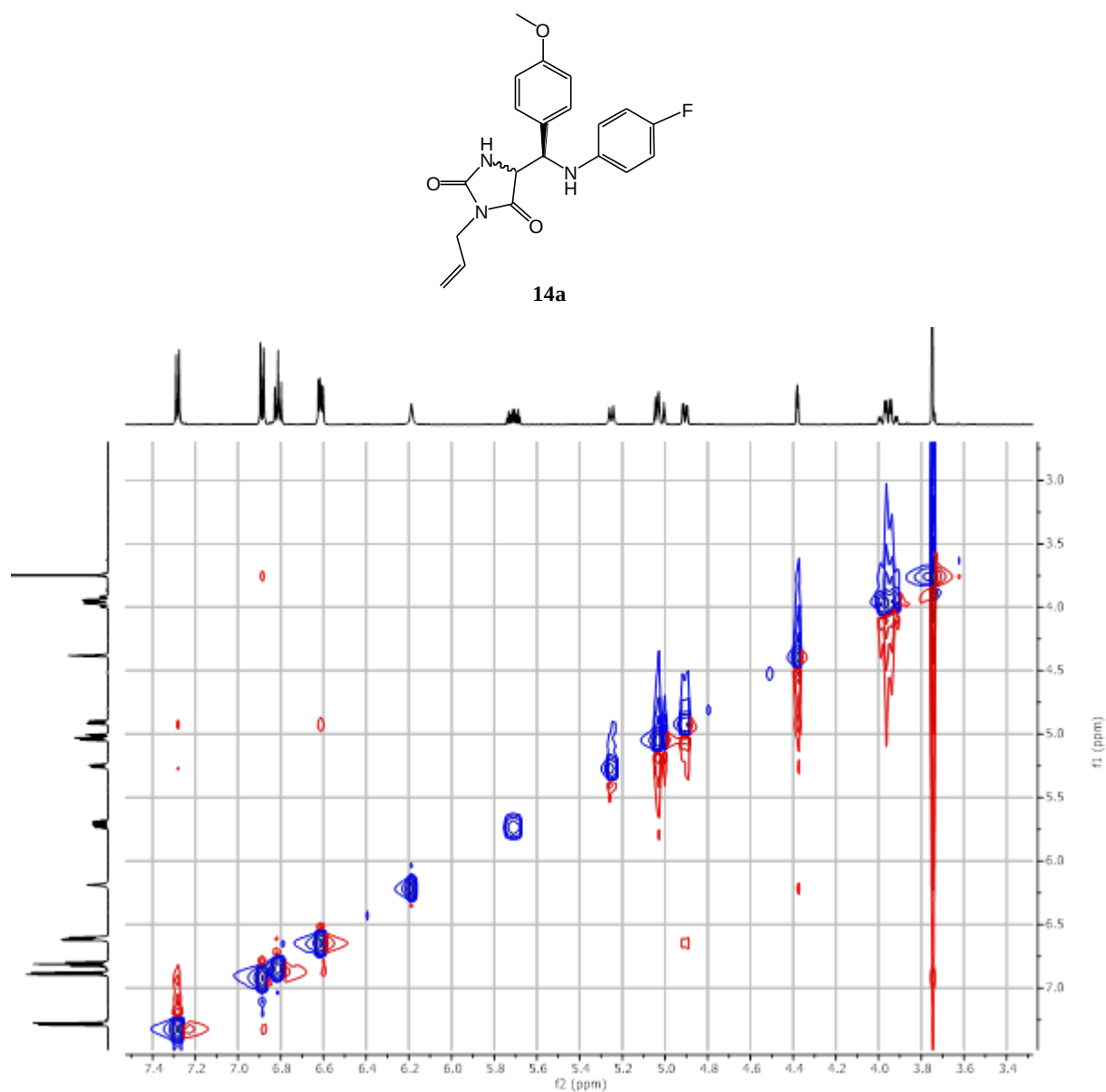
Slika P5.2. COSY spektar spoja **13a** snimljen u CD_3CN

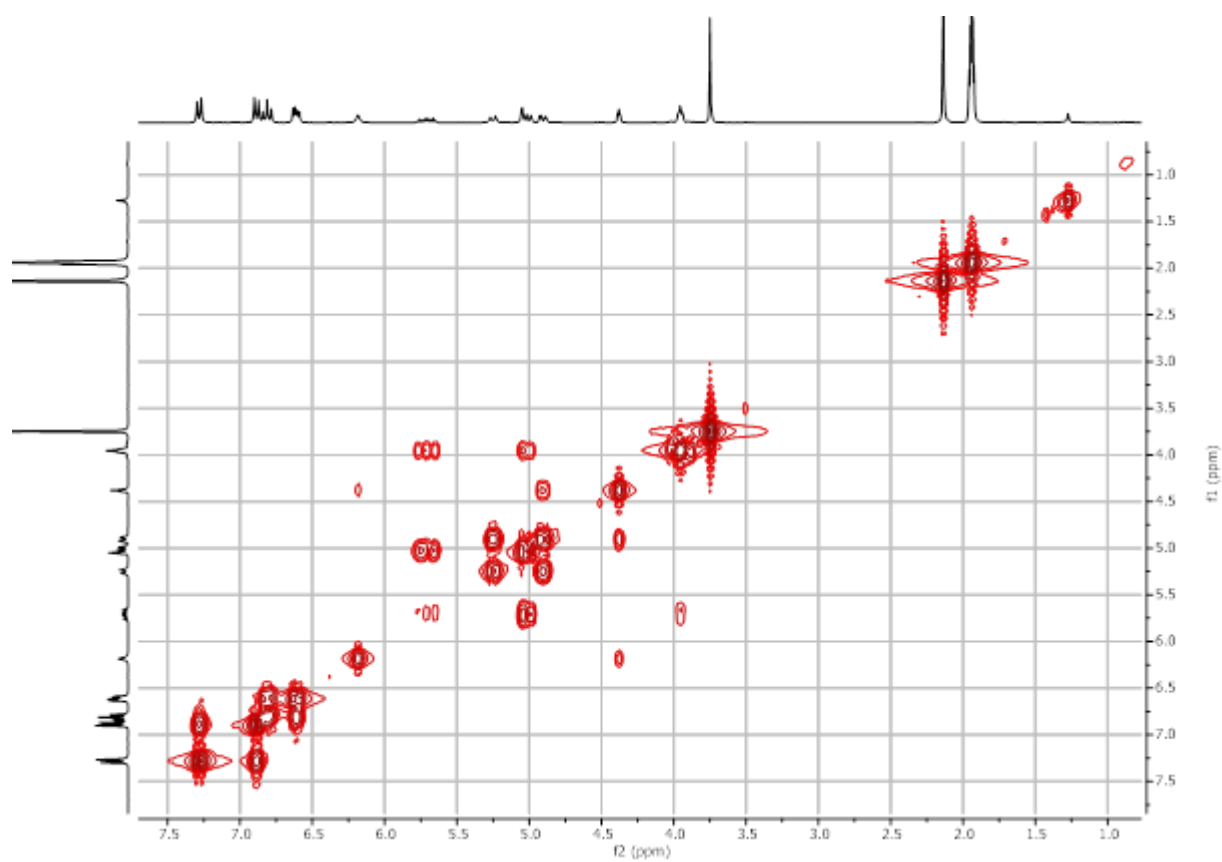


Slika P5.3. HMBC spektar spoja **13a** snimljen u CD_3CN

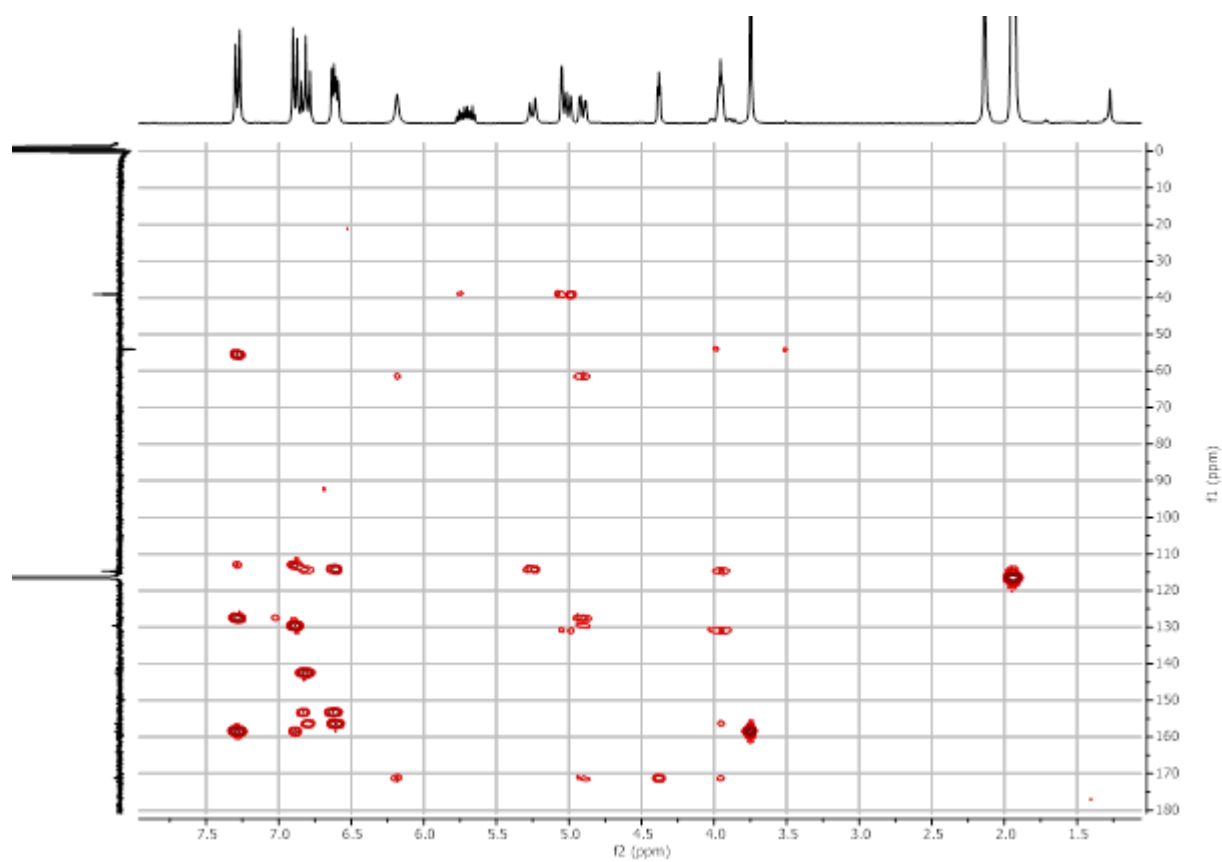


Slika P5.4. HSQC spektar spoja **13a** snimljen u CD_3CN

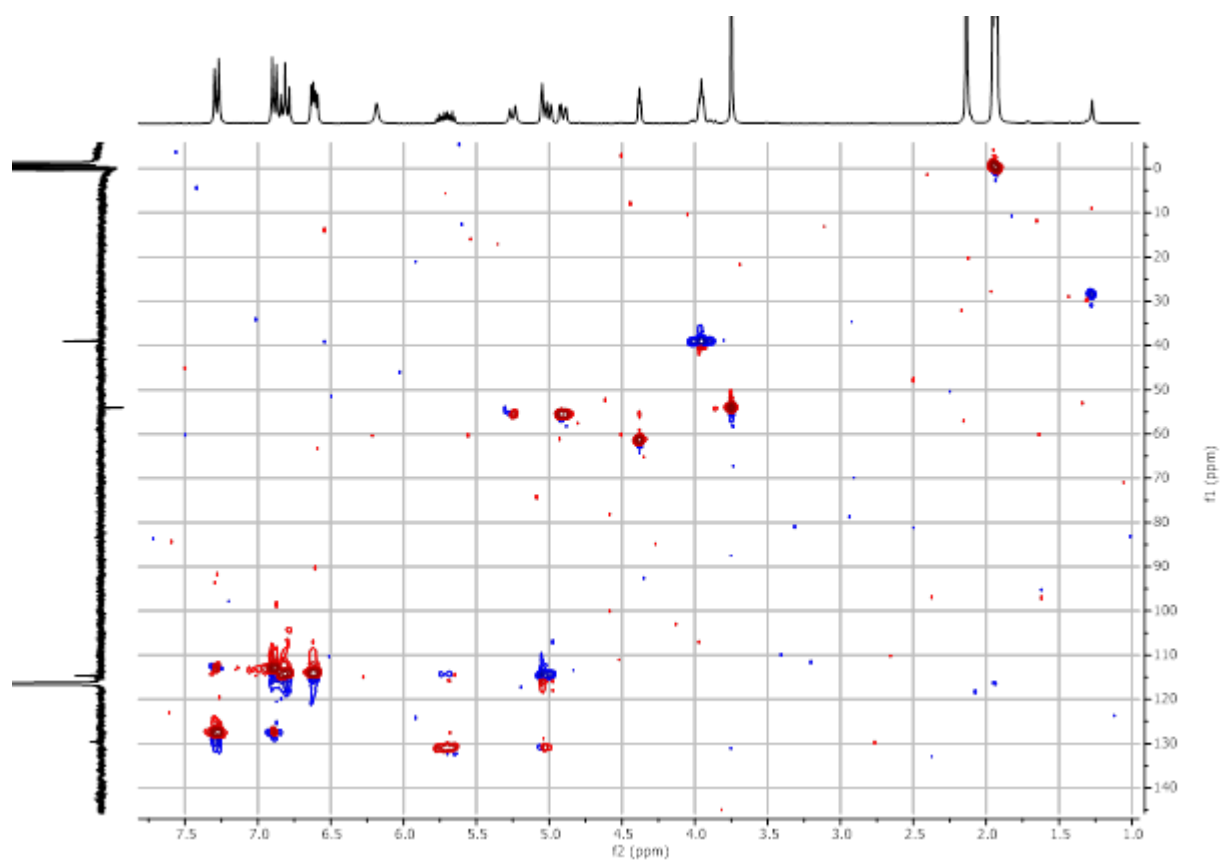
Prilog 5.2. 2D NMR spektri spoja **14a**Slika P5.5. NOSEY spektar spoja **14a** snimljen u CD₃CN



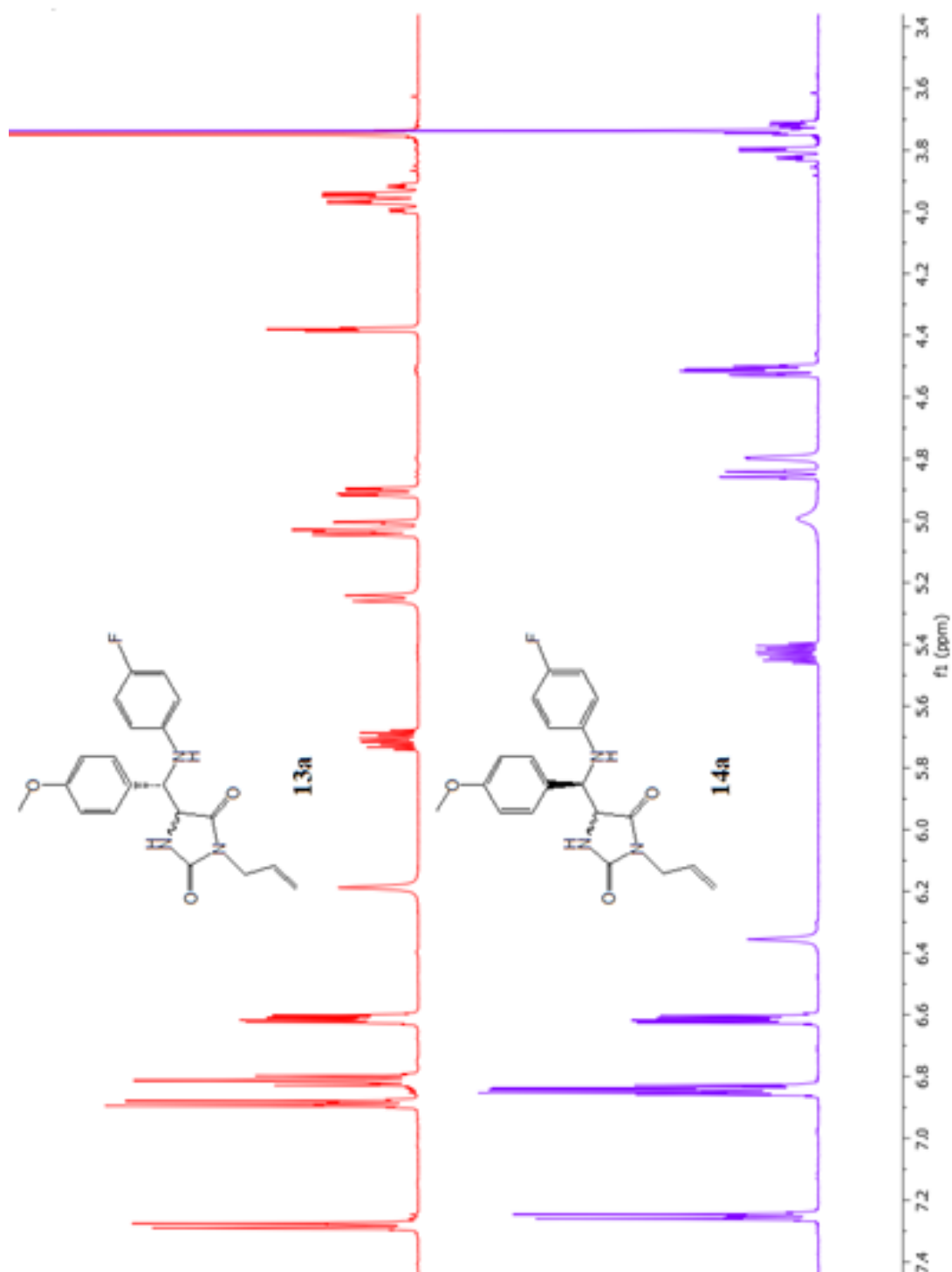
Slika P5.6. COSY spektar spoja **14a** snimljen u CD₃CN



Slika P5.7. HMBC spektar spoja **14a** snimljen u CD_3CN



Slika P5.8. HSQC spektar spoja **13a** snimljen u CD_3CN

Prilog 5.3. Preklopljeni ^1H NMR spektri spojeva **13a** i **14a**Slika P5. 9. ^1H NMR spektar za **13a** (crvena) i **14a** (ljubičasta)

9. ŽIVOTOPIS

Mladenka Jurin rođena je 30. ožujka 1985. godine u Šibeniku. Osnovnu školu završila je u Primoštenu, a srednju Prirodoslovno-tehničku školu, smjer kemijski tehničar u Splitu. Diplomirala je 2009. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom akademika prof. dr. sc. Vitomira Šunjića i dr. sc. Darka Kontreca diplomskim radom „Utjecaj aditiva na kvalitetu kiralnih nepokretnih faza koje su utemeljene na celuloza *tris*-fenilkarbamatu i *tris*-benzoatu.” U proteklih jedanaest godina kontinuirano se razvijala stičući raznovrsna znanja i iskustva u okviru struke – od organska sinteze i biokemije do analitike i GLP/GMP dokumentacije. Radila je u različitim okruženjima – znanstvenom (Chirallica d.o.o. i Institut Ruđer Bošković), industrijskom – procesna analitika (Genera Analitika d.o.o.) i R&D-u male tvrtke (Genera Istraživanja d.o.o.). Tijekom rada u Chirallica d.o.o. radila je na nizu projekata za farmaceutske tvrtke u Hrvatskoj i inozemstvu s zadatkom pripreme i karakterizacije organskih spojeva, razvoja i validacije analitičkih metoda te enantioseparacije kiralnih spojeva na preparativnom HPLC-u. Tijekom rada u Genera Istraživanja radila je na EU FP7 projektu OSTEOGROW koji je obuhvaćao razvoj, proizvodnju, predklinička i klinička istraživanja novog biokompatibilnog pripravka za zaraštanje kostiju. Njena zaduženja u sklopu projekta bila su razvoj HPLC metode za pročišćavanje proteina rhBMP6 te primjena analitičkih metoda u svrhu karakterizacije proteina i procesne kontrole. U veljači 2017. godine je, na Kemijsko-tehnološkom fakultetu, upisala poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Kemija mediteranskog okoliša. U prosincu 2019. godine održala je javnu obranu teme doktorskog rada pod naslovom „Sinteza 3,5-disupstituiranih hidantoina i fenilamino-derivata parazoantina A i F iz beta-laktama: enantioseparacija, apsolutna konfiguracija i biološka ispitivanja” iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstveno polje kemija, grana organska kemija. Autorica je i koautorica 8 znanstvenih radova u časopisima koje citira baza *Current Contents* i *Web of Science*. Do sada je sudjelovala na 3 domaća i 8 međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova.

Popis znanstvenih radova u časopisima koje kategorizira *Current Contents (CC)* i *Web of Science (WoS)*:

1. A. Dobrinčić, S. Pedisić, Z. Zorić, **M. Jurin**, M. Roje, R. Čož-Rakovac, V. Dragović-Uzelac, Microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction of sulfated polysaccharides from *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata*, *Food* **10** (2021) (prihvaćeno)
2. A-M. Cikoš, **M. Jurin**, R. Čož-Rakovac, D. Gašo-Sokač, S. Jokić, I. Jerković, Update on sesquiterpenes from red macroalgae of the *Laurencia* genus and their biological activities (2015–2020), *Algal research* **56** (2021) 102330-
3. **M. Jurin**, D. Kontrec, T. Dražić, M. Roje, Enantioseparation of ($\pm$)-*trans*- β -lactam Ureas by Supercritical Fluid Chromatography, *Croatica Chemica Acta* **93** (2021) 1-11.
4. A-M. Cikoš, **M. Jurin**, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, Update on Macroalgal Monoterpenes: Isolation, Analysis and Bioactivity; *Marine drugs* **17** (2019), 9; 537, 20
5. O. Politeo, M. Bektašević, I. Carev, Ivana; **M. Jurin**, M. Roje. Phytochemical Composition, Antioxidant Potential and Cholinesterase Inhibition Potential of Extracts from *Mentha pulegium* L.; *Chemistry & Biodiversity* **15** (2018) 1-9.
6. M. Bektašević, I. Carev, M. Roje, **M. Jurin**, O. Politeo, Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Extracts of *Satureja subspicata* Vis. Growing in Bosnia and Herzegovina; *Chemistry & Biodiversity* **14** (2017), e1700239, 9.
7. T. Dražić, K. Molčanov, Krešimir; **M. Jurin**, M. Roje, Synthesis of marine alkaloids leucettamines B and C by beta-lactam ring rearrangement; *Synthetic Communications* **47** (2017) 764-770.
8. T. Dražić, M. Roje, Marin; **M. Jurin**, G. Pescitelli, Synthesis, Separation and Absolute Configuration Determination by ECD Spectroscopy and TDDFT Calculations of 3-Amino-beta-lactams and Derived Guanidines, *European Journal of Organic Chemistry* **24** (2016) 4189-4199.

Popis sudjelovanja na domaćim znanstvenim i stručnim skupovima:

1. **M. Jurin**, D. Kontrec, M. Roje, Sinteza ($\pm$)-*trans*-3-amino- β -laktama i njegova enantioseparacija na novoj polisaharidnoj kiralnoj stacionarnoj fazi HPLC-om i SFC-om. 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, 9.-12. travnja 2019., Šibenik, Hrvatska (poster)

2. **M. Jurin**, T. Dražić, M. Roje, Synthesis of enantiopure 3,5-disubstituted hydantoins via transformation of β -lactam ureas, *25th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers*, 19.-22. travnja 2017., Poreč, Hrvatska (poster)
3. **M. Jurin**, N. Burić, Nataša; D. Kontrec, Utjecaj dodataka na sposobnost kiralnog prepoznavanja kiralnih nepokretnih faza temeljenih na *tris*-fenil karbamatu i *tris*-fenil benzoatu celuloze. *XXII. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera*, 13.-16. veljače 2011., Zagreb, Hrvatska (poster)

Popis sudjelovanja na međunarodnim znanstvenim skupovima:

1. **M. Jurin**, V. Stepanić, Višnja, M. Roje, Synthesis, chiral separation and biology activity of ($\pm$)-*trans*- β -lactam ureas, *JMMC 2019 – 11th Joint Meeting on Medicinal Chemistry*, 27.-29. lipnja 2019., Prag, Austrija (poster)
2. R. Čož-Rakovac, N. Topić Popović, I. Strunjak-Perović, K. Bojanić, D. Vadjla, **M. Jurin**, M. Roje, Antimicrobial and embryotoxic activity of brown algae *Padina Pavonica*, Latin American & Caribbean Aquaculture, LAQUA19, 19.-22. studenog 2019., San José, Costa Rica (poster)
3. E. Šarić, G. Quinn, M. Šemanjski, T. Paradžik, **M. Jurin**, I. Hunter, P. Herron, B. Maček, D. Vujaklija, Mass spectrometry approach for analysing protein phosphorylation in antibiotic producing bacteria, *Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of life*, 18.-20. ožujka 2019., Zagreb, Hrvatska (poster)
4. E. Šarić, G. Quinn, M. Šemanjski, T. Paradžik, **M. Jurin**, I. Hunter, P. Herron, B. Maček, D. Vujaklija, Dušica, Dynamics of protein phosphorylation in *S. rimosus* - oxytetracycline producer strains, John Innes/Rudjer Bošković Summer School on “Microbial Diversity and Specialised Metabolites”, 8.-16. rujna 2018., Dubrovnik, Hrvatska (poster)
5. E. Šarić, G. Quinn, M. Šemanjski, T. Paradžik, **M. Jurin**, I. Hunter, P. Herron, B. Maček, D. Vujaklija, Growth and phosphorylation profiles in *S. rimosus*, oxytetracycline producer strains, *1st European School on Practical Proteomics*, 8.-12. listopada 2017., Split, Hrvatska (poster)
6. T. Paradžik, E. Šarić, G. Quinn, M. Roje, **M. Jurin**, I. Hunter, P. Herron, D. Vujaklija, Comparative analysis of growth, development and OTC production of various *S. rimosus* producers. *7th Congress of European Microbiologists*, 9.-13. srpnja 2017., Valencija, Španjolska (poster)

7. E. Šarić, G. Quinn, Gerre; M. Šemanjski, T. Paradžik, **M. Jurin**, M. Roje, P. Herron, I. Hunter, B. Maček, D. Vujaklija, Analysing the switch to oxytetracycline production through phosphoproteomics in *Streptomyces rimosus*, *ESIB 2017 - European Summit of Industrial Biotechnology*, 14.-16. studenog 2017., Graz, Austrija (poster)
8. M. Bektašević, I. Carev, M. Roje, **M. Jurin**, O. Politeo, Phytochemical composition and biological activity of the extracts of *Satureja subspicata* Vis. growing in Bosnia and Herzegovina, *10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry*, 25.-28. lipnja 2017., Dubrovnik, Hrvatska (poster)