Izolacija i strukturna karakterizacija procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom sustava LC-SPE/NMR

Harča, Miroslava

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:707681

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Miroslava Harča

IZOLACIJA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA PROCESNIH ONEČIŠĆENJA 3-BROM-5-(TRIFLUORMETIL)ANILINA PRIMJENOM SUSTAVA LC-SPE/NMR

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Miroslava Harča

ISOLATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PROCESS IMPURITIES OF 3-BROMO-5-(TRIFLUOROMETHYL)ANILINE USING LC-SPE/NMR

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Miroslava Harča

IZOLACIJA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA PROCESNIH ONEČIŠĆENJA 3-BROM-5-(TRIFLUORMETIL)ANILINA PRIMJENOM SUSTAVA LC-SPE/NMR

DOKTORSKI RAD

Mentor:
doc. dr. sc. Ivana Biljan

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Miroslava Harča

ISOLATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PROCESS IMPURITIES OF 3-BROMO-5-(TRIFLUOROMETHYL)ANILINE USING LC-SPE/NMR

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor

Zagreb, 2018

Ova doktorska disertacija izrađena je u sklopu projekta Met4Pharm.

Najljepše se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Biljan na pruženom povjerenju, uloženom vremenu i trudu te savjetima tijekom izrade i pisanja disertacije. Bez njene podrške, razumijevanja i sjajnog vodstva ove zahvale ne bi ni bilo.

Hvala Ivi Habinovec, mag. chem. na prijateljskom pristupu, korisnim savjetima i neprocjenjivoj logističkoj potpori.

Veliko hvala mom timu na razumijevanju i strpljenju.

Zahvaljujem se svim dragim kolegama iz PLIVE na prenesenom znanju i savjetima.

Hvala svim mojim prijateljima na podršci, osobito Ivani Đikić, Jeleni Rakić, Martini Ljaljić, Marku Dimjaševiću, Marku Matosoviću i Marku Šoštariću.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima, Jasenki i Valentu, na potpori i bezgraničnoj ljubavi, na svim malim i velikim ustupcima i znakovima pažnje.

Hvala seki Valentini, ona je moj najveći oslonac.

Najveće hvala Ivanu koji je sa mnom prošao baš svaku fazu ovog studija, svaku krizu i svaki uspjeh. Hvala za godine podrške, ljubavi i razumijevanja.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **VIII**
ABSTRACT ..... **IX**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**
2.1. Djelatne tvari **4**
2.1.1. Polazni materijali u sintezi djelatnih tvari *5*
2.1.2. Uloga fluora u djelatnim tvarima *7*
2.2. Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima **12**
2.3. Separacija, izolacija i strukturna karakterizacija onečišćenja **14**
2.3.1. Tekućinska kromatografija *15*
2.3.2. Izolacijske tehnike *20*
2.3.2.1. Semi-preparativna tekućinska kromatografija *20*
2.3.2.2. Tehnika SPE *21*
2.3.3. Strukturna karakterizacija *24*
2.3.3.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) *24*
2.3.3.1.1. Jednodimenzijske tehnike NMR *27*
2.3.3.1.1.1. Tehnika ^{1}H NMR *28*
2.3.3.1.2. Dvodimenzijske tehnike NMR *29*
2.3.3.1.2.1. Tehnika COSY *30*
2.3.3.1.2.2. Tehnika HMQC *31*
2.3.3.1.2.3. Tehnika HSQC *32*
2.3.3.1.2.4. Tehnika HMBC *33*
2.3.3.1.3. Krio-tehnologija *34*
2.3.3.2. Spektrometrija masa (MS) *35*
2.3.4. Vezani sustav LC-NMR *39*
2.3.4.1. Vezani sustav LC-SPE-NMR *41*
2.3.5. Predviđanje strukture računalnim metodama *45*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **47**
3.1. Tehnika UHPLC **47**
3.2. Tehnika semi-preparativne tekućinske kromatografije **48**
3.3. Tehnika LC-SPE **49**
3.3.1. Optimizacija parametara sustava SPE *50*

3.4. Spektroskopija NMR 51
3.4.1. Tehnika supresije signala otapala 52
3.5. Tehnika MS 53
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 56
4.1. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom UHPLC 56
4.2. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom semi-preparativne tekućinske kromatografije i spektroskopije NMR 58
4.3. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom LC-SPE/NMR 59
4.3.1. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom sustava LC-SPE 59
4.3.2. Optimizacija sustava SPE 60
4.3.3. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom spektroskopije NMR 62
4.4. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom MS 62
4.5. Identifikacija i strukturna karakterizacija onečišćenja u uzorcima 3-brom-5-(trifluormetil)anilina 62
*4.5.1. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **1** 62*
*4.5.2. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **2** 65*
*4.5.3. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **3** 67*
*4.5.4. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **4** 70*
*4.5.5. Identifikacija i strukturna karakterizacija spojeva **5** i **6** 72*
*4.5.6. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **7** 76*
*4.5.7. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **8** 79*
*4.5.8. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **9** 81*
*4.5.9. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **10** 84*
4.6. Usporedba semi-preparativne tekućinske kromatografije i tehnike LC-SPE: prednosti vezanog sustava LC-SPE/krio-NMR 87
§ 5. ZAKLJUČAK 92
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 95
6.1. Popis oznakâ izoliranih spojeva 95
6.2. Popis kraticâ 95
§ 7. LITERATURNI IZVORI 99
§ 8. DODATAK X
§ 9. ŽIVOTOPIS XLIV

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

IZOLACIJA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA PROCESNIH ONEČIŠĆENJA 3-BROM-5-(TRIFLUORMETIL)ANILINA PRIMJENOM SUSTAVA LC-SPE/NMR

Miroslava Harča
PLIVA HRVATSKA d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb

U sklopu ove disertacije provedena je izolacija i strukturna karakterizacija nepoznatih procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, polaznog materijala u sintezi djelatnih tvari. Sustav tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) primijenjen je za prvotne analize istraživanih uzoraka te detekciju i određivanje količina pojedinih onečišćenja. Tehnika semi-preparativne tekućinske kromatografije korištena je kako bi se na stvarnom primjeru istražila primjenjivost tradicionalnog pristupa izolaciji i identifikaciji niskih razina onečišćenja, a izolirani spojevi su analizirani uz pomoć spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i tehnike spektrometrije masa (MS). Veći dio istraživanja proveden je vezanim sustavom tekućinske kromatografije, ekstrakcije na čvrstoj fazi i spektroskopije NMR s krio-sondom (LC-SPE/NMR) koji je korišten za odjeljivanje, izolaciju, pohranu i ukoncentriravanje više od 15 analita na SPE nosačima te strukturnu karakterizaciju deset uspješno izoliranih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina. Na temelju analize jednodimenzijskih ^{1}H i ^{19}F te dvodimenzijskih homo- i heteronuklearnih spektara NMR (COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC i ^{1}H-^{13}C HMBC) te evaluacije rezultata MS predložene su strukture izoliranih onečišćenja.

(105 stranica, 112 slika, 39 tablica, 125 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: 3-brom-5-(trifluormetil)anilin/ djelatne tvari/ LC-SPE/ procesna onečišćenja/ spektrometrija masa/ spektroskopija NMR/ UHPLC

Mentor:	doc. dr. sc. Ivana Biljan
Rad prihvaćen:	29. lipnja 2018.
Ocjenitelji :	prof. dr. sc. Predrag Novak, PMF
	doc. dr. sc. Ivana Biljan, PMF
	dr. sc. Mario Cindrić, v. zn. sur., IRB

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ISOLATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PROCESS IMPURITIES OF 3-BROMO-5-(TRIFLUOROMETHYL)ANILINE USING LC-SPE/NMR

Miroslava Harča
PLIVA Croatia Ltd., Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb

Within this thesis, an isolation and structural characterization of the process impurities of 3-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline, a starting material in the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs), was performed. Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) was used for initial analysis of the investigated samples in order to detect and quantify individual impurities. Semi-preparative liquid chromatography was employed to evaluate the applicability of the traditional approach to isolation and identification of low level impurities, and the isolated compounds were analysed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). Most of the research was carried out by hyphenated system comprising liquid chromatography, solid phase extraction and NMR spectroscopy with cryoprobe (LC-SPE/NMR) used for separation, isolation, trapping and structural characterization. More than 15 analytes were separated and isolated, and structural characterization was performed on ten successfully isolated 3-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline impurities. Based on the analysis of one-dimensional ^{1}H and ^{19}F and two-dimensional homo- and heteronuclear NMR spectra (COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC and ^{1}H-^{13}C HMBC) and evaluation of MS results the structures of isolated impurities were proposed.

(105 pages, 112 figures, 39 tables, 125 references, original in Croatian)

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

Keywords: 3-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline/ active pharmaceutical ingredients/ LC-SPE/ process impurities/ mass spectrometry/ NMR spectroscopy/ UHPLC

Supervisor:	Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor
Thesis accepted:	June 29th 2018
Reviewers:	Dr. Predrag Novak, Professor, PMF
	Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor, PMF
	Dr. Mario Cindrić, Senior Research Associate, IRB

§ 1. UVOD

Djelatna tvar ili aktivni farmaceutski sastojak (engl. *API – Active Pharmaceutical Ingredient*) je tvar ili smjesa tvari koja je zbog svog farmakološkog, imunološkog ili metaboličkog djelovanja namijenjena proizvodnji lijeka.[1] Fizikalno-kemijska i biološka svojstva djelatne tvari utječu na učinkovitost farmaceutskog proizvoda i potrebno ih je rutinski kontrolirati u lijeku,[2,3] a na kvalitetu polazne djelatne tvari pak utječe kvaliteta njenih polaznih materijala.

Odabir polaznih materijala za proizvodnju djelatne tvari uključuje razmatranje različitih sintetskih puteva te moguć utjecaj onečišćenja sirovina na proizvodni proces i samu aktivnu tvar. Polazni materijal mora imati jasno definirana kemijska svojstva budući da kao značajan strukturni fragment čini molekulsku strukturu djelatne tvari. Iz tog razloga regulatorne agencije posebnu pozornost posvećuju evaluaciji polaznih materijala i zahtijevaju detaljan opis proizvodnog procesa na koji se proizvođači djelatnih tvari pozivaju.[4,5]

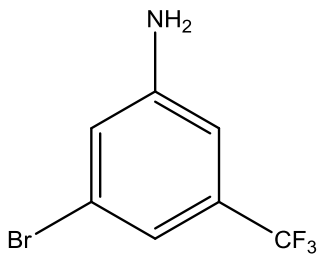
Kvalitetu kemijskog spoja, pa tako i polaznog materijala za proizvodnju djelatne tvari, definiraju onečišćenja. Nedvosmisleno određivanje strukture onečišćenja obavezan je dio razvoja farmaceutskog proizvoda. Identifikacija onečišćenja omogućava razumijevanje podrijetla onečišćenja i bolju kontrolu istih, a kod potencijalno genotoksičnih onečišćenja, omogućava provođenje valjanih toksikoloških i kliničkih istraživanja. Identifikacija sve nižih razina onečišćenja je imperativ razvoja farmaceutskih proizvoda, a upravo je kontekst razine onečišćenja neizostavna komponenta razvoja analitičke procedure.

Konvencionalan pristup određivanju strukture nepoznatog onečišćenja čine odjeljivanje onečišćenja i glavne komponente, izolacija i potom višestruke spektroskopske i spektrometrijske analize izoliranog spoja. Rijetko ili nikada će tek jedna identifikacijska tehnika dati potpunu i neupitnu informaciju o broju i vrsti atoma neke molekule, njihovim međusobnim odnosima i orijentaciji u prostoru.

Suvremen pristup identifikaciji onečišćenja temelji se na primjeni vezanih sustava, najčešće sprezi kromatografskih i spektroskopskih, odnosno spektrometrijskih sustava, a sve češće koristi se vezani sustav tekućinske kromatografije, ekstrakcije na čvrstoj fazi i spektroskopije NMR (engl. *LC-SPE-NMR – Liquid chromatography – Solid Phase Extraction – Nuclear Magnetic Resonance*). Tehnika LC-SPE-NMR uklonila je nužnost upotrebe skupih deuteriranih pokretnih faza prilikom kromatografskog razdvajanja i omogućila potpunu

identifikaciju i strukturnu karakterizaciju vrlo niskih razina onečišćenja u uzorcima ograničene količine. Upravo je dostupnost uzorka ograničavajući faktor primjene drugih izolacijskih tehnika. Primjenom sustava LC-SPE moguće je provesti višestruka injektiranja i izolirana onečišćenja ukoncentrirati na nosaču SPE. Pokretna faza, neprikladna za analizu NMR, uklanja se sušenjem SPE nosača, a izolirani spojevi se eluiraju vrlo malim količinama deuteriranog otapala.[6–8] Takve otopine se osim spektroskopijom NMR mogu analizirati i drugim tehnikama, primjerice spektrometrijom masa (engl. *MS – Mass Spectrometry*), ili se otapalo može upariti i čisti spojevi (sa)čuvati. Mogućnost očuvanja analiziranog uzorka nije česta među analitičkim tehnikama i zbog toga predstavlja veliku prednost spektroskopije NMR, odnosno vezanog sustava LC-SPE-NMR. Dodatno, razvojem elektronike, supravodljivih magneta i krio-tehnologije, te primjenom novih metoda supresije signala otapala, spektroskopija NMR postala je osjetljivija i sveukupno primjenjivija.[9] Kod izravne sprege spektrometrije masa i navedenih tehnika u vezani sustav LC-SPE-NMR-MS spektrometar masa služi kao dodatan poslijekolonski detektor u koji se uvodi manji dio pokretne faze nakon kromatografskog odjeljivanja, a omogućava snimanje spektara MS i brzu evaluaciju čistoće frakcija.[10] Nema sumnje da budućnost identifikacije i strukturne karakterizacije nepoznatih spojeva leži u primjeni vezanih sustava i dobivanju potpunih informacija u kratkom vremenu.[9]

Cilj ovog istraživanja bio je identificirati onečišćenja prisutna u uzorcima čistog spoja (uzorci **I** i **II**) te uzorku uparenog matičnog luga (uzorak **III**) 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (slika 1), spoja koji se koristi kao polazni materijal za sintezu djelatnih tvari. Budući da 3-brom-5-(trifluormetil)anilin sadrži funkcijsku skupinu CF_3, predstavlja nezaobilazan strukturni fragment za uvođenje fluora u molekulsku strukturu djelatne tvari. Atomi fluora imaju sposobnost promjene fizikalno-kemijskih svojstva molekule i zato je fluor čest element dizajna lijekova.[11–13]



Slika 1. Struktura spoja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.

U okviru ovog doktorskog rada za identifikaciju nepoznatih procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primijenjene su tehnike tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (engl. *UHPLC – Ultra-High Performance Liquid Chromatography*), potom semi-preparativne tekućinske kromatografije uz primjenu spektroskopije NMR i masene spektrometrije te vezani sustav LC-SPE/NMR s krio-sondom. Sustav UHPLC je korišten za inicijalne analize istraživanih uzoraka te detekciju i određivanje količina pojedinih onečišćenja prisutnih u uzorcima. Tehnika semi-preparativne tekućinske kromatografije korištena je kako bi se na stvarnom primjeru pokazala primjenjivost takvog pristupa s obzirom na količinu onečišćenja u dostupnim uzorcima, utrošak otapala za kromatografiju, vrijeme trajanja kromatografske analize i izolacije te ukupni trošak eksperimenta. Nakon uparavanja organskog otapala, izolirana onečišćenja su analizirana uz pomoć spektroskopije NMR i tehnike MS. Veći dio istraživanja proveden je vezanim sustavom LC-SPE/NMR koji je korišten za odjeljivanje, izolaciju, pohranu i ukoncentriravanje pojedinih analita na SPE nosačima te strukturnu karakterizaciju uspješno izoliranih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina analizom 1D i 2D spektara NMR. Predložene strukture onečišćenja dodatno su evaluirane rezultatima MS analize.

Istraživanje je uključivalo različite tehnike kako bi se usporedio konvencionalni i suvremeni pristup izolaciji i identifikaciji vrlo niskih razina onečišćenja (0,09% – 1,33%), a u svrhu razvoja bržih i učinkovitijih metoda za određivanje struktura onečišćenja polaznih materijala u farmaceutskoj industriji te onečišćenja aktivnih farmaceutskih sastojaka.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Djelatne tvari

Prema hrvatskom Zakonu o lijekovima *djelatna tvar* je tvar ili smjesa tvari namijenjena proizvodnji lijeka, a koja djelatnim sastojkom lijeka postaje svojim farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija ili postavljanja medicinske dijagnoze.[1] Naziva se i aktivnim farmaceutskim sastojkom, a farmaceutski proizvod može sadržavati više od jedne djelatne tvari. Nužno je uočiti, evaluirati i kontrolirati fizikalno-kemijska i biološka svojstva djelatne tvari koja utječu na učinkovitost lijeka, kao što su topljivost, veličina čestica, polimorfna forma, količina vode, biološka aktivnost te permeabilnost. Ti parametri mogu imati i sinergijsko djelovanje pa ih se razmatra kao međuovisne i rutinski kontrolira u farmaceutskom proizvodu.[2,3]

Razvoju procesa proizvodnje djelatnih tvari može se pristupiti tradicionalno ili primjenom suvremenih principa, te ovisno je li farmaceutska tvar sintetska, semisintetska ili biološka. Kod tradicionalnog pristupa se parametri procesa definiraju unaprijed, a reproducibilnost procesa testira ponavljajućim eksperimentima, dok se noviji način zasniva na konceptu dizajnom osigurane kvalitete (engl. *QbD – Quality by Design*), upravljanju rizicima i sveobuhvatnim znanstvenim pristupom.[4]

Kako bi se osigurala kakvoća, odnosno prikladnost djelatne tvari ili gotovog proizvoda za odgovarajuću namjenu, svaka djelatna tvar ugrađena u lijek se prije uporabe analizira prema unaprijed definiranoj specifikaciji. Specifikacija je skup karakterističnih analitičkih parametara koje valja testirati i dobivene rezultate evaluirati u odnosu na znanstveno opravdane kvalitativne ili kvantitativne kriterije prihvatljivosti. Kriteriji prihvatljivosti su rezultat razvojnih podataka, farmakopejskih standarada, rezultata toksikoloških i kliničkih studija i/ili saznanja o stabilnosti djelatne tvari. Ne postoji univerzalna specifikacija aktivnih farmaceutskih sastojaka, ali neki od neizostavnih parametara su izgled, identifikacija (najčešće bar dvjema neovisnim analitičkim tehnikama), sadržaj mjeren u odnosu na certificirani primarni ili sekundarni standard, količina organskih i anorganskih onečišćenja, sadržaj vode te udio ostatnih otapala.[2]

2.1.1. Polazni materijali u sintezi djelatnih tvari

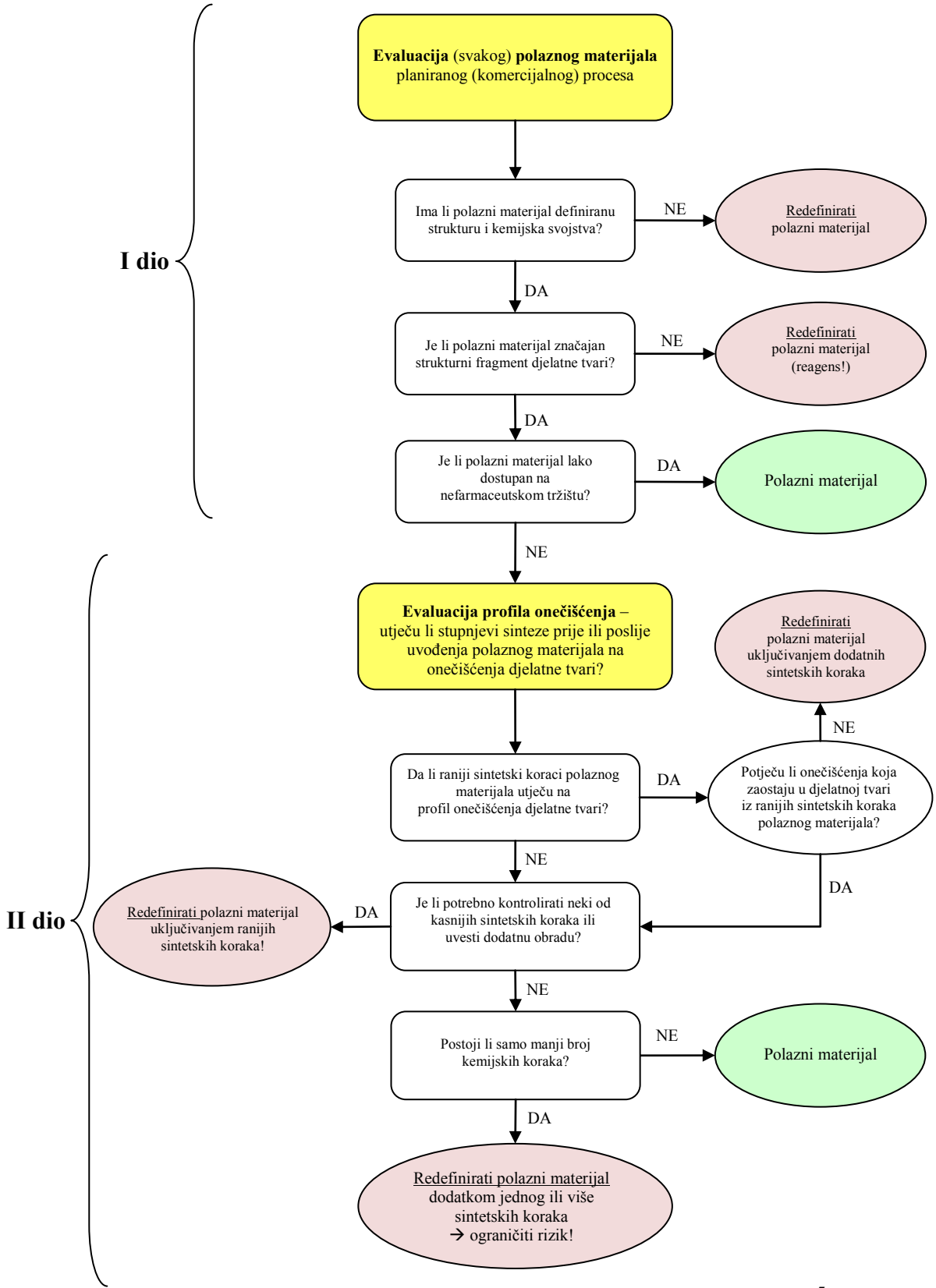
Odabir polaznog materijala za proizvodnju semisintetske ili sintetske djelatne tvari rezultat je kompleksne evaluacije koja uključuje razmatranje različitih sintetskih puteva te moguć utjecaj onečišćenja sirovine na proces i krajnji produkt – aktivnu tvar. Kod razvoja generičkih lijekova i pripadajućih aktivnih farmaceutskih sastojaka u računicu ulazi i patentna situacija, odnosno nužnost provjere nisu li pojedini sintetski korak, reagens ili sama molekula patentno zaštićeni.

Polazni materijal se kao značajan strukturni fragment ugrađuje u molekulsku strukturu djelatne tvari i zato je nužno da ima jasno definirana kemijska svojstva. Proizlazi da polazni materijal nikako ne može biti neizolirani intermedijar u reakcijskoj smjesi, otapalo ili kemikalija korištena tijekom procesa.

Znatan utjecaj na odabir reaktanata i postupak sinteze aktivne tvari imaju upravo onečišćenja – potencijalna onečišćenja polaznog materijala te ona nastala tijekom procesa. Onečišćenja nastala u ranijim sintetskim koracima često imaju veću mogućnost uklanjanja tijekom kristalizacije intermedijara ili postupcima obrade, te manju vjerojatnost prenošenja kroz proces, odnosno posljedično detekcije u samoj djelatnoj tvari. Otuda proizlazi potreba za što većim brojem stupnjeva sinteze.[4]

Recentne ICH Q11 smjernice (23. 8. 2017.) pružaju detaljan opis postupka procjene je li neka molekula zadovoljavajući odabir polaznog materijala u sintezi djelatne tvari (slika 2).[5] Nažalost, to nisu jednoznačna pravila i njihovo tumačenje se razlikuje od slučaja do slučaja. Vrlo vjerojatno će njihova primjena rezultirati odabirom sve složenijih sintetskih puteva s većim brojem koraka, a sve u svrhu anuliranja potencijalnog utjecaja polaznog materijala na kakvoću djelatne tvari, odnosno lijeka.

Regulatorne agencije posebnu pozornost posvećuju evaluaciji polaznih materijala i zahtijevaju detaljan opis proizvodnog procesa na koji se proizvođači djelatnih tvari pozivaju. Najkonkurentniji (i najbrojniji) proizvođači i dobavljači sirovina dolaze s azijskog kontinenta i farmaceutske kompanije ulažu znatne napore u njihovu evaluaciju budući da upravo oni velikim dijelom kreiraju kakvoću finalnog farmaceutskog proizvoda.

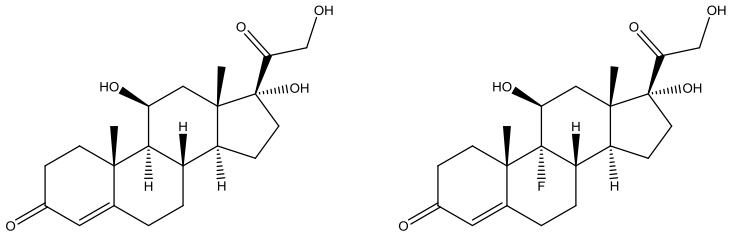


Slika 2. Shematski prikaz ICH smjernica za (uspješan) odabir polaznog materijala.[5]

2.1.2. Uloga fluora u djelatnim tvarima

Djelatne tvari su većinom male organske molekule koje, uz atome ugljika i vodika, sadrže i heteroatome kisika, dušika, sumpora te halogenih elemenata, fluora, broma i klora. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća na američkom tržištu bilo je oko 2% lijekova čija je djelatna tvar sadržavala fluor,[12] 2010. godine taj udio je procijenjen na oko 20%,[14] a recentni trendovi pokazuju da je svaka treća novoodobrena djelatna tvar (isključujući biofarmaceutske pripravke) „fluorirana".[13]

Najranija primjena fluora u farmaceutskoj industriji bila je kroz anestetike i steroide. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *FDA – Food and Drug Administration*) je 1955. godine odobrila fludrokortizon, prvi lijek na američkom tržištu čija je djelatna tvar sadržavala atom fluora.[13] Otkrili su ga Fried i Sabo proučavanjem 9*α*-halogeniranih derivata kortizola (kortikosteroid iz skupine glukokortikoida) (slika 3a).[15] Dobiveni fludrokortizon (slika 3b) pokazao je deseterostruko veću glukokortikoidnu aktivnost od polaznog hidrokortizona.[16]



a b

Slika 3. Struktura hidrokortizona (a) i fludrokortizona (b).

Atomi fluora mogu dramatično promijeniti fizikalno-kemijska svojstva molekule i stoga je fluor postao neizostavan element u dizajnu lijekova.[11] U protokole kojima se istraživači vode prilikom probira stotina novih molekula uveden je tzv. probir po fluoru (engl. *fluorine scan*) koji podrazumijeva supstituciju vodikovih atoma ili hidroksilne skupine atomom fluora ili funkcijskom skupinom koja sadrži fluor (CF, CF_2, CF_3, OCF_3, SCF_3) i evaluaciju biološke aktivnosti nove molekule.[12,13] Supstitucija vodika ili hidroksilne skupine atomom fluora zahtijeva manju steričku prilagodbu receptorskog mjesta, budući da je van der Waalsov radijus fluora (1.47 Å) veličinom između radijusa kisika (1.57 Å) i vodika (1.20 Å).[17] Supstitucija CF_3 skupinom ima veći sterički utjecaj jer se procjenjuje da je njen van der Waalsov volumen sličniji etilnoj skupini.[18]

Uloga fluora nije uvjetovana indikacijom lijeka, što potvrđuje i pregled djelatnih tvari koje sadrže fluor, a koje su u periodu od 2001. do 2016. godine odobrene od strane FDA ili se nalaze u fazi kliničkih istraživanja (Tablica 1).

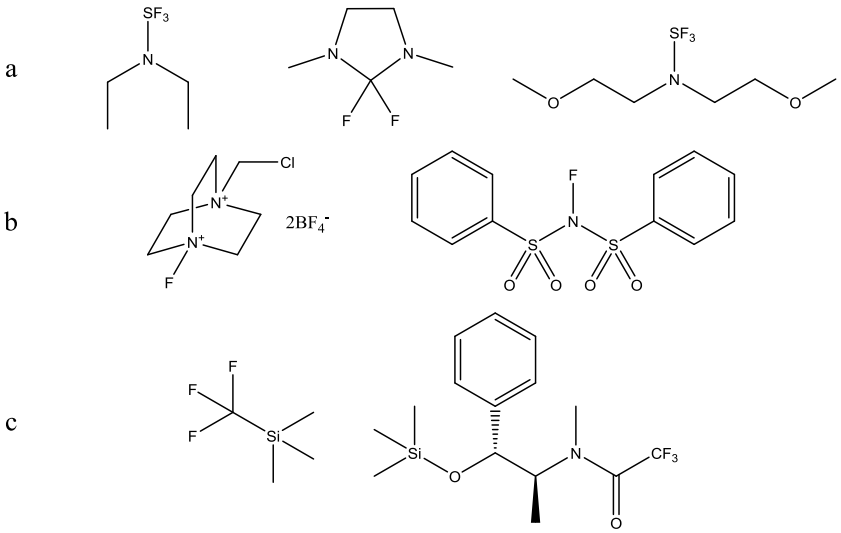
Tablica 1. Podjela djelatnih tvari koje sadrže fluor s obzirom na indikaciju i funkcijsku skupinu unutar koje se fluor nalazi.[12,13]

	Terapijska indikacija / Sustav na koji lijek djeluje					
Skupina	Onkološki lijekovi / imunomodulatori	Živčani sustav	Srce i krvožilni sustav	Sustavne infekcije	Sustav žlijezda s unutarnjim izlučivanjem	Ostalo
CF	afatinib brivanib alaninat cediranib crizotinib dakomitinib gefitinib idelalisib kabozantinib kapecitabin lapatinib olaparib setipiprant sunitinib trametinib vandetanib vemurafenib	blonanserin edivoksetin escitalopram retigabin iloperidon ioflupan paliperidon	pitavastatin prasugrel rosuvastatin vorapaksar	elvitegravir emtricitabin klevudin raltegravir sofosbuvir solitromicin tedizolid fosfat zabofloksacin	kanagliflozin ipragliflozin trelagliptin	besifloksacin (osjetila) riocigvat (dišni organi) ripasudil (osjetila) vonoprazan (probavni) ulimorelin (probavni)
2 x CF		rufinamid	ezetimib nebivolol tikagrelor	dolutegravir izavukonazol ledipasvir maravirok posakonazol	omarigliptin	difluprednat (osjetila) lubiproston (probavni) roflumilast (dišni organi) tafluprost (osjetila)
3 x CF	cobimetinib dabrafenib			vorikonazol		

	Terapijska indikacija / Sustav na koji lijek djeluje					
Skupina	Onkološki lijekovi / imunomodulatori	Živčani sustav	Srce i krvožilni sustav	Sustavne infekcije	Sustav žlijezda s unutarnjim izlučivanjem	Ostalo
CF_3	buparlisib enobosarm nilotinib pradigastat ponatinib radotinib siponimod sorafenib taskvinimod telotristat			delamanid tipranavir	cinakalcet teriflunomid	dutasterid (mokraćni) nitisinon (nutrijencija) silodozin (mokraćni) travoprost (osjetila)
2 x CF_3		netupitant rolapitant	evacetrapib			
CF, CF_3	enzalutamid fulvestrant regorafenib	aprepitant bitopertin	anacetrapib darapladib		sitagliptin	elagoliks (mokraćni) odanakatib (koštano-mišićni)

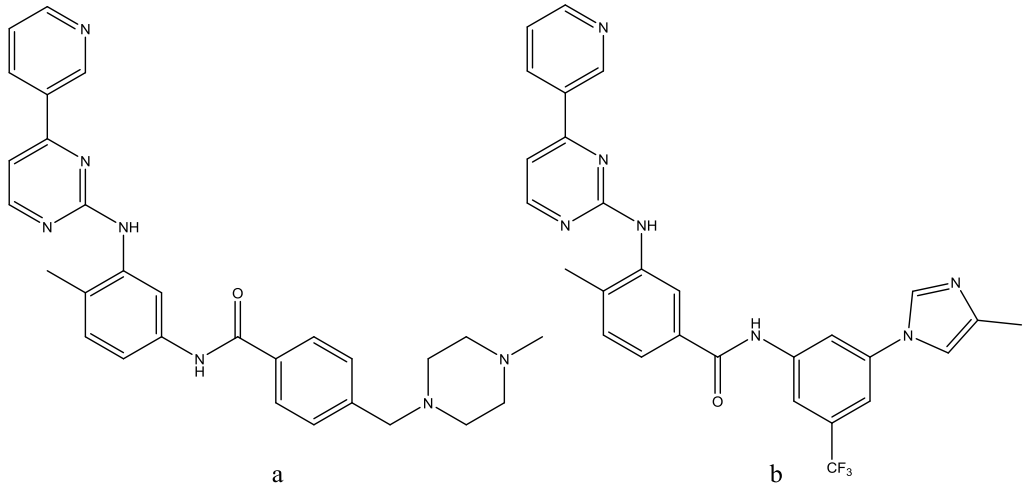
Uvođenje atoma fluora u molekulu može povećati stabilnost metaboličkih produkata, poboljšati bioraspoloživost te efikasnost protein-ligand interakcija. Uzrok takvom opsežnom djelovanju treba tražiti u samim karakteristikama fluora: visokoj elektronegativnosti, relativno maloj veličini atoma, niskoj polarizabilnosti, čvrsto vezanim elektronima i izvrsnom preklapanju 2s i 2p orbitala s odgovarajućim orbitalama drugih elemenata iste periode.[19,20] Sve navedeno kod fluoriranih molekula može dovesti do perturbacije pK_a vrijednosti, modifikacije lipofilnosti, konformacijskih promjena, potencijalno do stvaranja vodikovih veza te elektrostatskih interakcija.[17] Fluor kao najelektronegativniji element (Paulingov koeficijent elektronegativnosti 3,98) ima snažan utjecaj na kiselost, odnosno bazičnost susjednih funkcijskih skupina što utječe na apsorpciju djelatne tvari te može rezultirati boljom bioraspoloživošću lijeka.[21,17] Valja naglasiti da se fluoriranjem molekule neće nužno povećati njena lipofilnost. Naime, supstitucija vodika fluorom kod zasićenih alkilnih skupina smanjuje lipofilnost molekule, za razliku od fluoriranja aromatskih spojeva.[19]

Kemija fluora je složena pa se nerijetko pribjegava ugrađivanju fluora u molekulu, potencijalnu djelatnu tvar, kroz neki polazni materijal koji već sadrži fluor.[22] Sredinom prošlog stoljeća sintetski putovi fluoriranja uključivali su korištenje elementarnog fluora ili reaktivne fluorovodične kiseline, sve dok se sedamdesetih godina nisu počeli koristiti sigurni i selektivni reagensi poput *N*,*N*-dietilaminosumporovog trifluorida (akr. DAST) i drugih (slika 4), a to je dovelo do eksplozije fluoriranih farmaceutika na tržištu u osamdesetima.[18]



Slika 4. Primjeri selektivnih fluorirajućih reagensa – nukleofilni (a), elektrofilni (b) i reagensi za uvođenje CF_3 skupine (c).

Jedan od primjera dizajna djelatne tvari uvođenjem fluora je nilotinib, djelatna tvar razvijena kao druga generacija inhibitora protein-tirozin kinaze za pacijente s kroničnom mijeloičnom leukemijom koji teško podnose imatinib (slika 5). Modifikacijom metilpiperazinske skupine, obrtanjem amidne veze te dodatkom trifluormetilne skupine na fenilni prsten nastala je molekula biološki aktivnija od imatiniba oko 30 puta.[12]



Slika 5. Struktura imatiniba (a) i nilotiniba (b).

Potrebno je naglasiti i potencijalno negativne aspekte proizvodnje i široke uporabe lijekova koji sadrže fluor. Sveukupni utjecaj povećanih količina fluora u ekosustavu, kroz tjelesne izlučevine i tkiva uslijed korištenja lijekova koji sadrže fluor, još uvijek nije toksikološki evaluiran.[23] Mada je fluor trinaesti najzastupljeniji element u zemljinoj kori, većina se nalazi u obliku netopljivih minerala, fluorita CaF_2 i kriolita Na_3AlF_6, a organski spojevi koji sadrže fluor nisu prirodno zastupljeni.

Zanimljiv je fenomen auto-disproporcioniranja enantiomera (engl. *SDE – Self-Disproportionation of Enantiomers*) koji opisuje nekolicina autora. SDE pokazuju molekule u kojima je trifluormetilna skupina vezana na kiralni atom ugljika, a primjer je spontano enantiomerno obogaćivanje na akiralnoj kromatografskoj nepokretnoj fazi (silikagel). Ukoliko u uzorku postoje racemična i djelomično čista enantiomerna komponenta, tijekom analize je moguće uočiti povećanje udjela racemične komponente, ali i enantiomerne čistoće druge komponente smjese. Opisani efekt može dovesti do lažne analitičke evaluacije enantiomerne čistoće uzorka, no može se i iskoristiti kao nekonvencionalan način enantiomernog pročišćavanja.[24]

2.2. Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima

Onečišćenja definiraju kvalitetu kemijskog spoja. Nedvosmisleno određivanje strukture onečišćenja postalo je obavezan dio razvoja farmaceutskog proizvoda. Identifikacija onečišćenja omogućava razumijevanje podrijetla onečišćenja i bolju kontrolu istih, a kod potencijalno genotoksičnih onečišćenja, omogućava provođenje valjanih toksikoloških i kliničkih istraživanja. Identifikacija sve nižih razina onečišćenja sve je češće imperativ, a ne opcija razvoja farmaceutskih proizvoda. Upravo je kontekst razine onečišćenja neizostavna komponenta razvoja analitičke procedure. Niti jedan spoj neće biti potpuno čist ako ga se evaluira dovoljno osjetljivim tehnikama. Iz perspektive farmaceutske industrije je moguće, ali nije ekonomski održivo, složenim, multisintetskim procesima proizvoditi bilo djelatne tvari, bilo lijekove bez ijednog detektiranog/identificiranog/specificiranog onečišćenja.

ICH smjernice jasno klasificiraju onečišćenja na organska, anorganska i ostatna otapala. Anorganska onečišćenja su većinom poznata i mogu biti reagensi, ligandi, katalizatori, teški metali ili drugi metali prisutni u tragovima, anorganske soli ili tvari koje se koriste prilikom filtracije. Organska onečišćenja dijele se na procesna ili srodna aktivnoj tvari, ili pak ona koja potječu od polazne sirovine, nusprodukte, intermedijare, razgradne produkte te reagense, ligande i katalizatore. Razina onečišćenja može biti pojedinačno definirana, a onečišćenje identificirano ili neidentificirano, te okarakterizirano samo relativnim vremenom zadržavanja na kromatografskoj koloni u odnosu na glavnu komponentu.[25] Kod aktivnih tvari s maksimalnim dnevnim unosom manjim od 2 g, prema preporukama regulatornih i savjetodavnih agencija, razina nepoznatog onečišćenja ne smije biti viša od 0,10%, a razina poznatog, identificiranog i evaluiranog onečišćenja ne smije biti viša od 0,15%. Ako je dnevni unos aktivne tvari veći od 2 g, zahtjevi su stroži i dopuštene razine niže (tablica 2). Navedeni pristup je uvriježen za suhe oralne oblike farmaceutskih proizvoda te parenteralne proizvode, dok za kreme, masti i gelove nema jednoznačno definiranih vrijednosti.[3]

Tablica 2. ICH preporuke obzirom na razinu onečišćenja i dnevni unos djelatne tvari.[25,26]

Maksimalna dnevna doza djelatne tvari	Razina iznad koje je onečišćenje nužno		
	prijaviti	identificirati	ograničiti
≤ 2 g	0,05%	0,10% ili 1,0 mg/dan[a]	0,15% ili 1,0 mg/dan[a]
> 2 g	0,03%	0,05%	0,05%

[a] ovisno koji pristup daje nižu razinu

Identifikaciju onečišćenja nužno je provesti u fazi razvoja proizvoda, jer upravo poznavanje strukture i reakcijskog mehanizma nastanka onečišćenja omogućava bolje razumijevanje procesa i njegovu optimizaciju.[27]

Tijekom razvojnog procesa nerijetko valja razdvojiti složene smjese srodnih spojeva, često izomera (konstitucijskih izomera, steroizomera), u kompleksnoj matrici uzorka i zato je nužno razvijati selektivne kromatografske postupke.[27,28] Kontroli stereokemijske ili enantiomerne čistoće djelatne tvari se pridaje jednaka, ako ne i veća pozornost kao i akiralnim onečišćenjima.[30] Jedan od drastičnih primjera važnosti kontrole enantiomernih onečišćenja je tzv. "talidomidska katastrofa" ranih 60-ih godina prošlog stoljeća. Lijek talidomid, kojeg su brojne trudnice uzimale za smirenje i protiv jutarnjih mučnina, povezan je s povećanom učestalosti malformacija ploda. Talidomid je sintetiziran 1953. u njemačkoj farmaceutskoj tvrtki Grünenthal kao racemična smjesa, a tek je 1961. godine utvrđeno da (*S*)-izomer talidomida ima teratogeno djelovanje.[29]

Proizlazi da za genotoksična i potencijalno genotoksična onečišćenja valja primijeniti poseban pristup. Genotoksičnost je svaki štetni učinak kemikalije s posljedicom na genetski materijal.[31] Mueller i suradnici 2006. godine objavili su klasifikaciju onečišćenja u pet grupa obzirom na njihovu potencijalnu, odnosno dokazanu genotoksičnost.[32] Prema preporuci europskih i američkih regulatornih tijela, za genotoksična i potencijalno genotoksična onečišćenja dopuštena razina u djelatnoj tvari izražava se pomoću *TTC* veličine (engl. *Threshold of Toxicological Concern*).[33] *TTC* vrijednost dobivena je istraživanjem potencijalnog kancerogenog djelovanja više od 700 različitih genotoksičnih i negenotoksičnih spojeva na glodavce. Dokazano je da dnevna doza manja ili jednaka od 1,5 μg za većinu istraživanih genotoksičnih spojeva neće uzrokovati rak s vjerojatnošću većom od 1:100.000. Stoga je predloženo da se kao dozvoljena razina prihvati iznos onečišćenja manji ili jednak omjeru 1,5 μg i najveće dopuštene dnevne doze aktivne tvari (izražene u gramima).[34]

2.3. Separacija, izolacija i strukturna karakterizacija onečišćenja

Postupak nedvosmislenog određivanja strukture spoja složen je proces. Rijetko ili nikada će tek jedna identifikacijska tehnika dati potpunu i neupitnu informaciju o broju i vrsti atoma neke molekule, njihovim međusobnim odnosima i orijentaciji u prostoru. Najčešći, konvencionalan postupak određivanja nepoznate strukture onečišćenja čine odjeljivanje onečišćenja i glavne komponente, izolacija i potom višestruke spektroskopske i spektrometrijske analize izoliranog spoja. Glavni nedostaci takvog pristupa su nedovoljno selektivne kromatografske metode i dugotrajna izolacija s dodatnim poteškoćama u vidu niskih razina onečišćenja, složene matrice uzorka ili nestabilnosti onečišćenja s mogućnošću raspada tijekom obrade i izolacije. Ekonomska komponenta, s obzirom na protok pokretne faze do 50 mL/min kod semi-preparativnih tehnika i posljedično veliku potrošnju skupih otapala, također nije zanemariva.[35-37]

Kromatografsko odjeljivanje sastojaka smjese uobičajen je način utvrđivanja profila onečišćenja, praćenja sintetskih procesa, ali i dio procesa priprave onečišćenja. Za svaku od navedenih primjena bitno je učinkovito razdjeljenje na kromatografskoj koloni, čemu prethodi razvoj kromatografske metode što podrazumijeva odabir sastava pokretne i vrste nepokretne faze te načina detekcije. Bolje razumijevanje mehanizama kromatografskog odjeljivanja i razvoj računalnih znanosti omogućili su nastanak računalnih programa za razvoj i optimizaciju kromatografskih metoda (npr. *DryLab*, *ChromSword*, *Fusion*).[38-41]

Razvoj semi-preparativne kromatografske metode prikladne za izolaciju željenog onečišćenja bit će najbrži i najjednostavniji ako se može temeljiti na prvotno razvijenoj HPLC (engl. *HPLC – High Performance Liquid Chromatography*) ili UHPLC metodi. Višestruka injektiranja uzorka s povećanim volumenom injektiranja (do 5 mL) zahtijevaju prisutnost dovoljne količine uzorka iz kojeg se želi izolirati onečišćenje.[42] Tijekom svake pojedinačne analize, nakon razdvajanja na koloni i prolaska eluata kroz detektor, izdvaja se frakcija koja sadrži onečišćenje. Sakupljene frakcije djelomično se upare u svrhu uklanjanja organske komponente eluensa i ukoncentriravanja onečišćenja te se zatim načini ekstrakcija iz vode u lako hlapljivo organsko otapalo koje se upari do suha. Izolirana količina onečišćenja je pogodna za daljnje analize u svrhu strukturne karakterizacije.

Suvremen pristup identifikaciji onečišćenja temelji se na primjeni vezanih sustava, točnije sprezi kromatografskih i spektroskopskih, odnosno spektrometrijskih sustava. Od kromatografskih tehnika to su najčešće plinska kromatografija (engl. *GC – Gas*

Chromatography), HPLC te tehnika kapilarna elektroforeza (engl. *CE – Capillary Electrophoresis*) koje se mogu spregnuti sa spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije i spektrometrijom masa, a rjeđe nailazimo na spregu sa infracrvenom spektroskopijom (engl. *IR – Infrared Spectroscopy*). Razvoj i usavršavanje vezanih sustava traje više od trideset godina, a komercijalno dostupni i u širokoj upotrebi su GC-MS i LC-MS sustavi. Prvi LC-NMR vezani sustav opisan je još 1978. godine,[43] no značajan pomak prema kontinuiranoj primjeni ostvaren je razvojem metoda supresije signala otapala, inovativnim dizajnom krio--sondi koje karakterizira povećana osjetljivost u usporedbi s uobičajenim NMR sondama, te uvođenjem poslijekolonske ekstrakcije na čvrstoj fazi.[44,45] LC-SPE-NMR tehnika uklonila je nužnost upotrebe skupih deuteriranih pokretnih faza prilikom kromatografskog razdvajanja, budući da je pokretnu fazu, neprikladnu za analizu NMR, moguće ukloniti sušenjem SPE nosača. Naime, nakon odvajanja na analitičkoj koloni, željena onečišćenja se pohranjuju na SPE nosačima, najčešće tijekom nekoliko opetovanih analiza, te potom ispiru s nosača manjom količinom deuteriranog otapala.[6–8]

2.3.1. Tekućinska kromatografija

Metode odjeljivanja sastojaka smjese (analita) mogu se podijeliti na klasične i instrumentalne analitičke metode, gdje su klasične taloženje, ekstrakcija i destilacija, a instrumentalne kromatografske i elektroforetske tehnike. Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga se kreće u određenom smjeru (pokretna faza). Kromatografske tehnike se s obzirom na fizikalno stanje pokretne faze mogu podijeliti na plinsku (GC), tekućinsku (LC) i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (SFC), a osnovu separacije čine diferencijalne brzine kretanja analita kroz nepokretnu fazu gibanjem pokretne faze. S obzirom na mehanizam odjeljivanja razlikujemo adsorpcijsku, razdjelnu, ionsko-izmjenjivačku, afinitetnu, te kromatografiju isključenjem.[46]

Temelje tekućinske kromatografije postavio je ruski botaničar Mihail Cvet koji je 1906. godine, pokušavajući razdvojiti različite biljne pigmente, propuštao njihove otopine kroz staklene kolone punjene kalcijevim karbonatom. Uočio je da se prolaskom otopine na koloni pojavljuju vrpce različitih boja, koje su odgovarale odijeljenim pigmentima.[47] Takav tip kromatografije se u današnje vrijeme koristi u preparativne svrhe, a uvođenjem crpki u svrhu povećanja protoka pokretne faze, primjenom manjih čestica punila kako bi se poboljšala

djelotvornost razdvajanja i cjelokupnim smanjivanjem dimenzija kromatografskih kolona nastala je tehnika HPLC. USP većinu farmaceutika opisuje kao organske, nehlapive i/ili temperaturno nestabilne molekule, što LC čini najprikladnijom tehnikom za analizu djelatnih tvari.[48] Tablica 3 prikazuje raspon parametara koji definiraju proces razdjeljenja kod tekućinske kromatografije (protok, volumen injektiranja, veličina čestica punila i dimenzija kolone) s obzirom na svrhu odjeljivanja.[49] Najteže je definirati raspon kapaciteta kolone, jer se radi o nelinearnoj veličini. Kod tehnika HPLC i UHPLC, kapacitet kolone varira ovisno o analitu i primjeni, dok se preparativna i semi-preparativna kromatografija uglavnom odvijaju u uvjetima preopterećenosti kolone uzorkom.

Tablica 3. Pregled parametara tekućinske kromatografije s obzirom na svrhu odjeljivanja.

Kromatografski parametar	**Tehnika LC**			
	Preparativna kromatografija	Semi-preparativna kromatografija	HPLC	UHPLC
Svrha	Izolacija	Izolacija, pročišćavanje	Odjeljivanje i kvantifikacija	Odjeljivanje i kvantifikacija
Kapacitet kolone / masa analita	10-100 mg	1-30 mg	1-15 μg	1-15 μg
Promjer kolone / mm	10-100	9,4-50	2,0-6,0	2,0-4,6
Promjer čestica / μm	10-50	5-50	3,5-10,0	1,5-3,0
Temperatura kolone[a]	ST[b]	ST[b]	15 °C-80 °C	20-90 °C
Protok / mL/min	20-100	5-50	1-5	0,2-1,0
Volumen injektiranja	do 5 mL	do 5 mL	1-100 μL	0,1-20 μL

[a] ovisno o tipu kromatografa
[b] ST – sobna temperatura

Najveći operativni tlak tekućinskih kromatografa gotovo 40 godina bio je 400 bara. Kako su kromatografske tehnike postale neizostavne u gotovo svakoj znanstvenoj disciplini koja razmatra analizu nekog uzorka, kompleksnost analita i matrica se vrlo brzo povećavala, a samim time i potreba za sve bržim, efikasnijim i selektivnijim metodama. Razvoj analitičkih kolona je krenuo u smjeru manjih čestica nepokretne faze, ali i kraćih kolona zbog ograničenja dostupne instrumentacije.[50] Kolone manjih čestica su skraćivane kako bi instrumenti mogli održavati radni tlak ispod 400 bara, dok 1997. godine nije predstavljen kromatograf koji je podržavao tlak do ekstremnih 4100 bara. Jorgenson i suradnici su prvi

evaluirali neporozne čestice promjera 1,5 μm u kapilarnim kolonama duljine do 52 cm koje su uzrokovale deseterostruko povećanja tlaka.[51] Sedam godina kasnije je jedan od glavnih proizvođača instrumenata na tržištu, kompanija Waters, u svoju ponudu uvrstila prve instrumente s radnim tlakom do 1000 bara pod nazivom UPLC (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Time primjena visokotlačne tekućinske kromatografije postaje komercijalna, a drugi proizvođači su za svoje instrumente primorani koristiti nezaštićeni termin UHPLC.[52,53] Zanimljivo je napomenuti da je krajem devedesetih termin UHPLC Jorgenson koristio u kontekstu tekućinske kromatografije ultra visokih tlakova (engl. *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*).[54] Najveći operativni tlak dostupnih UHPLC instrumenata varira od 600 do 1400 bara. Usporedo se razvijaju i detektori, jer brzina prikupljanja podataka mora biti brža zbog sve užih, ušiljenih pikova.[55]

Primjena analitičkih kolona sa sub-mikronskim česticama i promjerom 2,1 mm postala je uobičajena, a to je rezultiralo razvojem kraćih metoda, transferom postojećih analiza s HPLC na UHPLC kolone, te posljedično smanjenjem potrošnje otapala.[56] Ekvivalentno specifične HPLC i UHPLC metode se u trajanju mogu razlikovati nekoliko desetaka puta i stoga je tehnika UHPLC izuzetno pogodna za industriju gdje je broj uzoraka velik, a vrijeme analize nezanemariv faktor.[54] Na tržištu se danas nalazi velik broj UHPLC kolona različitih tipova nepokretne faze koje se razlikuju s obzirom na način proizvodnje i veličinu čestica, najviši dozvoljen tlak, otpornost na pokretne faze ekstremnih pH vrijednosti i temperaturni raspon.[55]

Nova generacija tekućinskih kromatografa temelji se na nanolitarskim protocima pokretne faze. Sredinom 2017. godine na tržištu je postojalo desetak nano-LC instrumenata s najvećim operativnim tlakom u rasponu od 400 bara do najviše 1000 bara (*Easy-nLC 1200* kompanije Thermo Fisher Scientific, Waters-ov *Acquity UPLC M-Class*, te *Zirconium Ultra Nano-UHPLC* tvrtke Prolab Instruments GmbH).[53] Nano-UHPLC instrumenti dizajnirani su na način da cjevčice koje povezuju pojedine dijelove instrumenta minimalno utječu na širenje pikova. Nano-kromatografske kolone karakterizira unutarnji promjer do 0,1 mm, čestice promjera do 2 μm i protok do 1 μL/min (tablica 4). Nano-, mikro- i kapilarne kolone omogućavaju analizu s manjom količinom uzorka i otapala prilikom odjeljivanja, no zahtijevaju prikladnu instrumentaciju pa se pribjegava kompromisnim rješenjima koja umanjuju prednosti takvih inovativnih nepokretnih faza.[55]

Tablica 4. Pregled kolona tehnike LC s obzirom na unutarnji promjer i protok pokretne faze.[57]

Tip LC kolone	Unutarnji promjer kolone	Protok pokretne faze
Nano-kolona	75 μm – 100 μm	100 nL/min – 1 μL/min
Kapilarna kolona	150 μm – 300 μm	3 μL/min – 10 μL/min
Mikro-kolona	500 μm – 1 mm	10 μL/min – 100 μL/min
Analitička kolona	1 mm – 2,1 mm	50 μL/min – 2,0 mL/min

Kod nano-kolona je efekt zagrijavanja uslijed trenja pokretne faze manji, što inače dovodi do radijalnih i longitudinalnih temperaturnih gradijenata duž kromatografske kolone. Radijalni gradijent se najčešće uočava kod izotermičkih analiza i utječe na efikasnost kolone. Efekt longitudinalnog gradijenta se opaža ukoliko postoji nejednoliko zagrijavanje kolone, no on ne utječe na efikasnost odjeljivanja već na selektivnost i zadržavanje analita.

Åsberg i suradnici su razvili i na primjeru omeprazola validirali relativno jednostavan postupak koji se sastoji od četiri eksperimenta i jednostavnih računskih operacija koje omogućavaju predviđanje pomaka vremena zadržavanja analita do kojih dolazi zbog spomenutih temperaturnih gradijenata prilikom UHPLC analiza. Uz neke aproksimacije, faktor vremena zadržavanja definirali su kao funkciju tlaka i temperature.[58,59]

Osjetljivost svake kromatografske metode se teoretski može poboljšati injektiranjem veće količine uzorka, ali to vodi smanjenju učinkovitosti analize budući da injektirani volumen ispuni veći dio ukupnog volumena kolone. Zbog malog volumena nano-, mikro- i kapilarnih kromatografskih kolona, nanošenje uzorka u što tanjem, fokusiranom sloju postao je izazov jer jedino na taj način ne dolazi do smanjivanja njihove učinkovitosti. Koncentraciju uzorka moguće je povećati višestrukim injektiranjem malih volumena i hvatanjem uzorka na dodatnoj koloni većih čestica variranjem sastava pokretne faze.[53] Druga opcija je injektiranje većeg volumena uzorka te prijekolonsko temperaturno fokusiranje pomoću dodatnog Peltier-ovog elementa.[60]

Groskreutz i Weber su 2014. godine proveli niz eksperimenata kojima su pokazali kako je temperaturno fokusiranje vrlo učinkovito kad se kombinira s odjeljivanjem pri visokim temperaturama. Razvili su TASF pristup (engl. *TASF – temperature-assisted on-column solute focusing*) gdje su ulaz u kolonu duljine 7 mm rapidno ohladili na 5 °C i takvu nisku temperaturu održavali 30 do 45 sekundi po injektiranju. Potom je isti dio kolone zagrijan na temperaturu odjeljivanja (60 °C) čime se nastavila elucija uzorka. Fokusiranje fronte uzorka

je bilo toliko učinkovito da se volumen injektiranja mogao povećati za 150% volumena kolone, a u kombinaciji s dodatnim fokusiranjem pod utjecajem pokretne faze, pikovi su suženi gotovo trideset puta.[61]

Pretpostavlja se da bi modeliranje utjecaja dodatnih otapala i temperaturnog fokusiranja omogućilo razvoj još učinkovitijih analiza i doprinijelo razvoju zasebne tehnike LC čija osjetljivost bi se temeljila na uvođenju temperaturnog gradijenta na prethodno ukoncentriranu frontu uzorka, tzv. tehnika CST-GLC (engl. *Combined Solvent- and Temperature-programmed Gradient Liquid Chromatography*).[61,62]

Imperativ još brže separacije odredit će budućnost tehnike UHPLC. Brže metode mogu se razvijati pomoću instrumentacije koja će podržavati tlak iznad 1400 bara, uz temperaturu pokretne faze iznad 60 °C, smanjivanjem veličine čestica nepokretne faze ispod 1,5 μm ili modifikacijom njihove raspodjele ili pak površinski poroznim česticama manjim od 2 μm (engl. *SPPs – Superficially Porous Particles*).

Pri tlakovima višim od 1200 ili 1400 bara, efekt lokalnog zagrijavanja uslijed površinskog trenja ne može se zanemariti i potrebno je koristiti mikro- ili kapilarne kolone. Povišenjem temperature smanjuje se viskoznost pokretne faze, raste difuzijski koeficijent, a pada tlak. Zbog manjeg tlaka moguće je povećati protok i/ili koristiti dulju kolonu kako bi se poboljšala djelotvornost separacije i razlučivanje.[54]

Najbolji efekt daju temperature u rasponu od 150 °C do 200 °C, no tada u pitanje dolazi stabilnost uzorka, nepokretne faze i detektora.[63] Kompromisno rješenje za tehniku UHPLC su temperature do 100 °C, a već iznad 60 °C je nužno koristiti aktivne ili pasivne grijače i zagrijati pokretnu fazu prije ulaska na kolonu.[64]

Može se reći da je veličina čestica obrnuto proporcionalna djelotvornosti kromatografskog odjeljivanja, no visok tlak kojem doprinose male čestice je obrnuto proporcionalan kvadratu ili čak kubu promjera čestice pri optimalnoj linearnoj brzini pokretne faze. Kolona s česticama promjera 1,0 μm bit će oko 70% djelotvornija nego ona s česticama promjera 1,7 μm, ali tlak može biti veći i oko pet puta. Stoga je za snižavanje operativnog tlaka nužno smanjiti čestice.[65,66] Drugi način utjecaja na tlak je bimodalna raspodjela čestica nepokretne faze, te uklanjanje „finih čestica“, no takve modifikacije ne moraju nužno pozitivno utjecati na tlak pa takav pristup valja dodatno istražiti.[66]

Usporedbom poroznih i neporoznih čestica istih dimenzija (manjih od 2 μm) uočeno je da se učinkovitost odjeljivanja s poroznim česticama može poboljšati do 50%.[67,68]

Može se zaključiti da razvoj UHPLC nepokretnih faza i UHPLC instrumentacije ide u smjeru minijaturizacije i sve ekstremnijih vrijednosti kromatografskih parametara.

2.3.2. Izolacijske tehnike

2.3.2.1. Semi-preparativna tekućinska kromatografija

Semi-preparativna tekućinska kromatografija se najčešće koristi za izolaciju malih količina onečišćenja (do 30 mg) u svrhu strukturne karakterizacije i identifikacije. Izolacija većih količina onečišćenja ili pročišćavanje glavne komponente provode se pomoću preparativne kromatografije (tablica 3).

Semi-preparativnu tekućinsku kromatografiju karakteriziraju nepokretne faze šireg unutarnjeg promjera nego kod analitičkih kolona, veće čestice, veći protoci, više koncentracije uzorka i veći volumeni injektiranja (tablica 3). Također, pokretne faze su jednostavnije, najčešće samo voda i organsko otapalo, bez puferskih otopina, nerijetko s kiselim ili bazičnim modifikatorima. Trajanje jedne analize je često više od sat vremena uz izokratnu eluciju, rjeđe jednostavne gradijente. Razlog za jednostavnost parametara vezanih uz pokretnu fazu je visok protok i nezanemariv vremenski period potreban da bi se sastavnice pokretne faze homogeno izmiješale. Frakcije se skupljaju ručno ili automatski na temelju zadanih postavki o visini pikova, vremenu elucije ili zadanoj *m*/*z* vrijednosti željenog onečišćenja, ovisno o instrumentu. S obzirom na broj injektiranja, ukupni volumen skupljenih frakcija može biti i nekoliko stotina mililitara koji se upare ili liofiliziraju, kako bi izolirano onečišćenje bilo prikladno za daljnje spektroskopske i spektrometrijske analize.

Više autora opisuje izolaciju onečišćenja aktivnih farmaceutskih tvari tehnikom semi-preparativne tekućinske kromatografije. Najbolje je koristiti uzorke u kojima se nalazi veća količina onečišćenja, a ukoliko se radi o degradacijskom onečišćenju. uzorke je moguće dodatno razgraditi. Spominju se razine onečišćenja iznad 0,1%, no najčešće se ipak radi o 1%, uz izostanak informacije o broju provedenih injektiranja. Koncentracije uzoraka su uglavnom visoke, do 50 mg/mL, a volumeni injektiranja 1 mL ili manji kako bi se smanjio efekt preopterećenosti kolone.[6,69–71]

Novu semi-preparativnu metodu najjednostavnije je razviti prema metodi HPLC, ukoliko ista postoji. Uz uvođenje semi-preparativne kolone, potrebno je načiniti i uvećanje protoka i opterećenosti kolone (volumena injektiranja) prema izrazima 2.1 i 2.2.

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{d_1^2}{d_2^2} \tag{2.1}$$

F_1 protok pokretne faze kroz „kolonu 1“
F_2 protok pokretne faze kroz „kolonu 2“
d_1 unutarnji promjer „kolone 1“
d_2 unutarnji promjer „kolone 2“

$$\frac{x_1}{x_2} = \frac{V(kolone)_1}{V(kolone)_2} \tag{2.2}$$

x_1 volumen injektiranja ili masa tvari nanešena na „kolonu 1“
x_2 volumen injektiranja ili masa tvari nanešena na „kolonu 2“
$V(kolone)_1$ volumen „kolone 1“
$V(kolone)_2$ volumen „kolone 2“

Semi-preparativna kromatografija funkcionira u uvjetima preopterećenosti kolone te simetrija pikova i broj teorijskih tavana nisu valjani parametri za procjenu djelotvornosti semi-preparativne analize. No, svakako je poželjno da razlika u vremenima eluiranja između pojedinih komponenata uzorka bude što veća, odnosno razlučivanje što bolje. Ponekad vrlo dobro razlučivanje HPLC metode nije narušeno ni u uvjetima povećane koncentracije uzorka. Razlog leži u efektu isključenja s obzirom na afinitet za aktivna mjesta na semi-preparativnoj koloni.[72]

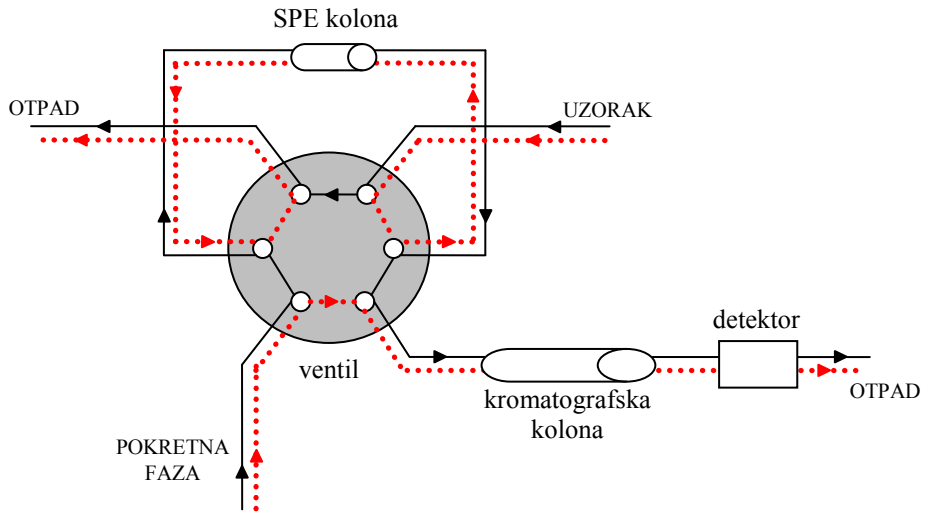
2.3.2.2. Tehnika SPE

Prva eksperimentalna primjena tehnike SPE opisana je sredinom prošloga stoljeća, a prva primjena u analitičke svrhe sredinom sedamdesetih godina. Začetak tehnike SPE kakva joj je danas svrha, bio je rad Griffiths i Hortona koji su krajem devedesetih predkolone koristili za poslijekolonsko ukoncentriravanje analita.[73] Predkolona je na početku analize kondicionirana ispiranjem vodom ili teškom/deuteriranom vodom, a na kraju analize je analit eluiran deuteriranim otapalom u protočnu ćeliju NMR. Uočeno je da su *S*/*N* vrijednosti (engl. *S*/*N* – *signal-to-noise value*) spektara NMR obrnuto proporcionalne širini pika u kromatogramu, što je zapravo rezultat ograničenog volumena ćelije NMR i mogućnosti da se cijela količina analita eluira tim zadanim volumenom. Upravo se tu rodila ideja da se na SPE koloni pohrani što veća količina analita, koja bi se kasnije eluirala u odabrani volumen NMR cjevčice.[74] Ubrzo tehnika SPE postaje atraktivna i vrlo česta metoda ekstrakcije analita iz složenih matrica uzoraka, uz razne vrste dostupnih punila za koje je uočeno da utječu na efikasnost

ekstrakcije (tablica 5).[75,76] Koristi se prilikom priprave uzoraka za daljnju analizu raznim instrumentalnim tehnikama, uklanjajući složene matrice uzoraka hrane, farmaceutskih, bioloških i uzoraka iz okoliša.[77]

Razvoj tehnike SPE ide u smjeru novih, selektivnijih faza koje se razvijaju specifično za grupu analita odnosno tip uzoraka. Uvode se novi materijali, razmatra se njihova škodljivost i naglašava se potreba jednostavne primjene. Idealan SPE sorbens omogućio bi brzu i selektivnu pripremu uzorka, koja bi s minimalnim brojem ekstrakcija omogućila dobru osjetljivost analitičke procedure.

Kod kromatografskih metoda, SPE se može primijeniti kao prijekolonska ili poslijekolonska tehnika, biti vezan izravno (engl. *on-line*) ili neizravno na analitički instrument (engl. *off-line*).[77] Automatizirani SPE sustavi koji se koriste kao prijekolonska ili poslijekolonska metoda ukoncentriravanja razdvojenih analita, a izravno su vezani na HPLC instrument, koriste sustav rotirajućih ventila za preusmjeravanje protoka tijekom analize (slika 6).[78] Najčešće postoji i dodatna crpka koja je odgovorna za uvođenje vode ili drugog slabijeg otapala. Automatizacija je skratila vrijeme priprave uzorka jer se kondicioniranje nosača čvrste faze, ispiranje i elucija analita provode automatski, rizik kontaminacije i/ili degradacije uzorka je smanjen, SPE kolone se mogu koristiti više puta, povećana je točnost metode, a ukupna potrošnja otapala je smanjena.[76,78,79]



Slika 6. Shematski prikaz sprege prijekolonske tehnike SPE i kromatografskog sustava.[78]

Tablica 5. Pregled tipova sorbensa u SPE nosačima s obzirom na vrstu kromatografije.[76]

Vrsta kromatografije	Tip SPE sorbensa
Kromatografija obrnutih faza	**Polimerne faze** (temeljene na stiren-divinilbenzenu)
	hidrofilno-lipofilne faze (Oasis HLB) *N*-vinil pirolidon (Strata-X, Phenomenex) *Bond-Elut Plexa* (Agilent)
	Silikagel na koji se vežu
	C18 lanci C8 lanci C4 lanci fenilne grupe *HiSEP* (hidrofobne površine okružene hidrofilnom mrežom) cijano skupine
Kromatografija normalnih faza	**Silikagel** s cijano, diolnim, amino skupinama; grafenov oksid
Ionsko-izmjenjivačka kromatografija	**Silikatni kostur** za amino skupine, kvaterne amine s ionima Cl^- (*LC-SAX*), sulfonske kiseline s ionima Na^+ (*LC-SCX*), karboksilne kiseline s ionima Na^+ (*LC-WCX*)
Kombinirana separacija (ionsko-izmjenjivačka i kromatografija obrnutih faza)	**Polimerna struktura** kao kostur za
	jaki kationski izmjenjivač; slabi kationski izmjenjivač; jaki anionski izmjenjivač; slabi anionski izmjenjivač modifikacije sulfonskim kiselinama; karboksilnim kiselinama; kvaternim aminima; sekundarnim aminima
Adsorpcijska kromatografija	**Silikagel** bez vezanih skupina Sorbensi bazirani na **aluminijevom oksidu** (*Alumina-A/-B/-C*) Sorbensi bazirani na **magnezijevom silikatu** (*LC-Florisil, Envi-Florisil*) Sorbensi bazirani na **smolama** (*Envi-Carb P*) **Grafitizirane faze** (*Envi-Carb, Envi-Carb C*) **Grafitizirani ugljikov nitrid** (g-C_3N_4)
Kromatografija isključenjem uz adsorpcijsku kromatografiju; Adsorpcijska kromatografija uz ekstrakciju na magnetskoj čvrstoj fazi[b]	„**Inteligentni sorbensi**“ – materijali s ograničenim pristupom (RAMs)[a] g-C_3N_4/Fe_3O_4 **kompozitni materijali**
Ekstrakcija na magnetskoj čvrstoj fazi[b]	**Grafen**; **Grafen/Fe_3O_4** na politiofenskim nanokompozitima; **Grafenov oksid**/nanohibridni **Fe_3O_4**; **Fe_3O_4/SiO_2/P** (*MAA-co-EGDMA*); **Vodljivi polimeri** **Magnetske normalne faze obložene molekulski tiskanim polimerima** (MIPs)[c]
Ionsko-izmjenjivačka kromatografija temeljena na elektrostatskoj sili	**Magnetske normalne faze obložene molekulski tiskanim polimerima** (MIPs) **Molekulski tiskani polimeri** (MIPs)[c]
Afinitetna kromatografija na imunosorbensima;	Separacija temeljena na **molekulskom prepoznavanju antitijela**
Ionsko-izmjenjivačka kromatografija uz ionske tekućine	Ionske tekućine nanesene na silikagel ili polimerne površine

[a] engl. *RAMs –Restrict Access Materials*
[b] engl. *magnetic SPE*
[c] engl. MIPs – *Molecularly Imprinted Polymers*

Nažalost, dostupna literatura potvrđuje tezu skupine autora da na ovom području nema sustavnog razvoja aplikacija, već se najčešće koristi metoda pokušaja i pogreške. Jedan od mogućih razloga je nerazumijevanje osnovnih fizikalnih principa na kojima se temelji tehnika SPE. Primjerice, kondicioniranje SPE nosača ispiranjem vodom ili organskim otapalom je neizostavan korak, jer se time povećava aktivna površina sorbensa i uklanjaju potencijalne interferirajuće vrste. Dva osnovna mehanizma separacije metodom SPE su razdjeljenje i/ili adsorpcija, dok Andrade-Eiroa i suradnici ističu i utjecaj elektronskih i elektromagnetskih interakcija kojima pokušavaju objasniti neke od nerazjašnjenih fenomena. Primjerice vodikove veze, ionske interakcije ili π–π veze mogu biti uzrok visokih vremena zadržavanja i poboljšane selektivnosti kod SPE faza koje se baziraju na molekulski tiskanim polimerima (engl. *MIP – Molecularly Imprinted Polymers*). Ista grupa autora je također postavila zanimljivu hipotezu o većim vremenima zadržavanja polarnih analita s obzirom na veću razliku dielektričnih konstanti pokretne i SPE faze.[76]

2.3.3. Strukturna karakterizacija

2.3.3.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *NMR – Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) je tehnika kojoj je temelj nuklearna magnetska interakcija, a glavna primjena identifikacija i strukturna analiza organskih i anorganskih spojeva te biomolekula. Spektroskopijom NMR mogu se proučavati atomske jezgre čiji je kvantni broj nuklearnog spina, I veći od nule, a za analizu organskih i biomolekula najzanimljivije su jezgre s $I = ½$, kao što su ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P.[80-83]

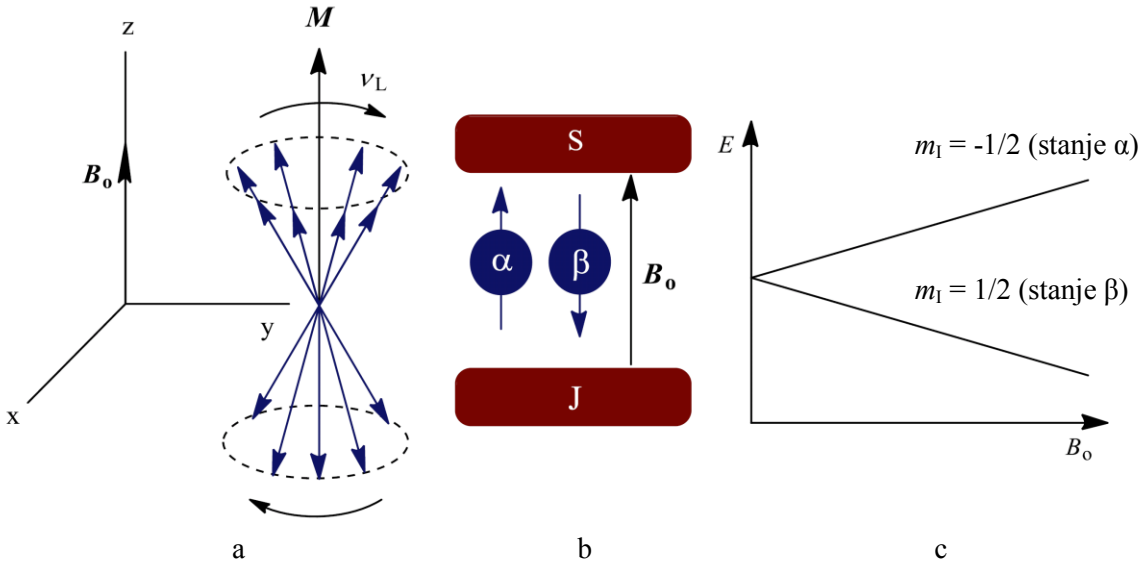
Od kada je 1938. godine uočen fenomen nuklearne magnetske rezonancije, prošlo je dvadesetak godina proučavanja same fizikalne pojave do otkrića da fina rezonantna frekvencija atomske jezgre ovisi o njenom okruženju. Danas je tehnika NMR neizostavna metoda u mnogim granama industrije, pa tako i u farmaceutskoj industriji, posebice kod razvoja novih djelatnih tvari. Snaga spektroskopije NMR leži u mogućnosti evaluacije različitih molekulskih interakcija nizom komplementarnih eksperimenata, a bez kemijskih modifikacija uzorka.[80,84]

Svaku atomsku jezgru karakteriziraju dva kvantna broja, već spomenuti kvantni broj nuklearnog spina, I i nuklearni magnetski spinski kvantni broj, m_I koji opisuje orijentaciju nuklearnog spina u magnetskom polju, a broj mogućih orijentacija je $2I + 1$.

Tehnika NMR je u svoj srži kvantni fenomen, no za tumačenje jednostavnih, vremenski neovisnih eksperimenata može poslužiti pristup uobičajen za ostale spektroskopske tehnike. Za razumijevanje osnovnih pulsnih eksperimenata NMR nužno je uvesti vektorski model. Ako atomsku jezgru zamislimo kao mali magnet s pripadajućim magnetskim momentom, pod utjecajem vanjskog magnetskog polja, B_0 u stanju ravnoteže sve promatrane jezgre nekog spoja (oko 10^{20} jezgri) doprinose stvaranju ukupnog magnetskog polja iste orijentacije kao i B_0 (engl. *bulk magnetization*), što se može prikazati vektorom magnetizacije. Ukoliko se primijeni kratkotrajni radiofrekvencijski puls, vektor magnetizacije je moguće „odmaknuti“ od osi z čime dolazi do precesije spinova koja se naziva Larmorova precesija (slika 7), a karakterizirana je Larmorovom frekvencijom, ν_L, odnosno umnoškom žiromagnetske konstante, γ i vanjskog magnetskog polja, B_0 (jednadžba 2.3).

$$\nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \tag{2.3}$$

Spinovi koji precesiraju oko vanjskog magnetskog polja B_0 mogu zauzeti različita spinska stanja koja se energijski razlikuju tako da spin orijentiran u smjeru magnetskog polja (stanje α) posjeduje nižu energiju od onog orijentiranog u suprotnom smjeru (stanje β) (slika 7). Razlika u energiji dvaju stanja proporcionalna je jakosti primijenjenog vanjskog magnetskog polja B_0.

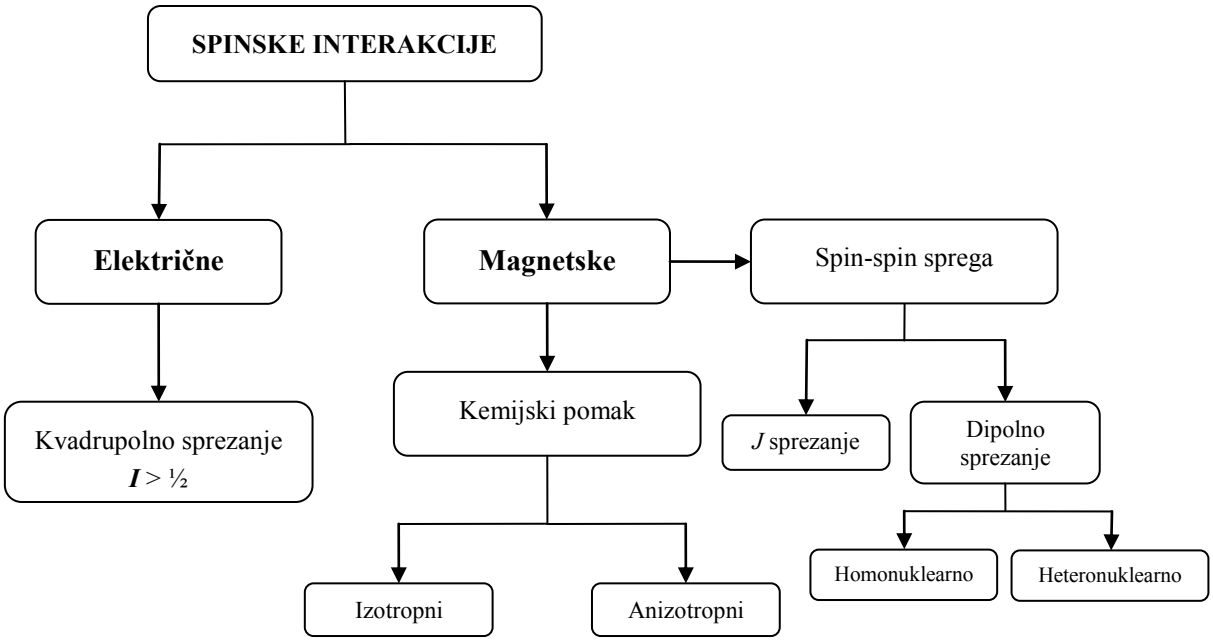


Slika 7. Spinovi protona u vanjskom magnetskom polju B_0: precesija spinova (a); orijentacija spinova (S- sjever, J- jug) (b); ovisnost razlike energije stanja α i β o jakosti magnetskog polja (c).[86]

U pulsnom eksperimentu NMR detektira se upravo precesija vektora magnetizacije, budući da interakcijom s magnetskim poljem nastaje struja (engl. *free induction*). Primjenom Fourierove transformacije (FT) zabilježeni signal slobodnog opadanja magnetizacije (engl. FID – *Free Induction Decay*) se iz vremenske domene prevodi u frekvencijsku.[83]

Spinske interakcije mogu biti električne i magnetske (slika 8). Između jezgara s kvantnim brojem nuklearnog spina $I = ½$ postoje samo magnetske interakcije. Interakcija spina jezgre sa statičnim vanjskim magnetskim poljem, B_0 naziva se Zeemanovom interakcijom. Arnold i suradnici su 1951. godine otkrili da kemijski neekvivalentni protoni iste molekule, ovisno o kemijskom okruženju tj. drugim atomima/elektronima koji ih okružuju, mijenjaju rezonancijsku frekvenciju NMR – efekt koji je nazvan *kemijski pomak*.[85] Upravo je otkriće kemijskog pomaka postavilo temelj strukturne karakterizacije molekula tehnikom NMR. Razlikujemo još i spregu spin-spin, interakciju između spinova koja cijepa signale NMR, a koju su uočili i objasnili Herbert Gutowsky i suradnici 1951. godine.[80] Interakcije spin-spin opisuju se pomoću konstante sprege J koja se izražava u hertzima (Hz). Informacije koje pružaju multipleti signala nastali zbog sprege spin-spin te analiza konstanti sprega J neizostavan su dio procesa strukturne karakterizacije.

Anizotropne interakcije NMR između spinova jezgara u čvrstom stanju rezultiraju širokim rezonantnim linijama, dok su u otopini, zbog brzog gibanja molekula, takve interakcije uprosječene te nastaju spektri NMR visokog razlučivanja. U samim počecima spektroskopije NMR postojala su dva pravca proučavanja, NMR širokih linija (engl. *broad line NMR*) koji je odigrao važnu ulogu u razvoju teorije NMR i omogućio rješavanje struktura mnogih krutina, te NMR visokog razlučivanja. Za snimanje spektara NMR visokog razlučivanja potreban je vrlo snažan magnet koji daje izuzetno homogeno magnetsko polje, te stabilan elektronički sustav koji neće stvarati dodatan šum.[80]



Slika 8. Shematski prikaz interakcija spinova.[86]

Budućnost spektroskopije NMR je u minijaturizaciji i sprezi sa separacijskim tehnikama te drugim detekcijskim metodama. Minijaturizacija spektroskopije NMR se odnosi na upotrebu planarnih mikro-zavojnica (engl. *μCoils*) koje nalaze primjenu u medicini, no Fratila i suradnici su pokazali mogućnost njihove upotrebe i u analitičke svrhe, kada je dostupna veća količina uzorka. Napori su ostvareni u kreiranju vertikalne zavojnice na mikročipu ili niza zavojnica načinjenih od zlatne žice s potencijalnom primjenom u kapilarnoj spektroskopiji NMR.[87,88] Izdvajanjem metabolomike kao zasebnog pravca istraživanja bioloških problema širokog raspona, od problema u okolišu do ljudskih bolesti, zbog komplementarnih informacija koje pružaju, spektroskopija NMR i spektrometrija masa postale su neizostavne analitičke tehnike. Spektri NMR nude brzu, specifičnu informaciju, bez potrebe za prethodnom separacijom, uz relativno lako kvantificiranje koncentracija metabolita od 1 mol dm^{-3}, dok MS omogućava detekciju femtomolarnih i atomolarnih količina analita.[89]

2.3.3.1.1. Jednodimenzijske tehnike NMR

Jednodimenzijski spektri NMR nastaju kao rezultat ovisnosti intenziteta signala o kemijskom pomaku nastalom indirektnom interakcijom spina i vanjskog magnetskog polja. Spektri ^{1}H

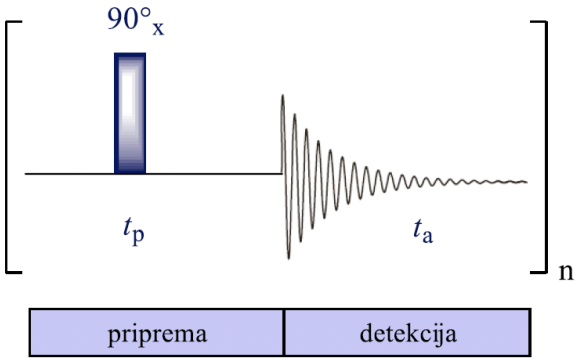
NMR, ^{13}C NMR, ^{15}N NMR te drugih NMR aktivnih jezgara pružaju informacije o strukturi molekule.

Neke od jednodimenzijskih tehnika NMR su:

- ^{1}H NMR – omogućuje detekciju i procjenu broja kemijski neekvivalentnih protona;
- tehnika ^{13}C NMR izvan rezonancije (engl. *off-resonance*) – koristila se prije uvođenja suvremenih višepulsnih tehnika za određivanje broja protona vezanih za C atom;
- tehnika APT (engl. *Attached Proton Test*) – višepulsna tehnika koja se koristi za određivanje multipliciteta heterojezgri;
- tehnika INEPT (engl. *Intensive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) – koristi se za pojačavanje intenziteta signala jezgri s malom žiromagnetskom konstantom, γ (npr. ^{13}C) prijenosom polarizacije s jezgri s velikim γ (npr. ^{1}H i ^{19}F);
- tehnika DEPT (engl. *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) – omogućava editiranje spektara heterojezgri (npr. ^{13}C) prema multiplicitetu (odabirom pulsnog kuta θ) uz pojačavanje signala jezgri s malim γ (npr. ^{13}C) prijenosom polarizacije s jezgri s velikim γ (npr. ^{1}H i ^{19}F);
- tehnika PENDANT (engl. *Polarisation Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing*) – koristi se za pojačavanje signala jezgri s malim γ (npr. ^{13}C) prijenosom polarizacije s jezgri s velikim γ (npr. ^{1}H i ^{19}F), uspješno i kroz više veza. Spektri heterojezgri mogu se editirati prema multiplicitetu te daju informacije i o kvaternim ugljikovim atomima.[86]

2.3.3.1.1.1. Tehnika ^{1}H NMR

Pulsni slijed jednodimenzijske tehnike ^{1}H NMR čine period pripreme, t_p i period detekcije, t_a, a odvaja ih puls od 90° po osi x u trajanju t_p. Vrijeme akvizicije, t_a je vrijeme u kojem zavojnica detektira signal i najčešće je dovoljno (2-4 s) da se FID zabilježi u cijelosti. Detektirani signal se pomoću Fourierove transformacije iz vremenske domene prevodi u frekvencijsku. Opisani slijed se zbog povećanja osjetljivosti tehnike provodi n puta (slika 9).[81,86]



t_p period pripreme
t_a period akvizicije
n broj ponavljanja pulsnog slijeda

Slika 9. Pulsni slijed tehnike ^{1}H NMR.[86]

Raspon frekvencija u kojem detektiramo signale, odnosno širina spektra (engl. *spectral width*) kod tehnike ^{1}H NMR je uglavnom 10 ppm, rijetko 20 ppm ako se radi o potpuno nepoznatom spoju.[81]

Intenzitet signala u spektrima ^{1}H NMR je moguće izmjeriti i taj proces se naziva integriranje, a grafički se prikazuje simbolom integrala iznad samog signala. Integral površine signala je proporcionalan broju protona koji doprinose signalu.

2.3.3.1.2. Dvodimenzijske tehnike NMR

Dvodimenzijske tehnike spektroskopije NMR čine periodi pripreme (P) i miješanja (M), koji sadrže pulseve ili klastere pulseva konstantne pulsne širine, te periodi evolucije (E, t_1) i detekcije (D, t_2), a rezultat je spektar u vremenskoj domeni koji se u frekvencijsku domenu prevodi primjenom Fourierove transformacije. Akvizicija podataka uključuje ponavljanje pulsnog slijeda uz povećanje perioda evolucije t_1 za isti iznos (Δt_1) i snimanje FID-a kao funkcije t_2 za svaku vrijednost t_1. Svaki signal opisuje intenzitet u dvije frekvencijske dimenzije, evolucijskoj, F_1 i detekcijskoj dimenziji, F_2. Razlikujemo nekoliko dvodimenzijskih tehnika NMR:

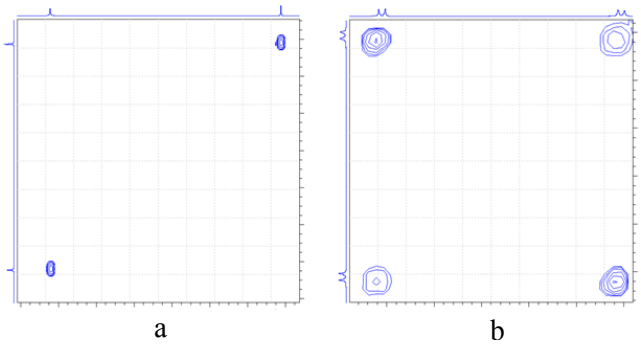
- COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*) – homonuklearna tehnika koja pruža informacije o povezanosti protona najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze;
- HMQC (engl. *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) – heteronuklearna tehnika koja pokazuje spregu protona i heteroatoma kroz jednu vezu;

- HSQC (engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) – heteronuklearna metoda za opažanje sprege protona i heteroatoma kroz jednu vezu, no bez sprege između protona uzduž osi F1;
- HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) – heteronuklearna tehnika koja pokazuje spregu protona i heteroatoma kroz dvije, tri ili četiri veze;
- NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) – tehnika koja omogućava uvid u međusobnu udaljenost spinova koji su u dipolnoj sprezi;
- ROESY (engl. *Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*) – slična tehnici NOESY, osim mjesta nastanka NOE efekta (ravnina *xy* umjesto osi *z*).[86]

Prikaz 2D spektara NMR je najčešće topografski, na način da gustoća kontura odgovara intenzitetu signala.

2.3.3.1.2.1. Tehnika COSY

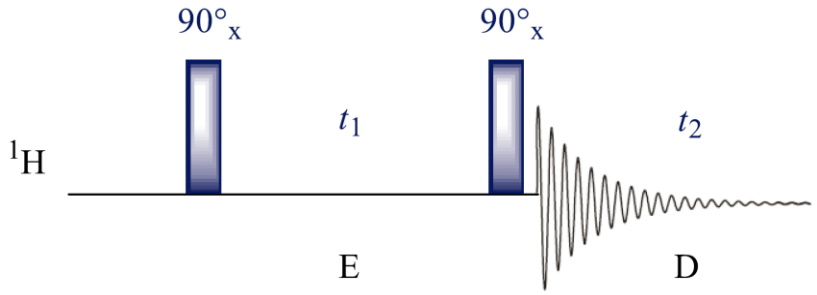
Homonuklearna dvodimenzijska tehnika COSY je bila prvi provedeni 2D eksperiment, a danas je to jedna od najviše korištenih 2D tehnika NMR budući da pruža informacije o skalarnoj sprezi protona najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. U COSY spektru razlikujemo dijagonalne (engl. *diagonal-peak multiplets*) i izvandijagonalne ili križne (engl. *cross-peak multiplets*) signale. Izvandijagonalni signali se javljaju kad postoji sprega (slika 10).[83]



a b

Slika 10. Shematski prikaz spektra COSY za dva protona koji se: a) ne sprežu, b) sprežu.[86]

Pulsni slijed tehnike COSY karakteriziraju dva pulsa od 90° po osi x, a koja razdvaja period evolucije (t_1) nakon čega slijedi period detekcije magnetizacije t_2 (slika 11).



t_1 period evolucije (razvoja)
t_2 period detekcije
E evolucija
D detekcija

Slika 11. Pulsni slijed za tehniku COSY.[86]

Nakon prvog pulsa od 90°$_x$ dolazi do prijenosa magnetizacije s osi z na ravninu xy, a drugi puls omogućava prijenos koherencije i uočavanje korelacijskih, antifaznih signala izvan dijagonale, ukoliko postoji spinska sprega (slika 10b). Ako nema sprezanja, opažaju se jedino dijagonalni, fazni signali (slika 10a). Osi dvodimenzijskog prikaza čine frekvencijske dimenzije F_1 i F_2.[86]

Moguće su i varijacije pulsnih slijedova, primjerice smanjenjem kuta drugog pulsa za 45° čime je moguće uočiti promjenu relativnih intenziteta korelacijskih signala koji ovise o relativnom predznaku konstante sprege, J (tehnika COSY-45).[80]

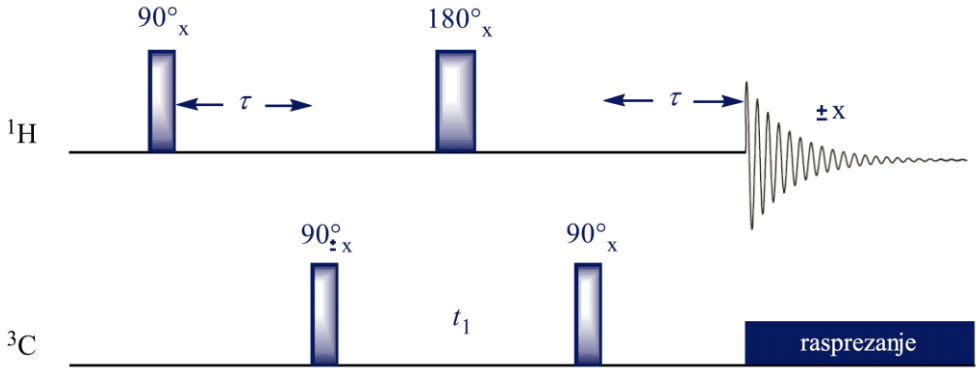
Uz dva postojeća pulsa, moguće je uvesti i dodatan puls koji se od drugog pulsa odvaja vrlo kratkim vremenom zadrške. U tom kratkom periodu dvostruka kvantna koherencija filtrira sve opažene signale, koji se s trećim pulsom konvertiraju nakon čega slijedi detekcija magnetizacije. Zapravo se radi o smanjenju intenziteta faznih signala i njihovog preklapanja (tzv. filtriranju), budući da i dijagonalni i križni signali postaju antifazni pa se i sama tehnika naziva DQF COSY (engl. *DQF – Double Quantum Filtered*). Opisani pulsni slijed se može ostvariti faznim cikliranjem ili primjenom gradijenta magnetskog polja.[83]

2.3.3.1.2.2. Tehnika HMQC

Heteronuklearna dvodimenzijska tehnika HMQC inverzna je tehnika koja daje uvid u spregu protona i heterojezgri (npr. ^{13}C, ^{15}N) kroz jednu vezu. Spektar HMQC prikazuje se tako da se na osi F2 nalaze kemijski pomaci protona, a na osi F1 kemijski pomaci heterojezgri,

primjerice jezgri ^{13}C, a signali kvaternih ugljikovih atoma nisu prisutni. Jezgre s malim γ, kao što je ^{13}C, detektiraju se indirektno, a time je povećana osjetljivost mjerenja.

Pulsni slijed tehnike HMQC čine pobuda protona, prvi period odgode τ, potom puls od $90°_x$ nakon kojeg dolazi do prijenosa magnetizacije na jezgre ^{13}C, zatim protonski puls od $180°_x$ u vremenu evolucije t_1 uklanja utjecaj protonskih kemijskih pomaka, da bi posljednja primjena pulsa od $90°_x$ na jezgre ^{13}C dala detektirajuću magnetizaciju, a sprega između protona i ugljikovih atoma bila refokusirana tijekom drugog perioda odgode τ (slika 12). Magnetizacija na protonima se detektira u periodu rasprezanja na jezgrama ^{13}C.



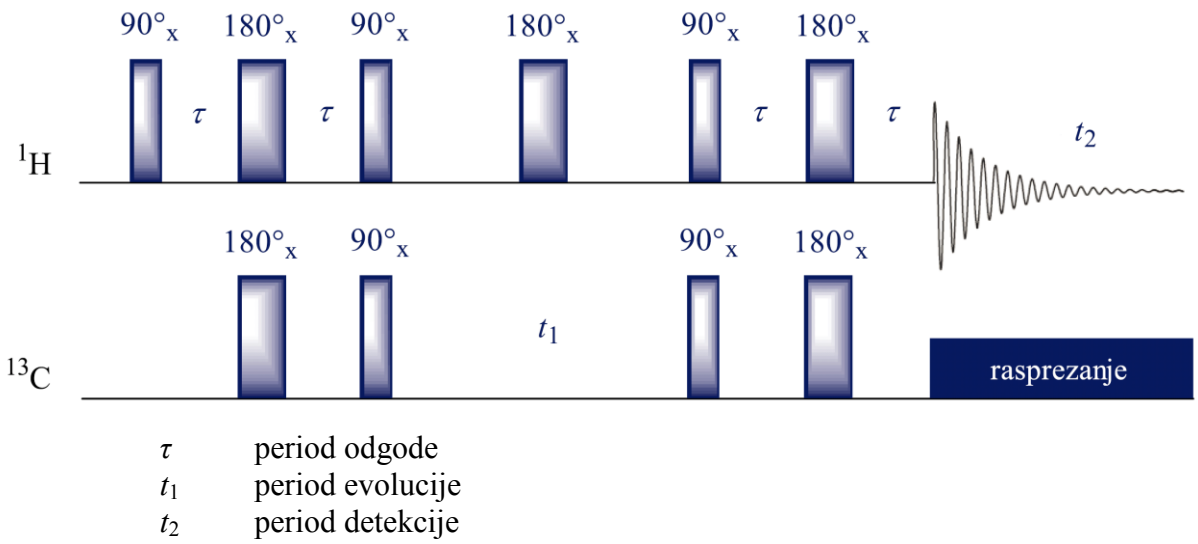
τ period odgode
t_1 period evolucije

Slika 12. Pulsni slijed za tehniku HMQC.[86]

2.3.3.1.2.3. Tehnika HSQC

Heteronuklearna dvodimenzijska tehnika HSQC pruža uvid u skalarnu spregu kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (npr. ^{13}C, ^{15}N). Spektar HSQC prikazuje se na način da os F2 sadrži protonske kemijske pomake, a na osi F1 nalaze se kemijski pomaci heterojezgri, primjerice jezgri ^{13}C.

Tehnika HSQC temelji se na pulsnom slijedu INEPT, odnosno kombinaciji pulsnog slijeda INEPT tijekom kojeg dolazi do evolucije koherencije od jednog kvanta i inverznog slijeda INEPT kojim se koherencija prenosi natrag na protonsku domenu (slika 13). Protonski puls od $180°_x$ uklanja utjecaj protonskih kemijskih pomaka tijekom evolucijskog vremena t_1, a do detekcije magnetizacije dolazi nakon perioda τ, uz uključeno rasprezajuće polje na jezgrama ^{13}C.



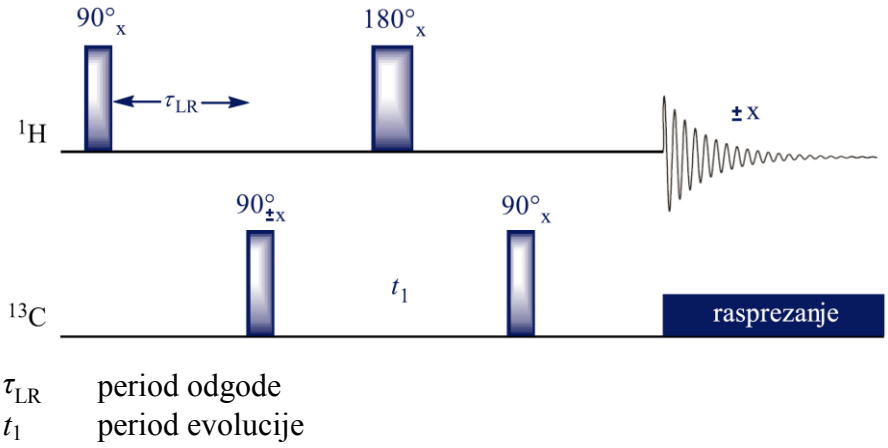
Slika 13. Pulsni slijed za tehniku HSQC.[86]

Mada spektri NMR dobiveni tehnikama HMQC i HSQC daju identične informacije, valja istaknuti male razlike koje mogu pomoći prilikom odabira tehnike s obzirom na svrhu eksperimenta. Kod tehnike HSQC radi se o kompleksnijem pulsnom slijedu, što rezultira smanjenjem intenziteta signala kod primjene nehomogenog magnetskog polja ili loše kalibriranog spektrometra NMR. No, budući da spektri HSQC ne sadržavaju spregu između protona duž osi F1, razlučivanje u dimenziji F1 je mnogo bolje nego kod tehnike HMQC.[83,86]

2.3.3.1.2.4. Tehnika HMBC

Heteronuklearna dvodimenzijska tehnika HMBC pokazuje korelaciju protona i ugljika kroz dvije, tri ili četiri veze, te omogućava povezivanje različitih spinskih sustava i olakšava strukturnu karakterizaciju. Tehnikom HMBC moguće je uočiti korelaciju protona i kvaternih ugljikovih atoma.

Pulsni slijed tehnike HMBC sličan je onome tehnike HMQC (slika 12), uz dulji vremenski period, τ_{LR} (period odgode) (30 do 60 ms) tijekom kojeg dolazi do evolucije magnetizacije protona, a koje omogućava opažanje sprege kroz više veza (slika 14).[83,86] Neželjena koherencija sprege kroz jednu vezu se uklanja faznim cikliranjem prvog pulsa ^{13}C između x i -x čime dolazi do filtriranja neželjene magnetizacije.[80]



Slika 14. Pulsni slijed za tehniku HMBC.[86]

Zbog mogućnosti uklanjanja neželjene koherencije, tehnika HMBC se često koristi kao dio složenijih pulsnih slijedova u svrhu filtriranja neželjenih signala.[80]

2.3.3.1.3. Krio-tehnologija

Sonda NMR je senzor koji se nalazi u središtu magneta, a sadrži zavojnicu čija uloga je dvojaka – slanje radiofrekventnih pulseva za pobudu uzorka te detekcija emitiranih signala NMR atomskih jezgara. Krio-sonda sadrži još i pojačivač signala, a bolju osjetljivost osigurava hlađenje zavojnice i pojačivača signala čime se smanjuje termički šum.[44] Povećanje osjetljivosti minimiziranjem termičkog šuma predložili su još Hoult i suradnici 1976. godine odvajanjem parametara koji utječu na signal, odnosno šum, za razliku od dotadašnjeg razmatranja jedne veličine – omjera signala i šuma (*S*/*N*).[90] Jasno su definirali da na signal utječu magnetska zavojnica i geometrija uzorka, dok je šum rezultat utjecaja termičkog šuma nastalog zbog omskog otpora zavojnice. Kovacs i suradnici 2005. godine spominju povećanje osjetljivosti tri do četiri puta uporabom krio-sonde.[44] Povećana osjetljivost spektroskopije NMR uvođenjem krio-tehnologije omogućuje snimanje spektara NMR visokog razlučivanja zamjetno manjih količina uzoraka i/ili u mnogo kraćem vremenu. Hlađenjem sonde na vrlo niske temperature termički šum se može smanjiti i do 500%. Već 1984. godine Styles i Soffe donose opis razvoja krio-sonde kod koje je uzorak sniman na sobnoj temperaturi, ali je spuštanjem temperature sonde s 290 K na 4,3 K tekućim helijem, šum snižen za faktor oko 22.[91] Autori kao ključne parametre razvoja krio-sondi NMR navode razvoj podupirućeg elektroničkog sklopa i dizajn magnetske zavojnice što se pokazalo ispravnim pretpostavkama.

Danas je dizajn i proizvodnja krio-sondi NMR izuzetno važan aspekt proizvodnje instrumentacije NMR te su krio-sonde komercijalno dostupne. Zbog razlike u cijeni, dušik se koristi za hlađenje češće od helija. Posebna pažnja se posvećuje kontroli magnetske osjetljivosti materijala koji se koriste, te elektronici koja podržava sustav. Kod spektroskopije NMR čvrstog stanja dodatan zahtjev predstavljaju visoke struje i vrtnja uzorka (u svrhu uprosječivanja intermolekulskih interakcija). U slučaju kada je analizu NMR nužno provoditi na visokim temperaturama i/ili tlakovima ili kod sprege tehnika (npr. LC-NMR, LC-SPE-NMR), sonde se dizajniraju ciljano za spektrometar NMR s točno određenom svrhom i finim prilagodbama koje omogućuju maksimalnu efikasnost.[44,80,92]

Povećanjem osjetljivosti povećala se i mogućnost primjene spektroskopije NMR, s naglaskom na metabolomiku i proteomiku. Analiza 1D spektara NMR omogućuje brz probir na stotine molekula – potencijalnih kandidata za novu djelatnu tvar, dok heteronuklearni 2D spektri pružaju informaciju o strukturi biomarkera u složenim uzorcima bioloških tekućina. Tijekom probira kandidata, osnovna evaluacija se provodi pomoću ^{1}H spektara NMR, no to često dovodi do preklapanja i diskutabilnih rješenja. Krio-tehnologijom je uveden znatan napredak, jer je moguće snimati i ^{13}C spektre NMR koje karakterizira viši kemijski pomak i veća disperzija signala, a povećana osjetljivost krio-sonde nadoknađuje manju prirodnu zastupljenost ^{13}C jezgara u usporedbi s protonima.[44] Spraul i suradnici su, pomoću krio-sonde u vezanom sustavu LC-NMR/MS, u uzorku ljudskog urina 4 sata nakon administracije 500 mg paracetamola, identificirali do tada nepoznat metabolit.[93] Samo 16 snimaka s krio-sondom, a bez zaustavljanja protoka, bilo je dovoljno za detekciju novog metabolita, što dodatno argumentira potencijal krio-sondi NMR.

2.3.3.2. Spektrometrija masa (MS)

Spektrometrija masa (MS) je instrumentalna tehnika kojom se može odrediti elementarni sastav spoja. Osnovni princip spektrometrije masa je ionizacija organskih ili anorganskih spojeva pomoću ionskog izvora, razdvajanje iona na temelju omjera mase i naboja (m/z) prolaskom kroz analizator masa te detekcija s obzirom na vrijednost m/z i zastupljenost u uzorku.[94] Spektrometrija masa se najčešće spreže s tehnikama plinske i tekućinske kromatografije u vezane sustave GC-MS odnosno LC-MS, što omogućava identifikaciju pojedinačnih sastojaka složenih smjesa.[49]

Ionizacija ovisi o molekuli analita i vrsti primijenjene ionizacijske tehnike (tablica 6), a može se provesti na uzorku koji je prethodno preveden u plinovito stanje ili neposredno iz otopine. Razvoj metoda ionizacije uzorka izravno iz otopine omogućio je uspješno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, kao što je na primjeru elektroraspršenja prvi opisao Fenn.[95–97] Elektroraspršenje je široko rasprostranjena tehnika budući da ne diskriminira analit s obzirom na polarnost i hlapivost poput tehnike termoraspršenja, već omogućava ionizaciju kemijski vrlo različitih molekula. Do blage ionizacije pri atmosferskom tlaku dolazi u struji dušika, a može biti pozitivna i negativna s mogućnošću nastanka višestruko nabijenih iona što omogućava analizu makromolekula.[98,99]

Tablica 6. Pregled tehnika ionizacije u spektrometriji masa.[49]

Tehnika ionizacije	Kratica i puni naziv na engleskom jeziku
Ionizacija elektronima	EI – Electron Ionization
Kemijska ionizacija	CI – Chemical Ionization
Ionizacija brzim atomima	FAB – Fast Atom Bombardment
Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija	MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
Termoraspršenje	TS – Thermospray
Ionizacija pri atmosferskom tlaku	API – Atmospheric Pressure Ionization
Elektroraspršenje	ESI – Electrospray
Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku	APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization
Ionizacija poljem	FI – Field Ionization
Desorpcija poljem	FD – Field Desorption

Neutralne, nehlapive spojeve karakterizira mala vjerojatnost ionizacije, pa se oni mogu derivatizirati u spojeve koje je lako ionizirati ili su već nabijeni. Vjerojatnost ionizacije je moguće povećati i vezanjem s kationima metala koordiniranom ionizacijom elektroraspršenjem (engl. *CIS – Coordination Ion Spray*).[100] Uz dodatak alkalijskih (Li^+, Na^+, K^+), ali i NH_4^+ iona u pokretnu fazu, neutralni spojevi postaju prikladni za detekciju tehnikom MS. Formiranjem nekovalentnih veza s heteroatomima kao što su kisik, dušik, fosfor ili sumpor, navedeni kationi s organskim molekulama stvaraju komplekse u plinovitoj fazi spektrometra masa.[101]

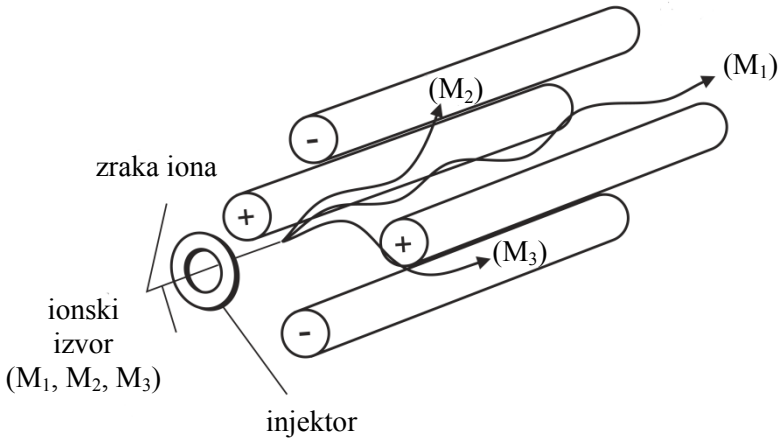
Analizator masa je dio spektrometra masa koji razdvaja ione s obzirom na omjer mase i naboja, a vrsta analizatora ovisi o kombinaciji primijenjenog ionizacijskog izvora i detektora

(tablica 7).[99] Najčešći analizator masa koji se koristi kod vezanog sustava LC-MS je kvadrupol, sačinjen od dva para dijagonalno električki povezanih elektroda koje neutraliziraju ione koji ih dotaknu, odnosno propuštaju ione stabilne putanje (slika 15). Hoće li ion proći analizator ovisi o njegovoj vrijednosti *m*/*z* te primijenjenoj struji i polju. Kvadrupol omogućava razdvajanje iona čija razlika u masi nije manja od 0,5 amu.[99]

Tablica 7. Podjela analizatora masa po vrstama, ionskom izvoru i načinu razdvajanja iona.[99]

Analizator masa	Ionski izvor	Način razdvajanja iona
Kvadrupol	Kontinuirani	Električno polje i propusni filtar
Stupica iona	Pulsni	Napon i rf polje
Vremena leta	Pulsni	Vrijeme leta
Sektor	Kontinuirani	Magnetsko polje
FTMS[1]	Pulsni	Frekvencija

[1] Fourier-transformirana spektrometrija masa



Slika 15. Presjek kvadrupola.[99]

Osnovne veličine u spektrometriji masa su razlučivanje, točnost mjerenja masa, područje mjerenja masa, osjetljivost, granica detekcije i brzina snimanja spektara (tablica 8).[99]

Tablica 8. Osnovne veličine u spektrometriji masa.[99]

Veličina	Izraz	Definicija
Razlučivanje	$R = m / \Delta m$	Mjera djelotvornosti odvajanja iona približno istih masa
Točnost mjerenja masa	$ppm = 10^6 \Delta m_t / m_{mj}$	Sposobnost određivanja molekulske mase čim bliže točnoj masi
Područje mjerenja masa	$\Delta m_{područja} = m_{gg} - m_{dg}$	Raspon između gornje i donje granice m/z
Osjetljivost	$S_{m/z} = A_{masa\text{-}struja} / (G\ m_{uz})$	Mjera odziva detektora koja se dobiva analizom određene količine analita
Granica detekcije	$V_{mj} > (V_{ol} + 3\sigma_{ol})$	Najmanja moguća količina uzorka koju je moguće kvalitativno odrediti
Brzina snimanja spektara	$\Phi_{snimanja} = (dm/dt)$	Mjera brzine snimanja zadanog raspona masa

m	prosječna molekulska masa na vrhu masenog pika
Δm	raspon masa na polovici visine masenog pika
Δm_t	razlika između izračunate i izmjerene molekulske mase
m_{mj}	izmjerena molekulska masa
m_{gg}	najveća moguća izmjerena masa (*gg – gornja granica*)
m_{dg}	najmanja moguća izmjerena masa (*dg – donja granica*)
$A_{masa\text{-}struja}$ [C]	površina ispod masenog pika mjerena u vremenu
G	visina odziva detektora iona
m_{uz} [μg]	masa analiziranog uzorka
V_{mj}	izmjereni napon signala za određeni analit
V_{ol}	uprosječeni napon u zadanom vremenu
σ_{ol}	standardna devijacija napona osnovne linije u zadanom vremenu
dm	zadano područje masa
dt	vrijeme potrebno za snimanje zadanog područja masa

Kod analitičkih procedura gdje je detektor spektrometrija masa, često se koriste unutarnji standardi. Unutarnji standardi služe kompenzaciji promjena u pripravi uzorka, separaciji na nepokretnoj fazi, ionizaciji i općenito fluktuacijama u radu instrumenta. U tu svrhu mogu se koristiti i izotopno označeni spojevi i strukturni analozi analita. Metode s izotopno označenim unutarnjim standardom, i to u rasponu "ciljane“ koncentracijske razine analita daju najpouzdanije rezultate. Zbog uklanjanja velikog broja faktora koji utječu na nepouzdanost rezultata, u metodama s izotopno označenim unutarnjim standardom moguće je koristiti kalibraciju samo jednom otopinom.[102]

Detekcija spektrometrijom masa pruža dovoljnu osjetljivost i zadovoljavajuću selektivnost koje je teško ostvariti drugim detektorima. Spektrometrija masa postala je neizostavnim

dijelom proteomike, omogućavajući identifikaciju proteina pretraživanjem spektralnih baza podataka.[103] Identifikacija te proučavanje interakcija malih organskih molekula te biofarmaceutika doprinijela je učestalom korištenju spektrometrije masa i u farmaceutskoj industriji. Zbog takve široke primjene tehnike i velikog broja proizvođača spektrometara masa moguće je, a ujedno i nužno, selektivno odabrati instrument namijenjen za ciljanu skupinu analiza.[99]

2.3.4. Vezani sustav LC-NMR

Vezani sustav LC-NMR može biti dizajniran na način da se za vrijeme detekcije spektroskopijom NMR protok pokretne faze zaustavlja (engl. *stopped-flow*) ili ne zaustavlja (engl. *on-flow*), da se eluat koji sadrži pik od interesa za vrijeme kromatografske analize pohranjuje u izdvojenu kapilaru (engl. *loop-storage*) ili se pak uvodi poslijekolonska ekstrakcija analita na čvrstoj fazi (SPE). *Stopped-flow* dizajn omogućava zaustavljanje pokretne faze u trenu kada pik od interesa stigne do NMR ćelije, no istovremeno dolazi do difuzije ostatka uzorka na kromatografskoj koloni pa ova metoda nije prikladna za istovremenu analizu više komponenata koje valja kromatografski razdvojiti. Kod tehnike neprekinutog protoka, snimanje spektara NMR se provodi tijekom čitave kromatografske analize i nije moguća manipulacija duljinom trajanja eksperimenta NMR za pojedini pik. Stoga je takva tehnika neprikladna za određivanje manjih količina onečišćenja. Za analizu manjih količinu onečišćenja prisutnih u istom uzorku najprikladnije su tehnike koje se zasnivaju na *loop-storage* i SPE metodologiji. Kod izuzimanja dijela eluata i pohrane u kapilari ili kapilarnoj petlji najčešće se radi o nizu manjih spremnika definiranog volumena, kao primjerice kod Brukerovog automatskog uzorkivača BPSU-36 koji sadrži 36 petlji volumena 240 μL. Volumen prihvatne petlje definira količinu analita koja će se naći u spektrometru NMR, a ta količina opada sa širinom kromatografskog pika. Kod primjene SPE tehnike konačna količina analita definirana je brojem injektiranja, afinitetom zadržavanja analita na čvrstoj fazi, topljivošću u deuteriranom otapalu te vrstom čvrste faze (tablica 5).[104]

Tokunaga i suradnici jasno su povezali jačinu magnetskog polja spektrometra NMR, vrijeme trajanja eksperimenta ^{1}H NMR i masu onečišćenja prisutnog u uzorku.[104] ^{1}H spektar NMR nastao djelovanjem magnetskog polja jačine 18,8 T kroz jedan sat, uz korištenje krio-sonde, bit će zadovoljavajući ukoliko je količina analita oko 1 μg. Za uzorak u kojem je

nepoznato onečišćenje prisutno u udjelu 0,1%, a volumen injektiranja kromatografske analize 10 μL, potrebna je visoka koncentracija uzorka (100 mg/mL). Osjetljivost je moguće povećati optimizacijom kromatografskih parametara, no tehnika HPLC ima svojih ograničenja. Uvođenjem tehnike UHPLC kromatografsko odjeljivanje traje kraće, simetrija pikova je mnogo bolja i pikovi su ušiljeniji te je time omogućeno skladištenje cijele količine eluiranog pika u petlji. Dakle, osjetljivost vezanog sustava LC-NMR se može povećati za oko tri puta uvođenjem UHPLC metodologije, što je izuzetno korisno u slučajevima kad nema mogućnosti uvođenja krio-sonde. Tablica 9 pokazuje usporedbu vezanih sustava ovisno o vrsti tekućinske kromatografije, odnosno sprege sa spektroskopijom NMR.

Tablica 9. Usporedba vezanih sustava LC-NMR, LC-SPE-NMR i UHPLC-NMR.[104]

Parametar		**LC-NMR**			**LC-SPE-NMR**	**UHPLC-NMR**
		On-flow	*Stopped-flow*	*Loop-storage*		
Osjetljivost		Niska	Prosječna	Prosječna	Visoka	Visoka
Višestruke analize		Moguće	Moguće[1]	Moguće	Moguće	Moguće
Vrijeme analize	LC	Uobičajeno	Uobičajeno/dugo[2]	Uobičajeno	Uobičajeno	Kratko
	NMR	Uobičajeno	Uobičajeno	Uobičajeno	Kratko	Kratko
Utjecaj polarnosti analita		Ne	Ne	Ne	Da	Ne
Utjecaj difuzije		Ne	Da[3]	Ne	Ne	Da/Ne[4]
Dodatna optimizacija		Ne	Ne	Ne	Da[5]	Ne

[1] Kada se provode eksperimenti NMR za više kromatografski razdijeljenih pikova, HPLC analizu je potrebno ponavljati onoliko puta koliko je željenih pikova analita.

[2] U slučaju više analita, potrebno je osigurati produljeno trajanje kromatografske analize kako bi se smanjio difuzijski efekt.

[3] Tijekom eksperimenta NMR dolazi do difuzije pikova analita zadržanih na koloni.

[4] Kako bi se spriječila difuzija tijekom eksperimenata NMR, volumen petlje za pohranu bi trebao biti jednak volumenu NMR protočne ćelije.

[5] Optimizacija SPE parametara je nužna.

U vezanom sustavu LC-NMR neizostavno je koristiti tehnike supresije signala otapala. Budući da pokretnu fazu u tekućinskoj kromatografiji čine nedeuterirana otapala, razvijeni su pulsni slijedovi NMR kao što su WET, dvostruka spinska jeka pulsnih gradijenata (engl. *PFG – Pulsed Field Gradients*), WATERGATE i prezasićenje (NOESY tip) koji otklanjaju ili umanjuju njihove signale zaostale u uzorcima. U protivnom bi signali

nedeuteriranih otapala ugušili signal analita zbog ograničenja koja nameće dinamički raspon, odnosno omjer najjačeg i najslabijeg signala u spektru NMR.[9]

2.3.4.1. Vezani sustav LC-SPE-NMR

Upravo mogućnost višestruke ekstrakcije na jednom nosaču omogućuje veću koncentraciju izoliranog spoja, čime je umanjen problem niske osjetljivosti spektroskopije NMR i olakšano snimanje dvodimenzijskih (2D) heteronuklearnih spektara NMR.[7,8] Tehnika SPE spregnuta s tekućinskom kromatografijom otvara i mogućnost korištenja semi-preparativne umjesto analitičke kolone, kao što su naveli Miliauskas i suradnici.[105] Veći kapacitet semi-preparativne kolone omogućava izolaciju analita nakon samo jednog injektiranja vrlo koncentrirane otopine uzorka. Usporedbom istih volumena injektiranja nanesenih na analitičku i semi-preparativnu kolonu može se opaziti bolje razlučivanje na semi-preparativnoj koloni.

Glavna prednost vezanog sustava LC-SPE-NMR pred tehnikom LC-NMR je mogućnost korištenja uobičajenih, nedeuteriranih otapala za kromatografsko razdvajanje. Nakon ekstrakcije analita na čvrstom nosaču, on se suši u struji dušika čime se uklanjaju otapala korištena za odjeljivanje na kromatografskoj koloni. Spojevi pohranjeni na nosačima SPE se potom eluiraju deuteriranim otapalom, pri čemu se koriste vrlo male količine otapala (do 200 μL – ovisno o volumenu cjevčice NMR).

S obzirom na pregled recentne literature (tablica 10), tehnika LC-SPE-NMR veliku primjenu nalazi u strukturnoj karakterizaciji prirodnih spojeva. Složena matrica takvih uzoraka zahtijeva kromatografsko odjeljivanje, a male i ograničene količine analita višestruka injektiranja kako bi se na nosaču SPE sakupila količina dovoljna za spektroskopsku analizu. Primjenom tehnike LC-SPE-NMR identifikacija prirodnih spojeva je uvelike olakšana. Na području farmaceutike je manji broj radova, što je vjerojatno obrnuto proporcionalno učestalosti primjene u farmaceutskim tvrtkama s obzirom na resurse kojima industrija raspolaže te imperativu kompetitivnosti.

Područje primjene tehnike LC-SPE-NMR vrlo je široko, a optimizacijom SPE komponente te daljnjim istraživanjima u različitim granama znanosti i industrije može se očekivati da će postati neizostavnom tehnikom u procesu strukturne karakterizacije nepoznatih spojeva u smjesama.

Tablica 10. Pregled primjene tehnike LC-SPE-NMR.[7,74, 109-117]

Uzorak / Analit	Masena konc. ili masa uzorka / Vol. inj. / Broj injektiranja	Kolona HPLC	Tip sorbensa SPE	Spektrometar NMR	Sonda NMR	Snimljeni spektri NMR	Autor
Uzorak ljudskog urina / metabolit paracetamola	Urin nakon primjene 1 g paracetamola / 50 µL urina / 1-3	YMC J'Sphere ODS-H80 (250 mm × 2,0 mm; 4,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker Avance 600; Bruker Avance 500	3 mm krio-sonda; 3 mm dvokanalna krio-sonda; 3 mm dvokanalna $^{1}H/^{13}C$ protočna sonda	^{1}H NMR NOESY	Godejohann[106]
Kora biljke *Harpagophytum procumbens* / iridoidi	14 mg mL^{-1} / 10 µL / višestruka injektiranja	Merck Superspher® C18 (250 mm x 2,0 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm); HySphere C18 (10 mm x 2 mm; 7 µm)	Bruker Avance 600	3 mm LC SEI[1] dvokanalna $^{1}H/^{13}C$ sonda	^{1}H NMR	Seger[107]
Djelatna tvar TCH346[2] / razgradni produkti	10 mg mL^{-1} / 200 µL / > 300	YMC-Pack ODS-AQ (50 mm × 4,6 mm; 3,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 10-12 µm)	Bruker Avance 600	3 mm dvokanalna krio-sonda	^{1}H NMR ^{13}C NMR 2D NMR	Pan[7]
Reakcijska smjesa / poliacetilenski alkoholi	2,5 mg mL^{-1} – 12,5 mg mL^{-1} 5 µL / 1	Agilent Zorbax Stable Bond C18 (150 mm × 4,6 mm; 3,5 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker Avance AV 500	3 mm LC SEI[1] dvokanalna $^{1}H/^{13}C$ protočna sonda	^{1}H NMR ^{19}F NMR ^{13}C NMR	Seger[108]
Gomolj biljke *Corydalis solida* / pojedini nepoznati spojevi	43 mg mL^{-1} / 50 µL / 1	Phenomenex Synergi Max-RP (150 mm x 4,6 mm; 4,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker Avance AV 600	3 mm dvokanalna inverzna krio-sonda	^{1}H NMR COSY HSQC HMBC	Sturm[74]
Djelatna tvar 5-aminosalicilna kiselina / razgradni produkti	0,5 mg mL^{-1} / 100 µL / 6	Phenomenex Luna C18 (150 mm × 10,0 mm; 3,0 µm)	Spark HySphere C18 HD (10 mm x 2 mm; 7 µm)	Bruker Avance 600	3 mm $^{1}H/^{13}C$ protočna sonda	^{1}H NMR	Larsen[109]

Uzorak / Analit	Masena konc. ili masa uzorka / Vol. inj. / Broj injektiranja	Kolona HPLC	Tip sorbensa SPE	Spektrometar NMR	Sonda NMR	Snimljeni spektri NMR	Autor
Smjesa linearnih alkilbenzensulfonata[3] / pojedine molekule alkilbenzensulfonata	2,33 mg L^{-1} / 30 µL / 4	Phenomenex Prodigy ODS-3 (250 mm × 4,6 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker AVII 600	5 mm TCI[4] krio-sonda	^{1}H NMR COSY	Schmidt[110]
Korijen biljke *Anthriscus sylvestris* / lignani	–	Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker Avance III 500	5 mm TCI[4] krio-sonda	^{1}H NMR ^{13}C NMR 1D NOESY COSY TOCSY HSQC HMBC 2D NOESY	Hendrawati[111]
Plodovi biljke *Strychnos usambarensis* / pojedini alkaloidi	0,05 i 0,5 g ekstrakta / 30 µL / 3	Grace Alltima C8 (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm); Merck LiChrospher 60 RP-Select-B (250 mm x 4,6 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 10-12 µm)	Bruker Avance 500	krio-sonda	^{1}H NMR ^{13}C NMR 2D NMR	Cao[112]
Ekstrakt biljke *Ormocarpum kirkii* / pojedini nepoznati spojevi	50 mg mL^{-1} / 20 µL / 20	Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker DRX 400	3 mm BBI[5] sonda; 5 mm dvokanalna ^{1}H/^{13}C sonda	^{1}H NMR ^{13}C NMR 2D NMR	Xu[113]
Korijen biljke *Taraxacum officinale* / derivati inozitola	24,4 mg i 25,8 mg ekstrakta / – / višestruka injektiranja	Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 10-12 µm)	Bruker Avance III 500	1,7 mm TXI[4] sonda	^{1}H NMR 1D NOESY COSY TOCSY	Kenny[114]

Uzorak / Analit	Masena konc. ili masa uzorka / Vol. inj. / Broj injektiranja	Kolona HPLC	Tip sorbensa SPE	Spektrometar NMR	Sonda NMR	Snimljeni spektri NMR	Autor
Kora biljke *Steganotaenia araliacea* / protoflavanon	0,4 mg mL^{-1} – 14,6 mg mL^{-1} / 10 µL i 20 µL / višestruka injektiranja	Grace Apollo C18 (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker DRX 400	3 mm BBI sonda; 5 mm dvokanalna $^{1}H/^{13}C$ sonda	^{1}H NMR ^{13}C NMR DEPT-90 DEPT-135 COSY HSQC HMBC	Capistrano[115]
Stabljika biljaka *Ziziphus nummularia* i *Ziziphus spina-christi* / pojedini alkaloidi	15 mg mL^{-1} / 10 µL / višestruka injektiranja; 8,4 mg mL^{-1} / 20 µL / višestruka injektiranja	Phenomenex Luna C18 (150 mm × 4,6 mm; 3,0 µm); Waters XBridge C18 (250 mm × 4,6 mm; 5,0 µm)	Spark HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm; 5-15 µm)	Bruker Avance III; Bruker DRX 400	1,7 mm TCI krio-sonda; 3 mm BBI sonda ili 5 mm dvokanalna $^{1}H/^{13}C$ sonda	^{1}H NMR ^{13}C NMR COSY HSQC HMBC	Tuenter[116]
Ekstrakt divlje jabuke / pojedini nepoznati spojevi	0,7 mg mL^{-1} – 13,3 mg mL^{-1} / 5 µL / 20	Waters Cortex C18 (150 mm × 2,1 mm; 1,6 µm)	–	Bruker Avance III 800	–	^{1}H NMR ^{13}C NMR HSQC	Wen[117]

[1] inverzna sonda NMR (engl. *SEI – Selective Inverse Probe*)

[2] dibenzo[b,f]oksepin-10-il-metil-*N*-metil-*N*-prop-2-inilamin hidrogenmaleat

[3] engl. *LASs – Linear alkylbenzenesulfonates*

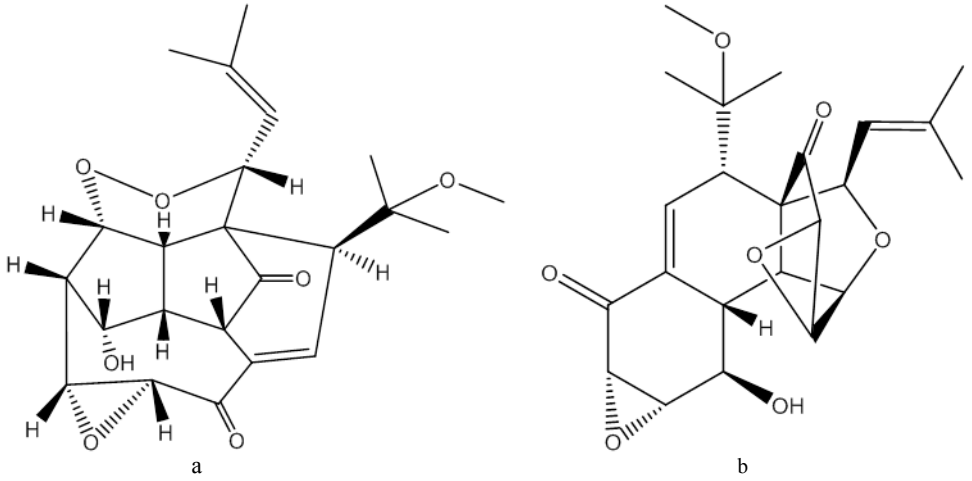
[4] trokanalna inverzna sonda NMR (TCI, TXI)

[5] širokopojasna inverzna sonda NMR (engl. *BBI – Broad Band Inverse*)

2.3.5. Predviđanje strukture računalnim metodama

Strukturna karakterizacija je složen logički postupak za čiju provedbu je potrebno znanje, a koji olakšava iskustvo. Ponekad znanstvenici evaluacijom istih podataka dolaze do različitih strukturnih rješenja, bilo zbog kvalitete podataka (npr. znatna preklapanja u spektrima NMR, te kompleksne, nepotpune ili pogrešne informacije) ili pojedinačnog pristupa i (pred)znanja. Ljudsku pogrešku je moguće otkriti korištenjem računalnih programa za predviđanje strukture (engl. *CASE – Computer-Assisted Structure Elucidation*) koje Elyashberg naziva svojevrsnim poligrafom strukturne karakterizacije i predlaže da predviđanje kemijskih pomaka u ^{1}H i ^{13}C spektrima NMR u svrhu potvrde predložene strukture postane pravilo, a ne iznimka.[118]
Recentna računalna rješenja (npr. *SESAMI, LSD, COCON, ACD/Structure Elucidator, CMC-se, SENECA, CAST/CNMR Structure Elucidator*, *NMRscape*) zahtijevaju unos 1D i/ili 2D spektara NMR.[118] Računalni program na temelju unesenih podataka predlaže sve moguće strukture, uz točno navođenje korištenih aksioma. Znanstvenici ponekad neutemeljeno ili nesvjesno primjenjuju određena pravila i postupak deduktivnog određivanja strukture čine nedovoljno egzaktnim i podložnim grešci.[119]

Jedan od poznatijih primjera pogrešne strukturne karakterizacije na temelju analize spektara NMR je struktura heksaciklinola. Prvotno su Gräfe i suradnici 2002. godine na temelju 1D i 2D spektara NMR (^{1}H, ^{13}C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, NOESY) te IR spektra objavili strukturu heksaciklinola koju prikazuje slika 16a.[120] Heksaciklinol je opisan kao prirodni metabolit prisutan u gljivi *Panus Rudis*. Potom je 2006. godine LaClair opovrgnuo inicijalnu strukturu na temelju 39 sintetskih koraka i skupa spektroskopskih podataka koji su se kasnije pokazali manjkavi.[121] Iste godine Rychnovsky izdaje kratko priopćenje kojim opovrgava LaClaira na temelju primjene računalnih metoda i prvotnih spektroskopski podataka.[122] Konačno, Porco i suradnici objavljuju sintetski put (deset koraka) do heksaciklinola, spektroskopske podatke koji odgovaraju onima iz 2002. godine te nedvojbeno potvrđuju strukturu (slika 16b) koju je predložio Rychnovsky, uz napomenu da se zapravo radi o izolacijskom artefaktu.[123]



Slika 16. Prvotno objavljena struktura heksaciklinola (a)[120] i točna, računalnim metodama potvrđena struktura heksaciklinola (b).[122,123]

Računalni programi, primjerice *ACD/Structure Elucidator*, predviđaju moguće strukture na temelju postojećih spektara NMR, izračunavaju ^{1}H i ^{13}C kemijske pomake za svaku od predloženih struktura i potom uspoređuju opažene i računate kemijske pomake.[124] Kemijski pomaci ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F i ^{31}P jezgara se mogu izračunati korištenjem empirijskih ili kvantno-mehaničkih metoda, koristeći neuronske mreže ili HOSE algoritam (engl. *Hierarchical Organisation of Spherical Environments*). Točnost predviđenih kemijskih pomaka empirijskih metoda ovisi o kvaliteti spektara u bazama podataka koje računalni program koristi (za ^{13}C iznosi oko 1.5 ppm), dok to nije slučaj kod kvantno-mehaničkih metoda koje zahtijevaju više vremena i ovise o prikladnosti izabranih podataka.[118]

Suvremena spektroskopija NMR je izuzetno moćna analitička tehnika koja je postala rutinski alat za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju molekula. Korištenje računalnih programa za predviđanje strukture upotrebu tehnike NMR može uvelike olakšati, te je vrlo vjerojatno da će oni postati uobičajena i neizostavna komponenta programskih rješenja samih spektrometara NMR.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Tehnika UHPLC

Za analizu uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (**I–III**) korišten je tekućinski kromatograf Agilent 1290 Infinity s apsorpcijskim detektorom koji čini niz fotodioda (engl. *DAD – Diode Array Detector*) upravljan *Empower 2* programskim paketom. S obzirom na moguće razlike u apsorpciji pojedinih spojeva i glavne komponente, 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, evaluirani su spektri UV pikova od interesa snimljeni u rasponu od 190 nm do 400 nm. Kako bi se metodom normaliziranja površina mogla odrediti relativna količina pojedinog analita, za svaki uzorak je odabrana valna duljina pri kojoj svi sastojci smjese apsorbiraju na kvalitativno i kvantitativno usporediv način. Korištena je komercijalno dostupna analitička kolona Waters Acquity UPLC BEH C18 dimenzija 100 mm x 2,1 mm sa sub-mikronskim česticama od 1,7 μm. Temperatura kromatografske kolone bila je 60 °C, a automatskog injektora 15 °C. Korištene su pokretne faze jednostavnog sastava – voda i acetonitril (CH_3CN) u volumnom omjeru 95:5 (pokretna faza A) te čisti acetonitril (pokretna faza B). Odvajanje sastojaka nanesenih na kromatografsku kolonu ostvareno je gradijentnim ispiranjem uz protok pokretne faze 0,4 mL min^{-1}. Zbog kasno eluirajućih pikova prisutnih u uzorku **III**, početni gradijentni program (tablica 11) je izmijenjen dodatkom stupnja s visokim udjelom acetonitrila (90%) produženog trajanja (tablica 12). Na kolonu je najčešće injektirano 2 μL otopine uzorka masene koncentracije oko 0,16 mg mL^{-1}.

Tablica 11. Gradijentni program ispiranja metode UHPLC korišten za analizu uzoraka **I** i **II**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	40
1,50	60
3,00	60
7,00	95
8,00	40
9,50	40

Tablica 12. Gradijentni program ispiranja metode UHPLC korišten za analizu uzorka **III**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	32
5,50	61
6,90	90
9,00	90
9,01	32
10,00	32

3.2. Tehnika semi-preparativne tekućinske kromatografije

Pri izolaciji tri glavna onečišćenja prisutna u uzorku **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina korišten je tekućinski kromatograf Agilent 1100 s apsorpcijskim detektorom koji čini niz fotodioda. Instrument je prilagođen provođenju semi-preparativne kromatografije dodatkom veće kapilarne petlje injektorskom sustavu (5 mL), sustava crpki koje omogućavaju protok do 100 mL min^{-1} i automatiziranog skupljača frakcija. Za radnu valnu duljinu odabrano je 224 nm. Korištena je komercijalno dostupna semi-preparativna kolona Agilent Zorbax SB C18 dimenzija 250 mm x 21,2 mm sa česticama promjera 7 μm. Temperature kromatografske kolone i automatskog injektora nisu kontrolirane. Korištene su pokretne faze jednostavnog sastava – voda kao pokretna faza A i acetonitril kao pokretna faza B. Odvajanje sastojaka nanesenih na kromatografsku kolonu ostvareno je gradijentnim ispiranjem (tablica 13) uz protok pokretne faze 20 mL min^{-1}. Na kolonu je injektirano 1500 μL otopine uzorka masene koncentracije 100 mg mL^{-1}. Frakcije su odabirane prema vremenu eluiranja pomoću računalnog programa *Agilent ChemStation A.08.03* (tablica 14).

Tablica 13. Gradijentni program semi-preparativne metode HPLC korišten za analizu uzorka **I**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	40
4	48
25	48
26	55
27	70
28	40
30	40

Tablica 14. Parametri automatiziranog skupljača frakcija.

Vrijeme / min	Skupljanje frakcija	Vrijeme skupljanja pojedine frakcije
0,00	Ne	–
23,60	Da	0,5
24,80	Ne	–
25,15	Da	0,5
26,15	Ne	–

3.3. Tehnika LC-SPE

Tehnika LC-SPE je primijenjena pomoću kromatografskog sustava Agilent 1260 Infinity spregnutog s Bruker Prospekt2 SPE sustavom uz podršku računalnog programa *Bruker Daltonics HyStar 3.2*. Sustav SPE čine dodatna crpka za nadoknadu protoka, visokotlačni rezervoar otapala, automatizirani modul za izmjenu SPE kolona te nosač SPE kolona. Valna duljina UV detektora s nizom fotodioda postavljena je na 224 nm. Korištena je analitička HPLC kolona Waters XBridge C18 dimenzija 250 mm x 4,6 mm punjena česticama veličine 5 μm. Temperatura kolone održavana je na 50 °C, a injektora na 15 °C. Kao polarna pokretna faza korištena je voda (pokretna faza A), a acetonitril kao nepolarna pokretna faza (pokretna faza B) uz protok 1 mL min^{-1}. Zbog spojeva visoke polarnosti prisutnih u uzorku **III**, početni gradijentni program (tablica 15) je izmijenjen dodatkom stupnja s visokim udjelom acetonitrila trajanja gotovo 4 minute (tablica 16). Poslijekolonski dodatak vode s protokom od 3 mL min^{-1} poboljšao je učinkovitost zadržavanja izoliranih spojeva na nosačima SPE.

Injektirano je 10 μL otopina uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina **I–III** masene koncentracije oko 150 mg mL^{-1}. Korištene su kolone SPE tipa HySphere Resin GP dimenzija 10 mm x 2 mm. Za sušenje kolona SPE u trajanju 60 minuta korišten je dušik.

Tablica 15. Gradijentni program ispiranja metode LC-SPE korišten za analizu uzoraka **I** i **II**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	32
35,0	67
35,1	32
40,0	32

Tablica 16. Gradijentni program ispiranja metode **LC-SPE** korišten za analizu uzorka **III**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	32
15	61
22,5	90
26,3	90
26,4	32
30,0	32

3.3.1. Optimizacija parametara sustava SPE

U svrhu optimizacije sustava SPE odabrani su parametri za koje se pretpostavilo da utječu na efikasnost pohrane i/ili ekstrakcije s nosača SPE – tip sorbensa, protok poslijekolonskog dodatka vode, vrsta deuteriranog otapala za eluiranje te tip sonde NMR (tablica 25). Prilikom istraživanja svake vrijednosti ključnog parametra provedeno je 5 injektiranja uzorka **I** i evaluirane su *S*/*N* vrijednosti odabranih spojeva (spojevi **1**, **2**, **3** i **7**).

Tablica 17. Varijacija ključnih parametara sustava SPE.

Tip sorbensa nosača SPE	Protok vode / mL min^{-1}	Deuterirano otapalo	Sonda NMR
CN	1,0	CD_3CN	inverzna BBI sonda
C8	3,0	CD_3OD	direktna BBO krio-sonda
C18	4,0		
Resin GP[1]			
Resin SH[2]			

[1] engl. *GP – General Purpose*
2 engl. *SH – Strong Hydrophobic*

3.4. Spektroskopija NMR

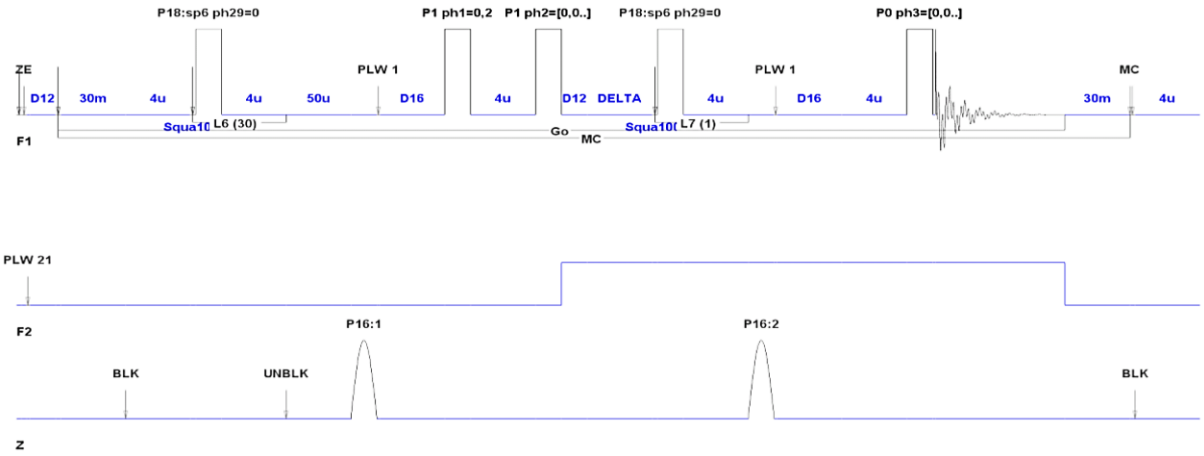
Spektri NMR snimani su pomoću Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend NMR spektrometra opremljenog s 5 mm direktnom širokopojasnom (engl. *BBO*) krio-sondom Prodigy sa z-gradijentnom zavojnicom, uz podršku *TopSpin 3.5* programskog paketa. Prilikom analize uparenih frakcija dobivenih primjenom tehnike semi-preparativne kromatografije na uzorak **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina korištena je 5 mm inverzna sonda (engl. *BBI*) sa z-gradijentnom zavojnicom. Korišten je NOESY-tip modula za supresiju signala otapala. Nakon kromatografskog odjeljivanja i sakupljanja analita na nosačima SPE, izolirana onečišćenja su eluirana deuteriranim acetonitrilom (CD_3CN) u NMR cjevčice promjera 3 mm. Kako bi se cjevčice prilagodile „*spinnerima*“ od 5 mm, korišteni su dodaci tipa *Match*. Svi eksperimenti su provedeni pri temperaturi od 298 K. Za ^{1}H i ^{13}C kemijske pomake kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS – $Si(CH_3)_4$), a za kemijske pomake jezgara ^{19}F triklorfluormetan ($CFCl_3$). Korišteni su pulsni slijedovi dostupni unutar programskog paketa *TopSpin 3.5*.

^{1}H spektri NMR snimljeni su sa spektralnom širinom od 8013 Hz i digitalnim razlučivanjem od 0,49 Hz po točki primjenom 128 snimaka po spektru. Za snimanje ^{19}F spektara NMR primijenjeno je 128 snimaka uz spektralnu širinu od 150 kHz i digitalno razlučivanje od 2,29 Hz po točki. gCOSY spektri snimljeni su uz korištenje 2048 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za svaki inkrement primijenjeno je 16 snimaka i spektralna širina od 6394 Hz. Digitalno razlučivanje iznosilo je 6,24 Hz i 49,95 Hz po točki u F2, odnosno F1 dimenziji.

Za snimanje $^{1}H–^{13}C$ gHSQC spektara primijenjena su 64 snimka uz spektralnu širinu od 6394 Hz u F2 i 18112 Hz u F1 dimenziji. Broj točaka u F2 dimenziji bio je 2048, a u F1 dimenziji 256. Digitalno razlučivanje iznosilo je 6,24 Hz po točki u F2 dimenziji te 141,5 Hz po točki u F1 dimenziji. $^{1}H–^{13}C$ gHMBC spektri snimljeni su primjenom 128 snimaka uz spektralnu širinu od 5330 Hz u F2 dimenziji odnosno 22346 Hz u F1 dimenziji. Korišteno je 2048 točaka u F2 dimenziji te 256 pomaka u F1 dimenziji. Digitalno razlučivanje bilo je 5,21 i 174,6 Hz po točki u F2, odnosno F1 dimenziji.

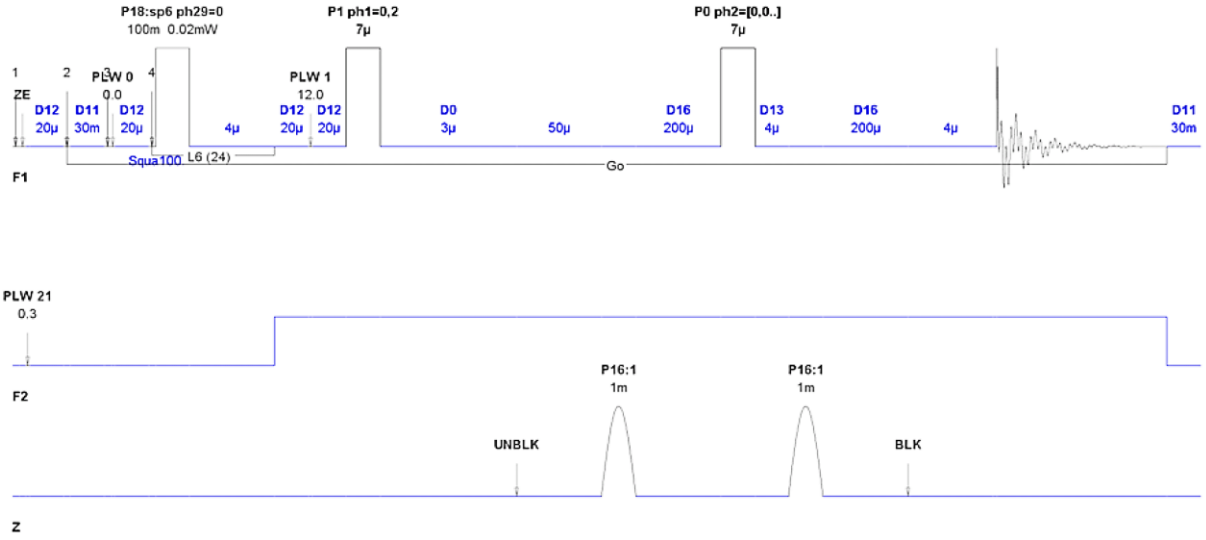
3.4.1. Tehnika supresije signala otapala

Za supresiju signala otapala je upotrijebljen pulsni slijed 1D NOESY koji koristi dva selektivna pulsa za prezasićenje tijekom odgode relaksacije i vremena miješanja te dva gradijentna pulsa za bolju supresiju signala otapala (slika 17).



Slika 17. Pulsni slijed 1D NOESY korišten za supresiju signala otapala.

Prilikom snimanja spektara COSY korišten je pulsni slijed za supresiju signala otapala koji koristi selektivni (meki) puls za prezasićenje, gradijentne pulseve za odabir magnetizacije, te rasprezanje signala ^{13}C u F2 domeni tijekom vremena evolucije t_1 i vremena detekcije t_2 (slika 18).



Slika 18. Pulsni slijed korišten za supresiju signala otapala u spektru COSY.

3.5. Tehnika MS

Analiza pomoću tehnike LC-MS je provedena na UHPLC sustavu Waters Acquity UPLC I-Class s PDA detektorom (engl. *Photodiode Array*) spregnutim s Waters Acquity spektrometrom masa s jednim kvadrupolom (engl. *SQD – Single Quadrupole Detector*), uz podršku *Empower 2* računalnog sustava. Korištena je analitička kolona Waters Acquity UPLC BEH C18 dimenzija 100 mm x 2,1 mm i veličine čestica od 1,7 µm. Temperatura kolone bila je 60 °C, a automatiziranog uzorkivača 15 °C. Kao polarna pokretna faza korištena je voda, a acetonitril kao nepolarna pokretna faza, uz dodatak mravlje kiseline u volumnom udjelu od 0,1% u obje komponente. Tijekom analize pri protoku pokretne faze od 0,4 mL min^{-1} korišten je gradijentni program ispiranja (tablica 18). U uzorku **III** su opaženi kasno eluirajući pikovi te je početni gradijent ispiranja izmijenjen dodatkom visokog udjela acetonitrila (tablica 19). Volumen injektiranja iznosio je od 0,1 µL do 5 µL, ovisno o koncentraciji analita u uzorku.

Spektri masa spojeva izoliranih iz uzoraka **I** i **II** su snimljeni uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *ESI*) i parametre navedene niže (tablica 20), dok je za spojeve izolirane iz uzorka **III** korištena i pozitivna i negativna ionizacija uz navedene MS parametre (tablica 21).

Tablica 18. Gradijentni program LC-MS metode korišten za analizu spojeva izoliranih iz uzoraka **I** i **II**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	40
1,5	60
3,0	60
7,0	95
8,0	40
9,5	40

Tablica 19. Gradijentni program LC-MS metode korišten za analizu spojeva izoliranih iz uzorka **III**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze B / %
0	32
5,50	61
6,90	90
11,00	90
11,01	32
12,00	32

Tablica 20. MS parametri LC-MS metode korištene za analizu spojeva izoliranih iz uzoraka **I** i **II**.

Parametar MS	Vrijednost
Kapilarni napon	1,00 kV
Desolvatacijska temperatura	200 °C
Temperatura ionizacijskog izvora	80 °C
Desolvatacijski protok dušika	550 L h^{-1}
Protok dušika u izvoru	50 L h^{-1}
Raspon masa	(80–800) Da

Tablica 21. MS parametri LC-MS metode korištene za analizu spojeva izoliranih iz uzorka **III**.

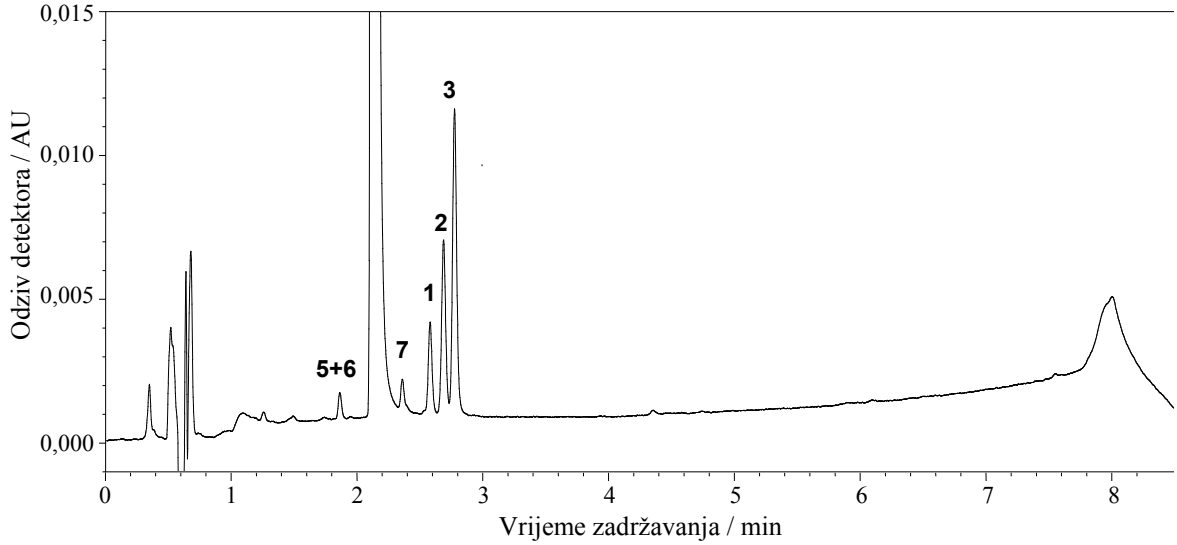
Parametar MS	Vrijednost
Kapilarni napon	3,00 kV
Desolvatacijska temperatura	350 °C
Temperatura ionizacijskog izvora	110 °C
Desolvatacijski protok dušika	700 L h^{-1}
Protok dušika u izvoru	50 L h^{-1}
Raspon masa	(80–1800) Da

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Onečišćenja prisutna u uzorcima 3-brom-5-(trifluormetil)anilina detektirana su i kvantificirana nakon kromatografskog odjeljivanja na analitičkoj koloni tehnikom UHPLC. Pojedini kromatografski parametri su potom prilagođeni analizi tehnikom HPLC i ciljani spojevi su izolirani tehnikom SPE. Tijekom više opetovanih analiza, željena onečišćenja su pohranjena na SPE nosačima i na kraju s njih isprana manjim količinama deuteriranog otapala u NMR cjevčice. Tako pripremljenim otopinama snimljeni su 1D te 2D homo- i heteronuklearni spektri NMR (^{1}H, ^{19}F, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC te ^{1}H-^{13}C HMBC).
U svrhu potpune strukturne identifikacije otopine izoliranih onečišćenja su analizirane i tehnikom MS.

4.1. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom UHPLC

Za kromatografsku analizu uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina razvijena je i optimizirana LC-UV (DAD) metoda temeljena na tehnici UHPLC, analitičkoj koloni s mikronskim česticama (1,7 μm) i gradijentnom načinu elucije kako je opisano u eksperimentalnom dijelu (tablica 11 i tablica 12). Analizirano je nekoliko različitih uzoraka (uzorci **I**, **II** i **III**) koji se razlikuju prema profilu (slika 19 – slika 21) i količini prisutnih onečišćenja (tablica 22 – tablica 24). Uzorak **III** je upareni matični lug koji sadrže karakteristične, vrlo nepolarne spojeve. Udio onečišćenja je računat kao postotak površine kromatografskog pika onečišćenja u odnosu na ukupnu površinu svih detektiranih pikova.

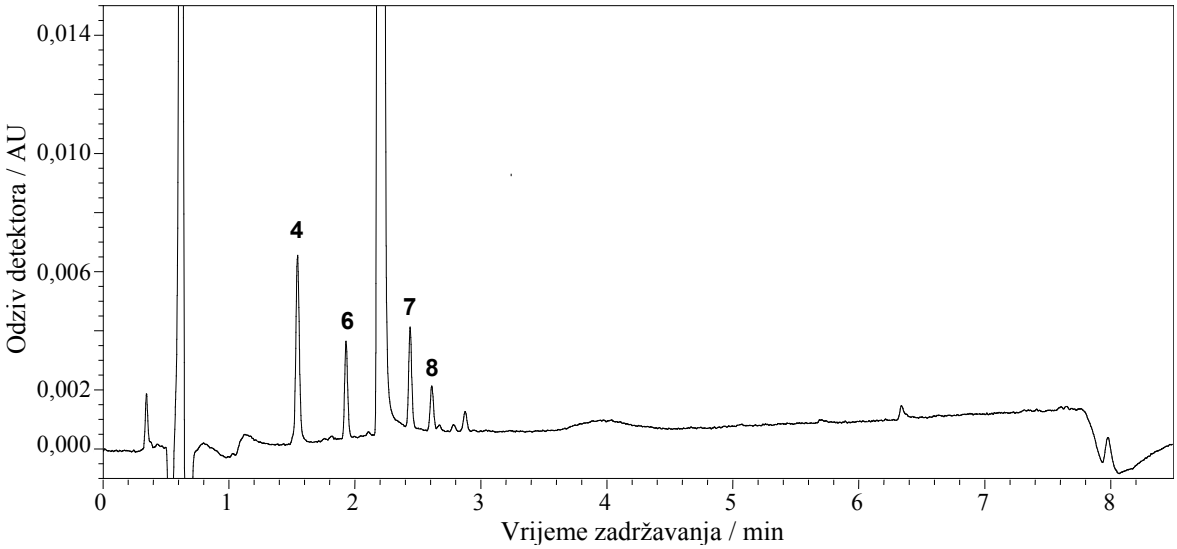


Slika 19. UHPLC-UV-DAD kromatogram uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (masena koncentracija, $\gamma = 0{,}16$ mg mL^{-1}) pri 224 nm.

Tablica 22. Udio onečišćenja u uzorku **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.

Spoj	t_R / min[1]	r^2	Udio / %
1	2,581	1,21	0,37
2	2,668	1,26	0,74
3	2,775	1,31	1,33
5 + 6	1,864	0,87	0,09
7	2,361	1,11	0,11

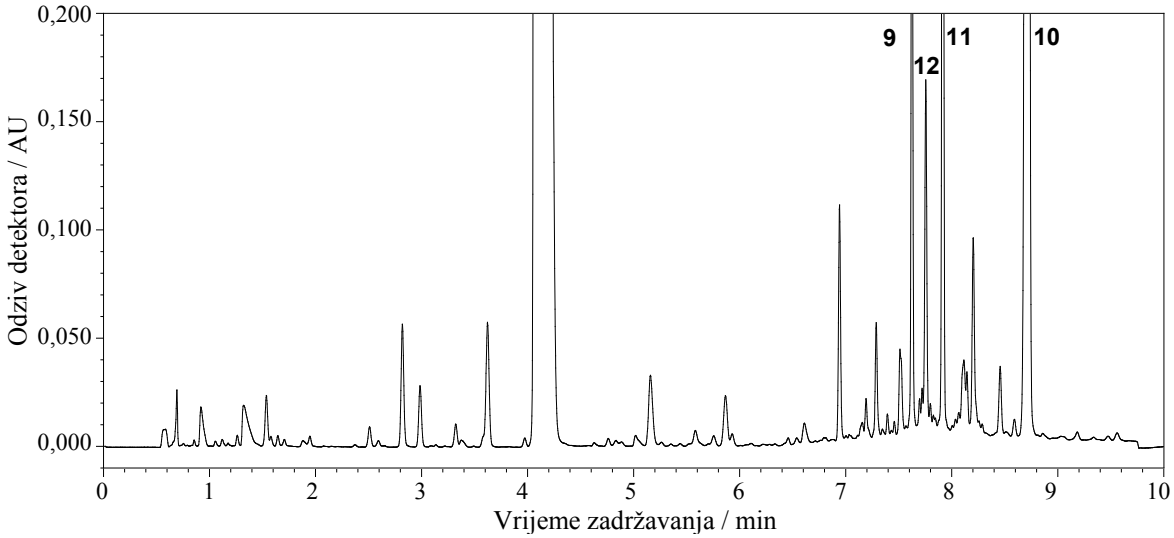
[1] t_R – ukupno vrijeme zadržavanja
[2] r – relativno vrijeme zadržavanja



Slika 20. UHPLC-UV-DAD kromatogram uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (masena koncentracija, $\gamma = 0{,}16$ mg mL^{-1}) pri 224 nm.

Tablica 23. Udio onečišćenja u uzorku **II** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.

Spoj	t_R / min	r	Udio / %
4	1,544	0,70	0,66
6	1,930	0,88	0,28
7	2,438	1,11	0,29
8	2,610	1,19	0,15



Slika 21. UHPLC-UV-DAD kromatogram uzorka **III** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (masena koncentracija, γ = 3,0 mg mL^{-1}) pri 274 nm.

Tablica 24. Udio onečišćenja u uzorku **III** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 274 nm.

Spoj	t_R / min	r	Udio / %
9	7,624	1,87	1,87
10	8,713	2,14	25,28
11	7,915	1,94	3,51
12	7,755	1,90	0,94

4.2. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom semi-preparativne tekućinske kromatografije i spektroskopije NMR

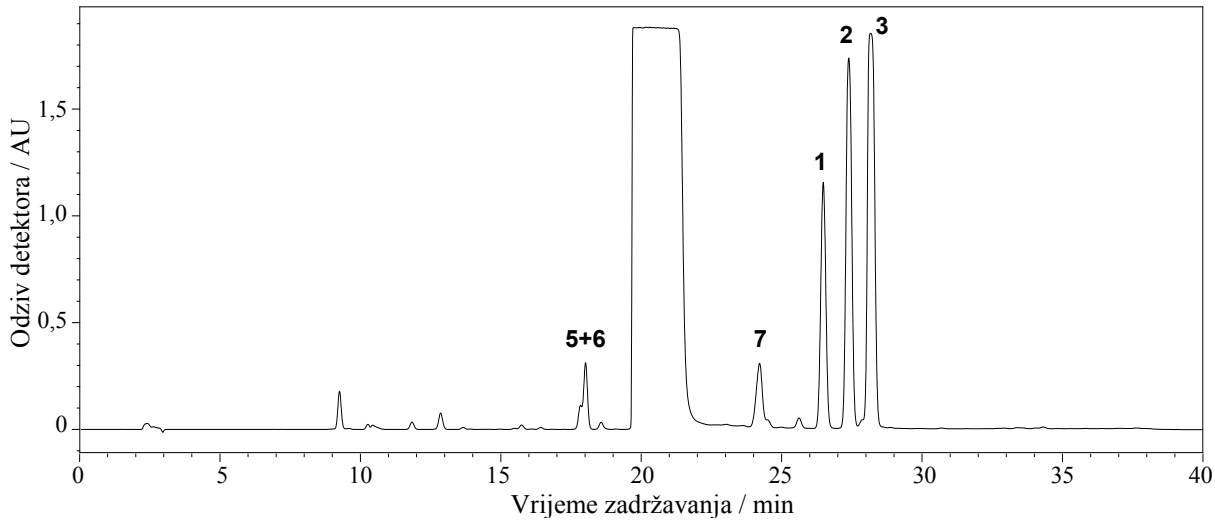
Za izolaciju tri glavna onečišćenja prisutna u uzorku **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina razvijena je i optimizirana LC-UV metoda temeljena na tehnici HPLC, semi-preparativnoj koloni, gradijentnom načinu elucije te uz automatizirano sakupljanje frakcija kako je opisano u eksperimentalnom dijelu (tablica 13 i tablica 14). Nakon višestrukih injektiranja prikupljene frakcije spojeva **1**, **2** i **3** su uparene do suha, otopljene u deuteriranom acetonitrilu i analizirane

tehnikom NMR uz inverznu BBI sondu. ^{1}H (slika 45 i slika 49), COSY (slika 46 i slika 50), ^{1}H-^{13}C HSQC (slika 47 i slika 51) i ^{1}H-^{13}C HMBC (slika 48 i slika 52) spektre NMR bilo je moguće snimiti tek za spojeve **2** i **3** prisutne u uzorku **I** u udjelu od 0,74% odnosno 1,33%.

4.3. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom LC-SPE/NMR

4.3.1. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom sustava LC-SPE

Uzorci **I**, **II** i **III** analizirani su primjenom tehnike LC-SPE uz kromatografske parametre kako je opisano ranije (tablica 15 i tablica 16). Kromatografski parametri ranije korištene tehnike UHPLC su prilagođeni HPLC sustavu u svrhu ostvarivanja ekvivalentne kromatografske slike. Uvedena je HPLC analitička kolona, temperatura kolone je snižena na 50 °C, a protok pokretne faze povećan na 1 mL min^{-1}. Sve navedeno je utjecalo na produljenje ukupnog vremena analize, ali uz nepromijenjen kromatografski profil onečišćenja analiziranih uzoraka (slika 22). Provedena su opetovana injektiranja uzoraka pripravljenih u visokim koncentracijama 3-brom-5-(trifluormetil)anilina i odabrane frakcije su automatiziranim postupkom izdvojene iz eluata nakon silaska s analitičke kolone i prolaska kroz UV detektor. Veći udio polarne komponente pokretne faze ostvaren je dodavanjem vode pomoću dodatne crpke čime je pospješeno zadržavanje spojeva na SPE nosačima. Mogućnost višestruke ekstrakcije na jednom nosaču posljedično je omogućila veću koncentraciju izoliranog spoja. Nakon kromatografske analize i zadržavanja frakcija, SPE nosači su sušeni u struji dušika te su izolirani i ukoncentrirani spojevi s nosača eluirani malom količinom deuteriranog otapala izravno u NMR cjevčice.



Slika 22. HPLC-UV-DAD kromatogram uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (masena koncentracija, γ = 300,0 mg mL^{-1}) pri 224 nm.

4.3.2. Optimizacija sustava SPE

U svrhu optimizacije sustava SPE varirane su vrijednosti ključnih parametara (tablica 17) i evaluirane *S*/*N* vrijednosti odabranih spojeva **1**, **2**, **3** i **7** prisutnih u uzorku **I** nakon 5 injektiranja. Uočeno je da tip nosača SPE, odnosno sorbensa na kojem dolazi do zadržavanja spoja znatno utječe na osjetljivost analize te da su CN i C8 nepokretne faze najneprikladnije vrste nosača za sva 4 odabrana spoja (tablica 25).

Tablica 25. *S*/*N* vrijednosti signala NMR odabranih spojeva na različitim nosačima SPE.

Spoj	***S*/*N* vrijednosti**				
	CN	**C8**	**C18**	**Resin GP**	**Resin SH**
1	4	26	22	26	**32**
2	2	45	47	49	**59**
3	9	91	66	95	**103**
7	3	12	10	9	**14**

Utjecaj protoka poslijekolonskog dodatka vode se pokazao kao parametar koji najviše ovisi o analiziranom spoju, budući da se optimalna vrijednost razlikovala od onečišćenja do onečišćenja (tablica 26).

Tablica 26. *S*/*N* vrijednosti signala NMR odabranih spojeva pri različitim protocima poslijekolonskog dodatka vode.

Spoj	*S*/*N* vrijednosti		
	1 mL min^{-1}	**3 mL min^{-1}**	**4 mL min^{-1}**
1	15	**26**	25
2	**62**	49	45
3	**115**	95	90
7	11	9	**12**

Korištena su dva deuterirana otapala, acetonitril-d_3 i metanol-d_4. Za eluiranje spojeva **1** i **7** učinkovitijim se pokazao acetonitril-d_3, a za spojeve **2** i **3** metanol-d_4, no uz male razlike u *S*/*N* vrijednostima (tablica 27), stoga je acetonitril-d_3 odabran za daljnje eksperimente.

Tablica 27. *S*/*N* vrijednosti signala NMR odabranih spojeva eluiranih različitim deuteriranim otapalom.

Spoj	*S*/*N* vrijednosti	
	CD_3CN	**CD_3OD**
1	**26**	18
2	49	**53**
3	95	**101**
7	**9**	6

Direktna BBO krio-sonda NMR je, u usporedbi s inverznom BBI sondom NMR, za promatrani spoj **7** za sve korištene kolone SPE dala više vrijednosti *S*/*N* (tablica 28).

Tablica 28. *S*/*N* vrijednosti signala NMR spoja **7** snimljenih različitim sondama NMR.

Spoj	Sonda NMR	*S*/*N* vrijednosti				
		CN	**C8**	**C18**	**Resin GP**	**Resin SH**
7	inverzna BBI sonda	3	12	10	9	14
	direktna BBO krio-sonda	**5**	**18**	**15**	**15**	**25**

Evaluacijom rezultata optimizacija SPE parametara uočeno je da optimalna vrijednost parametara varira ovisno o promatranoj molekuli, što znači da bi optimizaciju bilo potrebno provesti za svako onečišćenje od interesa.

4.3.3. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom spektroskopije NMR

Izolirani spojevi eluirani sa SPE nosača deuteriranim otapalom prenešeni su u automatizirani uzorkivač spektrometra NMR te su snimani 1D ^{1}H i ^{19}F i 2D homonuklearni (COSY) i heteronuklearni (^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC) spektri NMR. Na temelju *S*/*N* vrijednosti u ^{1}H spektru NMR izoliranog spoja procijenjena je njegova koncentracija, a time i prikladnost za snimanje 2D spektara. Nakon NMR analiza, otopine spojeva su sačuvane za daljnje eksperimente.

4.4. Analiza uzoraka 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom MS

U svrhu identifikacije i strukturne karakterizacije onečišćenja prisutnih u uzorcima 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, otopine izoliranih spojeva su analizirane i tehnikom MS. Originalna UHPLC metoda je modificirana dodatkom mravlje kiseline kao aditiva kako bi se omogućila ionizacija analita. Prema vremenima zadržavanja LC-MS kromatogrami su usporedivi s izvornom UHPLC metodom. Primjenom vezanog sustava UHPLC-UV-DAD-MS snimljeni su ESI-MS spektri i načinjena je evaluacija izotopnih profila i mogućih fragmentacijskih puteva.

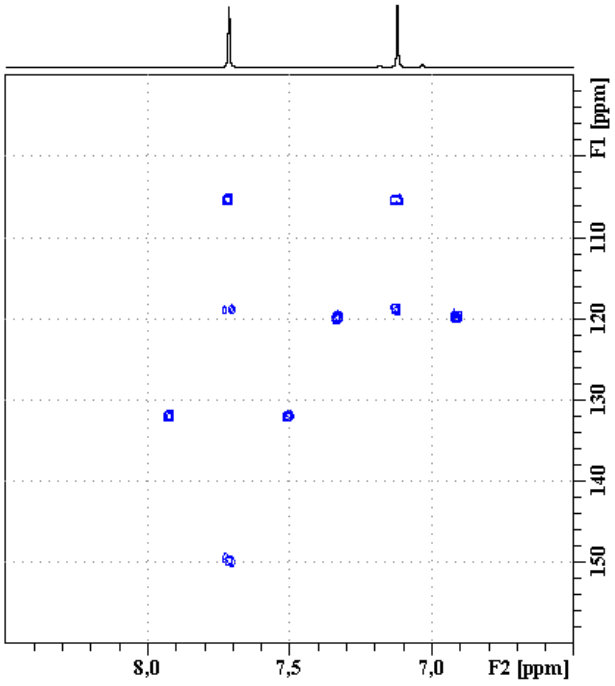
4.5. Identifikacija i strukturna karakterizacija onečišćenja u uzorcima 3-brom-5-(trifluormetil)anilina

*4.5.1. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **1***

Kao najmanje od tri glavna onečišćenja koja eluiraju iza glavnog pika u analiziranom uzorku **I** može se opaziti spoj **1** (slika 19), prisutan u udjelu od 0,37% (tablica 22). Spoj eluira na relativnoj retenciji 1,21 što ukazuje na manju polarnost u usporedbi s glavnom komponentom 3-brom-5-(trifluormetil)anilinom.

U aromatskom dijelu ^{1}H spektra NMR spoja **1** (slika 55) mogu se opaziti dva singleta pri 7,71 ppm i 7,12 ppm, što ukazuje na prisutnost dva protona i posljedično četiri supstituenta na benzenskom prstenu. Dodatno, u ^{1}H spektru NMR se pri 5,18 ppm može uočiti širok singlet s integralom $\approx$ 2 koji vjerojatno pripada protonima amino skupine. U ^{19}F spektru NMR (slika 56) signal opažen pri -61,1 ppm moguće je pripisati trifluormetilnoj skupini spoja **1**. Aromatski protoni pri 7,71 ppm i 7,12 ppm nisu međusobno u sprezi što dokazuje i izostanak korelacija u 2D COSY spektru (slika 57), a posljedica je njihovog položaja na benzenskom

prstenu, odnosno ukazuje da se dva aromatska protona međusobno nalaze u *para*-položaju. Analizom 2D ^{1}H-^{13}C HSQC spektra (slika 58) mogu se uočiti korelacije ugljikovih atoma iz CH skupina i izravno vezanih aromatskih protona. Atom ugljika čiji kemijski pomak je uočen pri 119,6 ppm je u korelaciji s protonom pri 7,12 ppm, a ugljikov atom pri 131,8 ppm sa signalom protona pri 7,71 ppm. U aromatskom dijelu 2D ^{1}H-^{13}C HMBC spektra (slika 23) mogu se uočiti signali kvaternih ugljikovih atoma pri 149,8 ppm, 118,2 ppm i 105,2 ppm. Aromatski proton pri 7,71 ppm je u korelaciji s kvaternim ugljikovim atomom pri 149,8 ppm na koji je vezana amino skupina. Oba aromatska protona pokazuju korelacije s kvaternim atomima ugljika pri 118,2 ppm i 105,2 ppm. Signali kvaternih atoma ugljika C-5 i atoma ugljika iz trifluormetilne skupine nisu uočeni. Asignirane kemijske pomake atoma ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F spoja **1** prikazuje tablica 29.



Slika 23. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **1** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

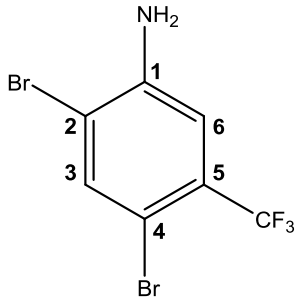
Iz navedenih podataka može se zaključiti da je spoj **1** tetrasupstituirani derivat benzena koji sadrži amino i trifluormetilnu skupinu te dva dodatna supstituenta.

Tablica 29. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **1** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		149,8	
2		118,2	
3	7,71	131,8	
4		105,2	
5		-	
6	7,12	119,6	
NH_2	5,18		
CF_3		-	-61,1

Kako bi se provela potpuna identifikacija onečišćenja **1**, otopina izoliranog spoja je analizirana i tehnikom MS (slika 60). U spektru masa spoja **1** može se opaziti izotopna raspodjela molekulskog iona karakteristična za molekule s dva atoma broma (*m*/*z* 318:320:322 = 1:2:1), te adukt molekulskog iona i acetonitrila istog profila $[M+CH_3CN+H]^+$ (*m*/*z* 359:361:363 = 1:2:1). Prema *m*/*z* vrijednostima te izotopnoj raspodjeli može se zaključiti da su oba dodatna supstituenta na benzenskom prstenu atomi broma.

Evaluacija LC-MS rezultata, asignacija rezonancija u spektrima NMR te analiza korelacijskih signala u HMBC spektru koji daju informacije o relativnom položaju supstituenata na benzenskom prstenu, omogućili su strukturnu identifikaciju spoja **1** (slika 1).[125]

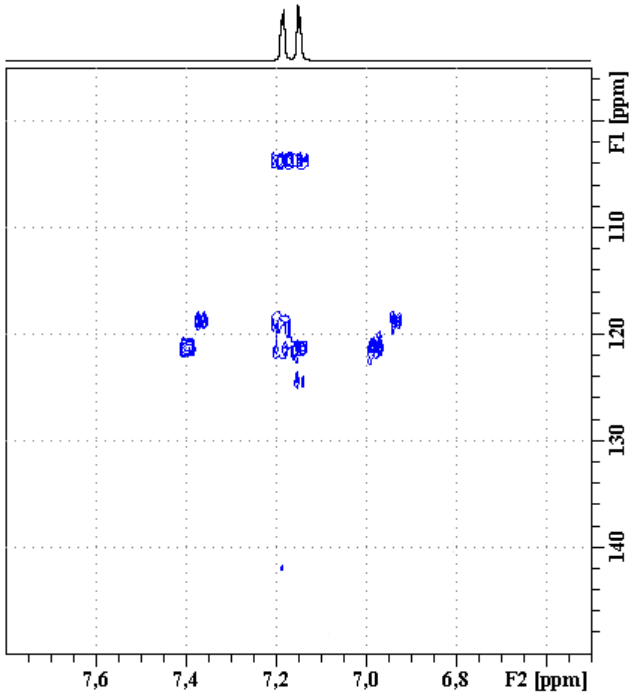


Slika 24. Predložena struktura spoja **1** s označenim brojevima atoma.

*4.5.2. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **2***

Spoj **2** može se opaziti na relativnoj retenciji 1,26 kao srednje od tri glavna onečišćenja koja eluiraju iza glavne komponente u analiziranom uzorku **I** (slika 19) gdje je prisutan u udjelu od 0,74% (tablica 22). Usporedbom vremena elucije 3-brom-5-(trifluormetil)anilina i spoja **2** može se zaključiti da je riječ o srodnoj, manje polarnoj molekuli.

^{1}H spektar NMR spoja **2** (slika 61) u svom aromatskom dijelu sadrži dva dubleta pri 7,18 ppm i 7,15 ppm. Izmjerena konstanta sprege kod oba signala iznosi 2,1 Hz što ukazuje na aromatske protone u međusobnom *meta*-položaju. Nadalje, izvan aromatskog dijela ^{1}H spektra NMR može se opaziti i širok singlet pri 5,07 ppm s integralom ≈ 2 za koji se može pretpostaviti da pripada protonima amino skupine. U ^{19}F spektru NMR (slika 62) uočen je signal pri -63,2 ppm koji se može pripisati trifluormetilnoj skupini. Za snimanje 2D COSY (slika 63) spektra korištena je dodatno ukoncentrirana otopina spoja **2**, a dodatni signali opaženi u spektru ukazuju da su u otopini prisutne primjese drugog spoja. Signali u 2D COSY spektru koji pripadaju spoju **2** potvrđuju korelacije dva aromatska protona u *meta*-položaju. Analizom 2D HSQC spektra (slika 64) dobiveni su podaci o protoniranim ugljikovim atomima pri 121,1 ppm te 118,8 ppm koji su u korelaciji s aromatskim protonima pri 7,18 ppm odnosno 7,15 ppm. Iz 2D HMBC spektra (slika 25) dobiveni su podaci o kemijskim pomacima kvaternih ugljikovih atoma čiji signali su uočeni pri 141,8 ppm, 124,3 ppm, 119,1 ppm i 103,8 ppm. Aromatski proton pri 7,18 ppm je u korelaciji s kvaternim ugljikovim atomima pri 141,8 ppm, 119,1 ppm i 103,8 ppm, a proton pri 7,15 ppm s kvaternim atomima ugljika pri 124,3 ppm i 103,8 ppm, te ugljikovim atomom CH skupine pri 121,1 ppm (tablica 30). U 2D HMBC spektru se ne opaža signal kvaternog atoma ugljika iz trifluormetilne skupine.



Slika 25. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

Dobiveni podaci ukazuju da je spoj **2** tetrasupstituirani derivat benzena koji sadrži amino i trifluormetilnu skupinu te još dva supstituenta.

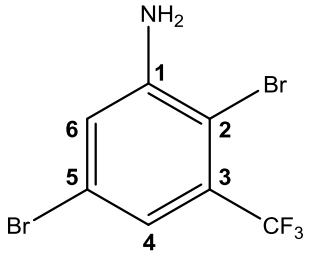
Tablica 30. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		141,8	
2		103,8	
3		124,3	
4	7,18	121,1	
5		119,1	
6	7,15	118,8	
NH_2	5,07		
CF_3		-	-63,2

Kako bi se identificirala dva preostala supstituenta, izolirana smjesa spoja **2** je analizirana i tehnikom MS (slika 66). Molekulski ion opažen u spektru masa spoja **2** je za 80 veći nego u

polaznoj molekuli 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, a izotopna raspodjela molekulskog iona je karakteristična za molekule koje sadrže dva atoma broma (*m*/*z* 318:320:322 = 1:2:1). Manje zastupljen adukt molekulskog iona i acetonitrila pokazuje isti profil $[M+CH_3CN+H]^+$ (*m*/*z* 359:361:363 = 1:2:1). Prema *m*/*z* vrijednostima te izotopnoj raspodjeli može se zaključiti da atomi broma čine dva preostala supstituenta na benzenskom prstenu.

Asignacija prikupljenih 1D i 2D spektara NMR te rezultati LC-MS analize omogućili su identifikaciju supstituenata, određivanje položaja istih na benzenskom prstenu te strukturnu identifikaciju izoliranog onečišćenja spoja **2** (slika 26).[125]

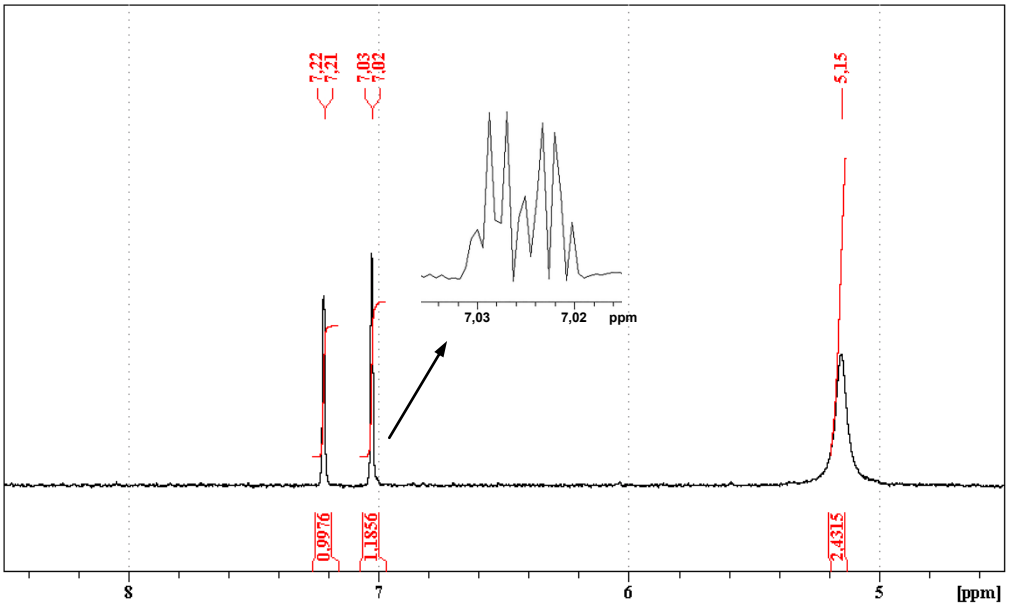


Slika 26. Predložena struktura spoja **2** s označenim brojevima atoma.

*4.5.3. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **3***

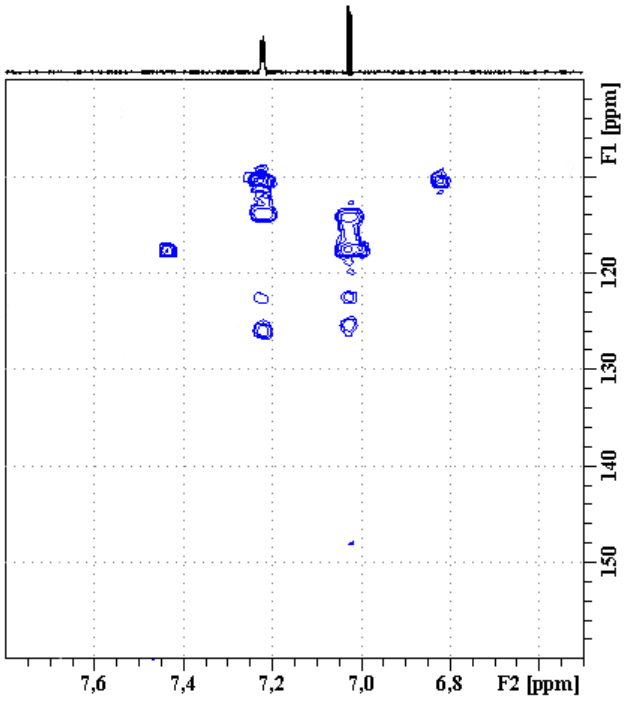
Spoj **3** eluira na relativnoj retenciji 1,31 kao najveće od tri glavna onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina u uzorku **1** (slika 19) s udjelom od 1,33% (tablica 22). Budući da spoj **3**, kao i spojevi **1** i **2**, eluira iza glavne komponente, može se zaključiti da se radi o manje polarnom onečišćenju.

U aromatskom dijelu ^{1}H spektra NMR spoja **3** (slika 27) mogu se uočiti dva multipleta pri 7,22 – 7,21 ppm i 7,03 – 7,02 ppm koji odgovaraju signalima dva protona i ukazuju da spoj **3** ima četiri supstituenta na benzenskom prstenu. Dodatno, u ^{1}H spektru NMR se pri 5,15 ppm može opaziti širok singlet s integralom ≈ 2 koji vjerojatno pripada protonima amino skupine. ^{19}F spektar NMR (slika 67) sadrži jedan signal pri -63,8 ppm koji se može pripisati trifluormetilnoj skupini. Korelacije u 2D COSY spektru (slika 68) ukazuju da su dva aromatska protona u *meta*-položaju jedan naspram drugog. Detaljnom analizom multipleta u ^{1}H spektru NMR može se zaključiti da se signali aromatskih protona cijepaju u dublete zbog međusobne *meta*-sprege, a dubleti se potom potom cijepaju u kvartete zbog sprege s atomima fluora iz trifluormetilne skupine. Takav uzorak cijepanja signala u ^{1}H spektru NMR spoja **3** ukazuje da su oba aromatska protona susjedna trifluormetilnoj skupini.



Slika 27. Spektar ^{1}H NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K. Umetak prikazuje karakterističnо cijepanje signala aromatskih protona 7,03 – 7,02 ppm u kvartet dubleta zbog sprege s atomima fluora iz CF_3 skupine.

Analizom 2D HSQC spektara omogućena je neupitna asignacija protoniranih atoma ugljika, a iz 2D HMBC spektra je dobivena informacija o kvaternim ugljikovim atomima. U 2D HSQC spektru spoja **3** (slika 69) prisutna su dva signala koja odgovaraju atomima ugljika CH skupina. Signal ugljika pri 117,2 ppm je u korelaciji s aromatskih protonom pri 7,22 – 7,21 ppm dok je signal ugljikovog atoma pri 109,9 ppm u korelaciji s aromatskim protonom pri 7,03 – 7,02 ppm. U aromatskom dijelu 2D HMBC spektra (slika 28) mogu se opaziti korelacije između aromatskog protona pri 7,22 – 7,21 ppm s kvaternim ugljikovim atomima pri 125,9 ppm i 113,7 ppm, te ugljikovim atomom CH skupine pri 109,9 ppm. Aromatski proton pri 7,03 – 7,02 ppm također pokazuje korelacije s kvaternim aromatskim atomima ugljika koji se mogu opaziti pri 125,9 ppm i 113,7 ppm, te dodatno s kvaternim ugljikovima atomima pri 147,9 ppm, 116,4 ppm i 115,4 ppm (tablica 31).



Slika 28. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

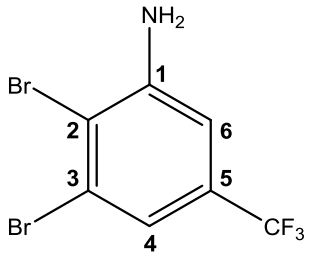
Gore navedeni podaci ukazuju da je spoj **3** tetrasupstituirani derivat benzena koji sadrži amino skupinu, trifluormetilnu skupinu kojoj su susjedna dva aromatska protona, te dva dodatna supstituenta.

Tablica 31. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		147,9	
2		113,7	
3		115,4	
4	7,22 – 7,21	117,2	
5		125,9	
6	7,03 – 7,02	109,9	
NH_2	5,15		
CF_3		116,1	-63,8

Tehnikom MS provedena je potpuna identifikacija spoja **3**. U spektru masa analizirane otopine spoja **3** (slika 71) može se uočiti 1:2:1 izotopna raspodjela molekulskog iona koja odgovara ionima *m*/*z* 318, 320 i 322, a karakteristična je za molekule koje sadrže dva atoma broma. Adukt molekulskog iona i acetonitrila $[M+CH_3CN+H]^+$ (*m*/*z* 359:361:363 = 1:2:1) također odgovara tom izotopnom profilu i potvrđuje pretpostavku da su dva preostala supstituenta na benzenskom prstenu upravo atomi broma.

Rezultati dobiveni tehnikom LC-MS, asignacija signala u 1D i 2D spektrima NMR te analiza korelacijskih signala u HMBC spektru omogućili su strukturnu identifikaciju izoliranog onečišćenja **3** čiju strukturu prikazuje slika 29.[125]



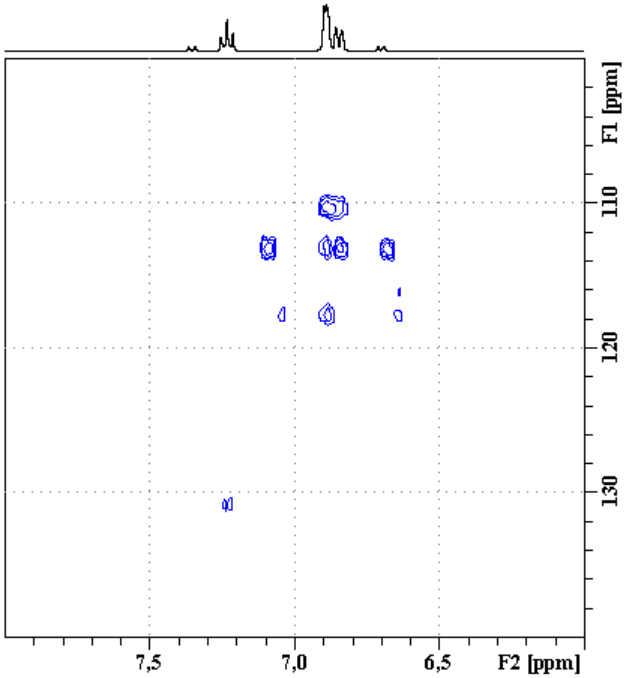
Slika 29. Predložena struktura spoja **3** s označenim brojevima atoma.

*4.5.4. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **4***

Analizom uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom UHPLC (slika 20) na relativnoj retenciji 0,70 može se opaziti spoj **4** kao dominantno onečišćenje u iznosu 0,66% (tablica 23). Budući da eluira prije glavne komponente može se zaključiti da se radi o polarnijoj molekuli.

^{1}H spektar NMR spoja **4** (slika 72) u svom aromatskom dijelu sadrži triplet pri 7,23 ppm te multiplet pri 6,90 – 6,84 ppm, pri čemu je omjer integrala površina ispod tripleta i multipleta ≈ 1:3. Iz podataka o procijenjenom broju atoma vodika može se pretpostaviti prisustvo četiri aromatska protona, od kojih se signali tri aromatska protona preklapaju. Izmjerena konstanta sprege na signalu tripleta iznosi 8,2 Hz i ukazuje na *orto*-spregu aromatskih protona. Izvan aromatskog područja ^{1}H spektra NMR može se opaziti širok singlet pri 4,47 ppm koji vjerojatno pripada protonima amino skupine. U ^{19}F spektru NMR spoja **4** (slika 73) može se uočiti signal pri -63,4 ppm i pripisati trifluormetilnoj skupini. Kako multiplet u ^{1}H spektru NMR spoja **4** čine preklopljeni signali tri aromatska protona, daljnja strukturna karakterizacija bila bi nemoguća bez analize 2D spektara NMR. Korelacije u 2D COSY spektru (slika 74) pokazuju spregu između signala tripleta i multipleta, točnije protona pri 7,23 ppm i 6,90 ppm, no još korisniji podaci prikupljeni su analizom 2D HSQC spektra. U

2D HSQC spektru spoja **4** (slika 75) mogu se opaziti korelacije atoma ugljika CH skupina pri 110,2 ppm i 113,0 ppm sa signalima dva aromatska protona iz multipleta, oba pri 6,90 ppm te ugljikovog atoma pri 117,6 ppm i izravno vezanog aromatskog protona pri 6,84 ppm koji se izdvaja iz multipleta. Može se uočiti i korelacija atoma ugljika CH skupine pri 129,8 ppm s aromatskim protonom pri 7,23 ppm. U HMBC spektru (slika 30) mogu se uočiti dva signala kvaternih atoma ugljika pri 148,6 ppm i 130,7 ppm koji su u korelaciji s aromatskim protonom pri 7,23 ppm (tablica 32). Nažalost, u 2D HMBC spektru se ne opaža signal kvaternog atoma ugljika iz trifluormetilne skupine.



Slika 30. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **4** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

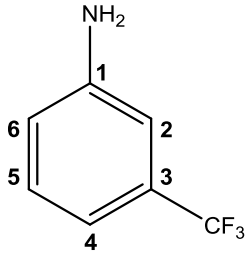
Na temelju navedenih podataka, može se zaključiti da je spoj **4** disupstituirani derivat benzena koji sadrži amino i trifluormetilnu skupinu.

Tablica 32. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **4** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		148,6	
2	6,90	110,2	
3		130,7	
4	6,90	113,0	
5	7,23	129,8	
6	6,84	117,6	
NH_2	4,47		
CF_3		-	-63,4

MS analiza korištena je kako bi se potvrdila hipoteza o disupstituiranom benzenu i omogućila identifikacija onečišćenja **4**. Za razliku od ostalih do sada analiziranih onečišćenja, spektar masa analizirane otopine spoja **4** (slika 77) ne pokazuje izotopnu raspodjelu molekulskog iona karakterističnu za brom. Molekulski ion može se uočiti pri *m*/*z* vrijednosti 162, a vidljiv je i adukt molekulskog iona i acetonitrila $[M+CH_3CN+H]^+$ pri *m*/*z* vrijednosti 203 čime je potvrđeno da osim amino i trifluormetilne skupine nema dodatnih supstituenata na benzenskom prstenu.

Na temelju asigniranih kemijskih pomaka ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F i rezultata LC-MS analize predložena je struktura izoliranog spoja **4** (slika 31).



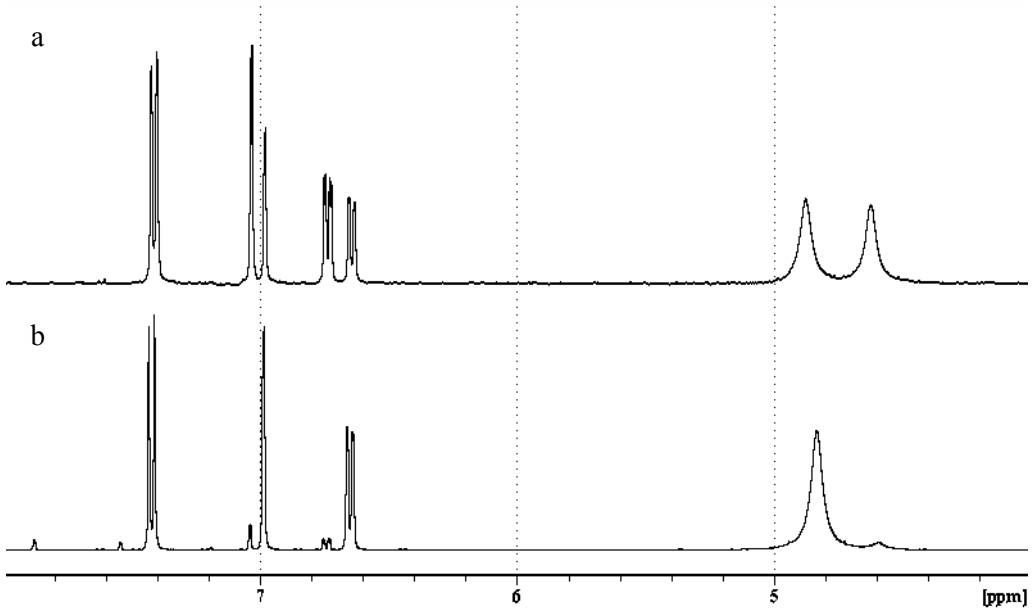
Slika 31. Predložena struktura spoja **4** s označenim brojevima atoma.

*4.5.5. Identifikacija i strukturna karakterizacija spojeva **5** i **6***

Na relativnoj retenciji 0,87 (slika 19) u analiziranom uzorku **I** može se uočiti ko-elucija najmanje dva onečišćenja u udjelu od 0,09% (tablica 22). Retencijsko vrijeme na kojem spojevi eluiraju ukazuje na neznatno veću polarnost u usporedbi s glavnom komponentom, a

sama ko-elucija na potencijalnu sličnost struktura. Na početku evaluacije podataka pretpostavljeno je da su u izoliranoj smjesi prisutna dva onečišćenja, spoj **5** i spoj **6**.

Analiza uzorka **II** u kojem je prisutan samo spoj **6** (slika 20) u udjelu od 0,28% (tablica 23), omogućila je izdvajanje podataka koji se odnose na spoj **5** iz dobivenih spektara NMR smjese spojeva izolirane iz uzorka **I**. Slika 32a prikazuje ^{1}H spektar NMR smjese spojeva **5** i **6** s intenzivnijim signalima spoja **5**, te ^{1}H spektar NMR spoja **6** (slika 32b) u kojem je spoj **5** prisutan kao onečišćenje, sa signalima vrlo niskog intenziteta.



Slika 32. Spektri ^{1}H NMR smjese spojeva **5** i **6** (a) te spoja **6** (b) u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

U aromatskom dijelu ^{1}H spektra NMR spoja **5** (slika 78) mogu se opaziti tri signala; dublet pri 7,41 ppm, dublet pri 7,03 ppm, te dublet dubleta pri 6,73 ppm kao posljedica prisutnosti tri aromatska protona što ukazuje da spoj **5** ima tri supstituenta na benzenskom prstenu. Također, pri 4,62 ppm u ^{1}H spektru NMR može se opaziti širok singlet s integralom ≈ 2 koji vjerojatno pripada protonima amino skupine. Signali aromatskih protona spoja **5** pri 7,41 ppm i 6,73 ppm su pocijepani u dublete s konstantom sprege od 8,7 Hz što ukazuje na međusobni *orto*-položaj. Signal protona pri 6,73 ppm se dalje cijepa u dublet dubleta *meta*-spregom s protonom pri 7,03 ppm s manjom konstantom sprege od 2,7 Hz koja se može uočiti kod oba protona. Analizom aromatskog dijela ^{1}H spektra NMR spoja **6** (slika 79) također se mogu opaziti tri signala; dublet pri 7,41 ppm, dublet pri 6,98 ppm, te dublet dubleta pri 6,64 ppm koji odgovaraju signalima tri protona i ukazuju da i spoj **6** ima tri supstituenta na benzenskom prstenu. Dodatno, u ^{1}H spektru NMR spoja **6** može se uočiti i širok singlet pri 4,82 ppm čiji

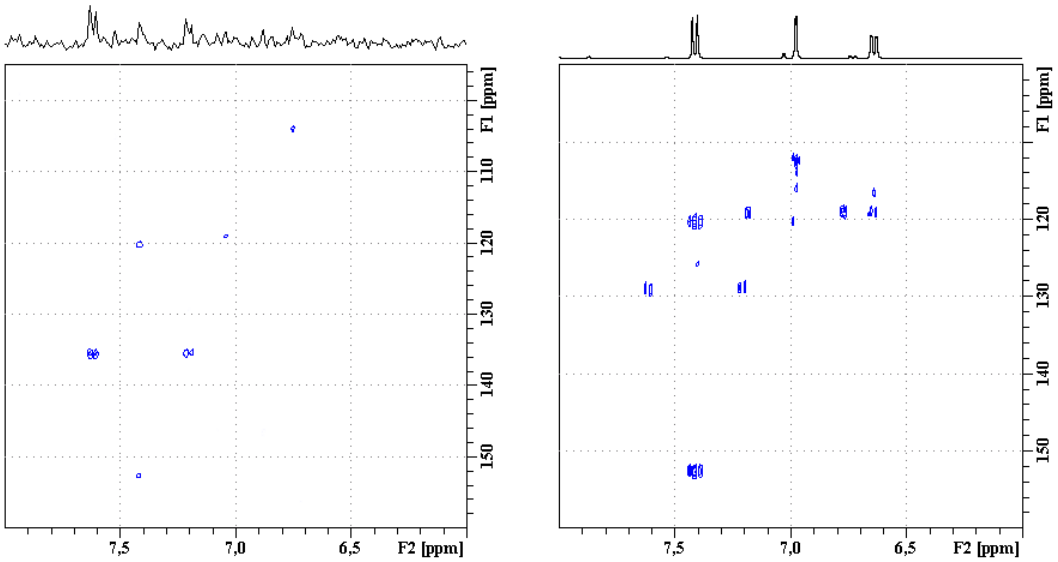
integral iznosi ≈ 2 i za koji se također može pretpostaviti da pripada protonima amino skupine. Analizom signala pri 6,64 ppm u ^{1}H spektru NMR spoja **6** može se zaključiti da je signal tog aromatskog protona pocijepan u dublet zbog sprege sa susjednim protonom pri 7,41 ppm u *orto*-položaju uz konstantu sprege koja iznosi 8,7 Hz, a dalje se cijepa u dublet dubleta *meta*-spregom s protonom opaženim pri 6,98 ppm uz konstantu sprege od 1,9 Hz. Aromatski proton pri 6,98 ppm se cijepa u dublet s izmjerenom konstantom sprege od 1,9 Hz (*meta*-sprega), a signal protona pri 7,41 ppm u dublet uz konstantu sprege od 8,7 Hz.

U ^{19}F spektru NMR spojeva **5** i **6** (slika 80) se signali opaženi pri -63,2 ppm i -60,6 ppm mogu pripisati dvjema trifluormetilnim skupinama. U ^{19}F spektru NMR spoja **6** (slika 81) je uočen intenzivan signal pri -60,6 ppm koji se može pripisati trifluormetilnoj skupini spoja **6**, što znači da signal opažen u ^{19}F spektru NMR smjese spojeva pri -63,2 ppm pripada trifluormetilnoj skupini spoja **5**.

Korelacije u 2D COSY spektrima spojeva **5** i **6** (slika 82 i slika 83) potvrđuju sprege opažene u ^{1}H spektrima NMR spojeva **5** i **6**. Analizom HSQC spektra dobiveni su podaci o protoniranim ugljikovim atomima, a u kombinaciji s HMBC spektrom i podaci o kvaternim ugljikovim atomima. U 2D HSQC spektru spoja **5** (slika 84) opažaju se korelacije između aromatskog protona pri 7,41 ppm koji je vezan na ugljikov atom pri 135,4 ppm, protona pri 7,03 ppm s ugljikom CH skupine pri 113,2 ppm, te korelacija protona pri 6,73 ppm s atomom ugljika pri 118,8 ppm. U 2D HSQC spektru spoja **6** (slika 85) prisutna su tri signala koja odgovaraju korelacijama aromatskih protona i ugljikovih atoma CH skupina. Mogu se opaziti korelacije između aromatskog protona pri 7,41 ppm s atomom ugljika pri 128,8 ppm, protona pri 6,98 ppm s ugljikom pri 119,0 pm, te protona pri 6,64 ppm koji je u korelaciji s ugljikovim atomom pri 111,9 ppm.

Analizom aromatskog dijela 2D HMBC spektra spoja **5** (slika 33a) uočeni su signali kvaternih ugljikovih atoma pri 152,7 ppm, 120,3 ppm i 103,8 ppm. Može se opaziti da je aromatski proton pri 7,41 ppm u korelaciji s kvaternim ugljikovim atomima pri 120,3 i 152,7 ppm, aromatski proton pri 7,03 ppm s atomom ugljika CH skupine pri 118,8 ppm, a proton pri 6,73 ppm je u korelaciji s kvaternim ugljikovim atomom pri 103,8 ppm (tablica 33). U 2D HMBC spektru spoja **5** se ne opaža signal kvaternog atoma ugljika iz trifluormetilne skupine. U 2D HMBC spektru spoja **6** (slika 33b) uočeni su signali kvaternih ugljikovih atoma pri 116,0 ppm, 120,2 ppm, 125,7 ppm i 152,5 ppm. Analizom 2D HMBC spektra spoja **6** može se uočiti korelacija aromatskog protona pri 7,41 ppm s atomom ugljika CH skupine pri 119,0

ppm i kvaternim ugljikovim atomima pri 125,7 te 152,5 ppm. Aromatski proton pri 6,98 ppm je u korelaciji s atomom ugljika pri 111,9 ppm i kvaternim ugljikovim atomima pri 116,0 ppm i 120,2 ppm, kao i proton pri 6,64 ppm koji pokazuje dodatnu korelaciju s CH atomom ugljika pri 119,0 ppm (tablica 33).



a b

Slika 33. Spektri ^{1}H-^{13}C HMBC NMR smjese spojeva **5** i **6** (a) i spoja **6** (b) u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

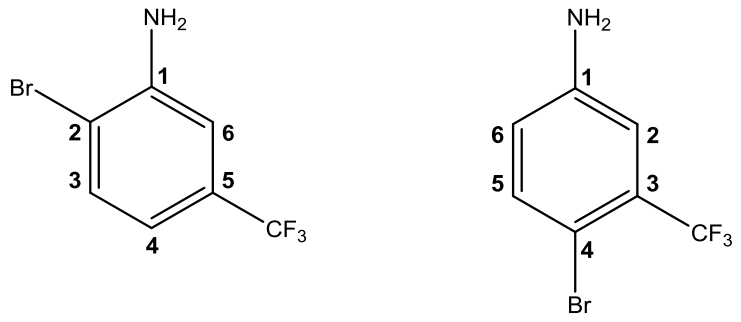
Tablica 33. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spojeva **5** i **6** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	spoj **5** δ / ppm			spoj **6** δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		152,7			152,5	
2		103,8		6,98	119,0	
3	7,41	135,4			125,7	
4	6,73	118,8			116,0	
5		120,3		7,41	128,8	
6	7,03	113,2		6,64	111,9	
NH_2	4,62			4,82		
CF_3		-	-63,2		120,2	-60,6

Iz navedenih podataka može se zaključiti da su oba spoja, spoj **5** i spoj **6** trisupstituirani derivati benzena koji sadrže amino i trifluormetilnu skupinu.

Kako bi se upotpunili podaci prikupljeni spektroskopijom NMR, za analizu otopina izolirane smjese spojeva **5** i **6** i otopine izoliranog spoja **6** korištena je i tehnika MS (slika 87 i slika 89). Izotopna raspodjela molekulskog iona kromatografskih pikova koji potječu od spojeva **5** i **6** karakteristična je za molekule s jednim atomom broma (*m*/*z* 240:242 = 1:1), a može se opaziti i adukt molekule i acetonitrila $[M+CH_3CN+H]^+$ (*m*/*z* 281:283 = 1:1), te najvjerojatnija fragmentacija u vidu eliminacije atoma broma (*m*/*z* 240:242 → *m*/*z* 161). Prema *m*/*z* vrijednostima te izotopnoj raspodjeli nema razlike između MS spektara spojeva **5** i **6**, te glavne komponente 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (slika 53) što ukazuje na mogućnost regio-izomerije.

Na temelju asigniranih signala u spektrima NMR i korelacija u HMBC spektrima koje su omogućile određivanje položaja supstituenata na benzenskom prstenu, te rezultata LC-MS analize, predložene su strukture izoliranih onečišćenja spojeva **5** i **6** (slika 34a i b).



a b

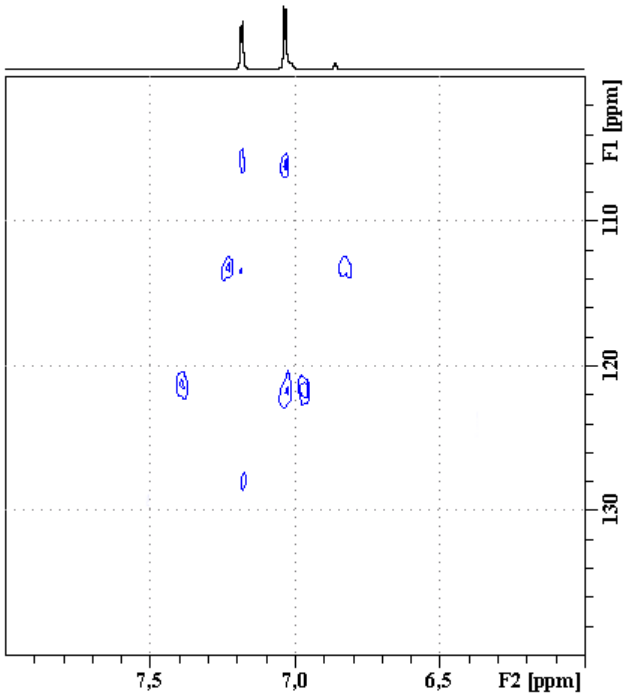
Slika 34. Predložene strukture spojeva **5** (a) i **6** (b) s označenim brojevima atoma.

4.5.6. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja 7

Tik iza glavnog pika, u repu glavne komponente u analiziranim uzorcima **I** i **II** se pri relativnoj retenciji 1.11 može opaziti spoj **7** (slika 19 i slika 20). Spoj **7** je u uzorku **II** prisutan u udjelu od 0,29% (tablica 23).

U aromatskom dijelu ^{1}H spektra NMR spoja **7** (slika 90) mogu se uočiti dva dubleta pri 7,18 ppm i 7,03 ppm. Konstanta sprege za oba signala iznosi 2,7 Hz i ukazuje na *meta*-položaj aromatskih protona koji potvrđuju i korelacije opažene u 2D COSY spektru (slika 92). Dodatan, zasjenjeniji signal u ^{1}H spektru NMR nalazi se izvan aromatskog područja, pri 4,73 ppm. Radi se o širokom singletu s integralom ≈ 2 koji se može pripisati protonima amino

skupine. Signal pri -63,5 ppm koji se može uočiti u ^{19}F spektru NMR (slika 91) vjerojatno pripada trifluormetilnoj skupini spoja **7**. U 2D HSQC spektru (slika 93) mogu se uočiti signali protoniranih ugljikovih atoma CH skupina i izravno vezanih aromatskih protona, pa se tako može opaziti ugljikov atom pri 113,2 ppm u korelaciji s aromatskim protonom pri 7,03 ppm, te atom ugljika pri 121,3 ppm koji je u korelaciji s aromatskim protonom pri 7,18 ppm. Analizom aromatskog dijela 2D HMBC spektra (slika 35), pri 106,0 ppm, 125,5 ppm i 127,9 ppm uočeni su signali koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima. Nažalost, signal četvrtog kvaternog atoma ugljika na koji je vezana amino skupina nije opažen u 2D HMBC spektru. Može se uočiti da su oba aromatska protona u korelaciji s kvaternim ugljikovim atomima pri 125,5 ppm i 106,0 ppm, dok je s kvaternim ugljikovim atomom pri 127,9 ppm u korelaciji samo aromatski proton pri 7,18 ppm. Nažalost, u 2D HMBC spektru se ne opaža signal kvaternog atoma ugljika iz trifluormetilne skupine. Kemijske pomake atoma ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F spoja **7** prikazuje tablica 34.



Slika 35. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **7** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

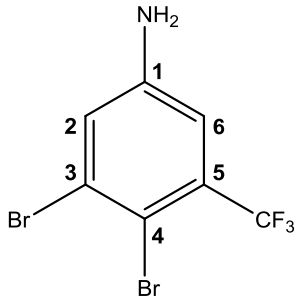
Iz priloženih podataka proizlazi da je spoj **7** tetrasupstituirani derivat benzena čija su dva supstituenta amino i trifluormetilna skupina.

Tablica 34. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **7** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		-	
2	7,03	113,2	
3		125,5	
4		106,0	
5		127,9	
6	7,18	121,3	
NH_2	4,73		
CF_3		-	-63,5

Kako bi se identificirala dva preostala supstituenta na benzenskom prstenu, izolirana otopina spoja **7** nakon kromatografskog odjeljivanja analizirana je i upotrebom tehnike MS (slika 95). U spektru masa spoja **7** može se uočiti molekulski ion i njegova izotopna raspodjela koji ukazuju na postojanje dva atoma broma u molekuli (*m*/*z* 318:320:322 = 1:2:1). Adukt molekulskog iona i acetonitrila pokazuje isti izotopni profil $[M+CH_3CN+H]^+$ (*m*/*z* 359:361:363 = 1:2:1). Prema opaženim *m*/*z* vrijednostima te izotopnoj raspodjeli može se zaključiti da su dva preostala supstituenta na benzenskom prstenu atomi broma.

Podaci prikupljeni iz 1D i 2D spektara NMR, te rezultati analize tehnikom LC-MS dali su uvid u prirodu supstituenata benzenskog prstena spoja **7** i određivanje položaja istih, te omogućili strukturnu karakterizaciju izoliranog onečišćenja **7** (slika 36).

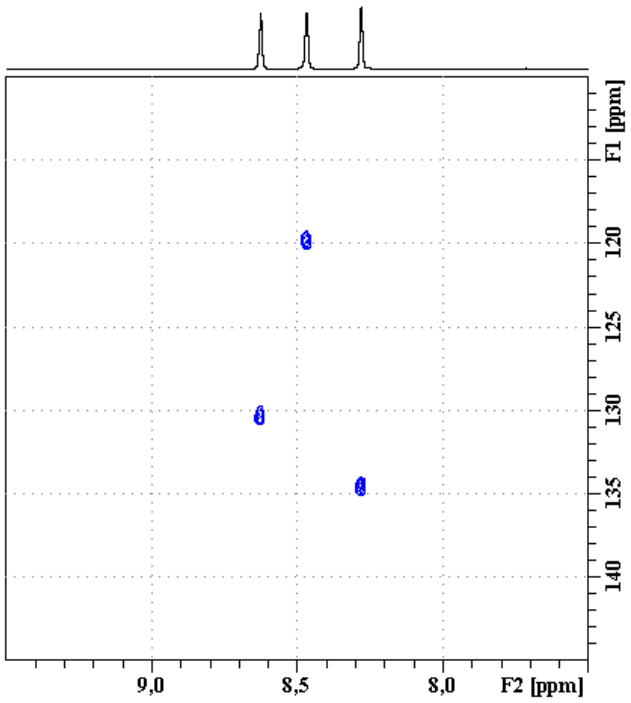


Slika 36. Predložena struktura spoja **7** s označenim brojevima atoma.

*4.5.7. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **8***

Spoj **8** u odnosu na glavnu komponentu 3-brom-5-(trifluormetil)anilin eluira na relativnoj retenciji 1,19 (slika 20), a može se uočiti u uzorku **II** u udjelu od 0,15% (tablica 23).

U aromatskom dijelu ^{1}H spektra NMR spoja **8** (slika 96) mogu se opaziti tri singleta pri 8,63 ppm, 8,47 ppm i 8,28 ppm. Omjer integrala površina ispod signala opaženih aromatskih protona iznosi ≈ 1:1:1. Valja istaknuti da se izvan aromatskog područja ^{1}H spektra NMR ne opažaju nikakvi dodatni signali. Analizom 2D COSY spektra (slika 98) jasno su uočljive međusobne korelacije sva tri aromatska protona što ukazuje na međusobne *meta*-položaje. Analizom 2D HSQC spektra spoja **8** (slika 37) mogu se opaziti korelacije atoma ugljika CH skupine pri 134,5 ppm i signala aromatskog protona pri 8,28 ppm, ugljikovog atoma pri 130,3 ppm i aromatskog protona pri 8,63 ppm te atoma ugljika pri 119,8 ppm i aromatskog protona pri 8,47 ppm.



Slika 37. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **8** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

Nažalost, koncentracija spoja **8** u izoliranoj otopini nije bila dovoljna da bi se snimio i 2D HMBC spektar zbog čega izostaju podaci o kvaternim ugljikovim atomima spoja **8**. U ^{19}F spektru NMR (slika 97) moguće je uočiti signal pri -63,5 ppm koji se može pripisati trifluormetilnoj skupini spoja **8**. Kemijske pomake atoma ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F spoja **8** koje je bilo moguće asignirati prikazuje tablica 35.

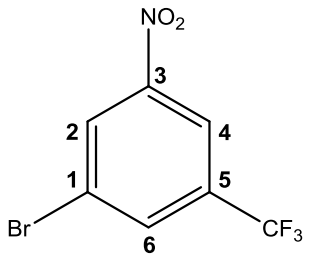
Navedeni podaci ukazuju da je spoj **8** trisupstituirani derivat benzena koji sadrži trifluormetilnu skupinu te tri aromatska protona koji se međusobno nalaze u *meta*-položaju.

Tablica 35. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **8** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		-	
2	8,63	130,3	
3		-	
4	8,47	119,8	
5		-	
6	8,28	134,5	
CF_3		-	-63,5

Kako bi se prikupili dodatni podaci potrebni za strukturnu karakterizaciju, otopina izoliranog spoja **8** analizirana je i tehnikom MS (slika 100). U spektru masa spoja **8** se uočava signal pri *m*/*z* vrijednosti 276:278 te izotopna raspodjela karakteristična za molekule s jednim atomom broma (≈ 1:1), čime je određen drugi supstituent na benzenskom prstenu. S obzirom na vrijednost *m*/*z* moguć je nastanak iona gubitkom kisika i adicijom natrija, $[M\text{-}O+Na]^{+}$. Na temelju predložene ionske vrste i slabog intenziteta prilikom pozitivne ionizacije može se pretpostaviti da bi treći supstituent benzenskog prstena spoja **8** mogla biti nitro skupina. Takvu pretpostavku potvrđuje poznavanje sintetskog puta koji se koristi prilikom priprave glavnog spoja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina budući da posljednji korak čini redukcija nitro skupine spoja 1-brom-3-nitro-5-(trifluormetil)benzena do amino skupine (slika 54). Toj hipotezi u prilog ide i izostanak signala amino skupine u ^{1}H spektru NMR.

Na temelju informacija dobivenih iz spektara NMR te rezultata analize tehnikom LC-MS pretpostavljeni su supstituenti i njihov položaj na benzenskom prstenu što je omogućilo strukturnu identifikaciju izoliranog onečišćenja spoja **8** (slika 38).

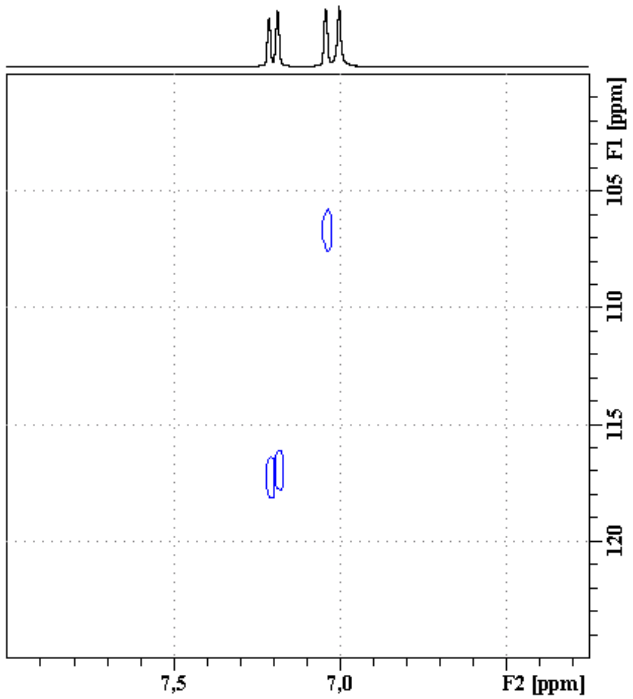


Slika 38. Predložena struktura spoja **8** s označenim brojevima atoma.

*4.5.8. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **9***

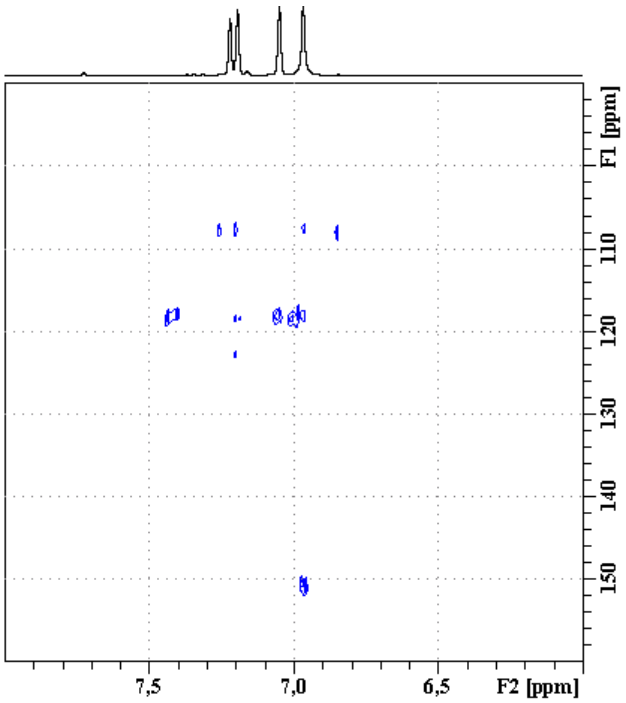
Spoj **9** prvi je od kasno eluirajućih spojeva uočenih u uzorku **III** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina. Prema ranije opisanoj metodi UHPLC (tablica 12) spoj **9** eluira na relativnoj retenciji 1,87 (slika 21) s udjelom od 1,87% (tablica 24). Budući da spoj **9**, kao i spojevi **10**, **11** i **12**, eluira iza glavne komponente uz znatan udio acetonitrila u pokretnoj fazi, može se zaključiti da se radi o vrlo nepolarnom onečišćenju.

U ^{1}H spektru NMR spoja **9** (slika 101) mogu se uočiti četiri singleta pri 7,21 ppm, 7,18 ppm, 7,04 ppm i 7,00 ppm pri čemu je omjer integrala ispod površina ≈ 1:1:1:1. ^{19}F spektar NMR (slika 102) sadrži jedan signal pri -63,6 ppm koji se može pripisati trifluormetilnoj skupini. Korelacije u 2D COSY spektru (slika 103) ukazuju na međusobni *meta*-položaj aromatskih protona pri 7,21 ppm, 7,18 ppm i 7,04 ppm. Analizom 2D HSQC spektara omogućena je asignacija protoniranih atoma ugljika, a iz 2D HMBC spektra je dobivena informacija o kvaternim ugljikovim atomima. U 2D HSQC spektru spoja **9** (slika 39) prisutna su tri signala koja odgovaraju atomima ugljika CH skupina. Signal ugljika pri 118,6 ppm je u korelaciji s aromatskim protonom pri 7,21 ppm, signal ugljikovog atoma pri 118,1 ppm s aromatskim protonom pri 7,18 ppm dok je signal ugljika pri 108,0 ppm u korelaciji s aromatskim protonom pri 7,04 ppm. Proton pri 7,00 ppm ne pokazuje korelacije u HSQC spektru što bi moglo ukazivati na prisutnost NH skupine.



Slika 39. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **9** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

U 2D HMBC spektru (slika 40) mogu se opaziti korelacije između aromatskog protona pri 7,21 ppm s kvaternim ugljikovim atomima pri 123,4 ppm, 119,2 ppm i 106,7 ppm. Aromatski proton pri 7,18 ppm također daje korelacije s kvaternim atomima ugljika koji se mogu opaziti pri 119,2 ppm i 106,7 ppm. Može se opaziti i korelacija protona pri 7,00 ppm pripisanog NH skupini s kvaternim atomom ugljika pri 106,7 ppm. Navedene kemijske pomake atoma ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F spoja **9** prikazuje tablica 36.



Slika 40. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **9** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

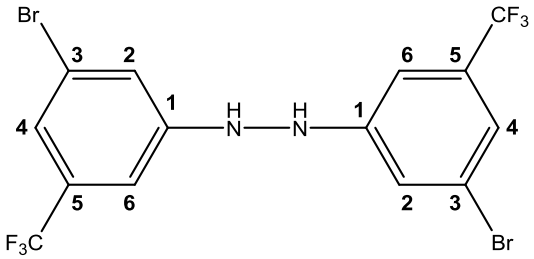
Gore navedeni podaci ukazuju da spoj **9** sadrži tri različita supstituenta na benzenskom prstenu od čega jednu trifluormetilnu skupinu, a tri opažena protona su u međusobnom *meta*-položaju.

Tablica 36. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **9** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		150,1	
2	7,04	108,0	
3		123,4	
4	7,21	118,6	
5		119,2	
6	7,18	118,1	
NH	7,00		
CF_3		106,7	-63,6

Kako bi se identificirali preostali supstituenti na benzenskom prstenu spoja **9** korištena je tehnika MS. U spektru masa analizirane otopine spoja **9** (slika 105) uz pozitivnu ionizaciju, može se uočiti 1:2:1 izotopna raspodjela molekulskog iona koja odgovara ionima *m*/*z* 477, 479 i 481, a karakteristična je za molekule koje sadrže dva atoma broma. Opaža se i najvjerojatnija fragmentacija u vidu eliminacije jednog atoma broma (*m*/*z* 398:400 = 1:1) te dodatan ion, također s jednim atomom broma (*m*/*z* 239:241 = 1:1). Upravo su spomenuti fragmenti dali ključnu informaciju o potencijalno simetričnoj, hidrazinskoj strukturi.

Analiza tehnikom LC-MS, te asignacija signala u spektrima NMR uz analizu korelacija u HMBC spektru na temelju koje su određeni položaji supstituenata na benzenskom prstenu, omogućili su strukturnu identifikaciju izoliranog onečišćenja **9** kao simetrične molekule kako prikazuje slika 41.



Slika 41. Predložena struktura spoja **9** s označenim brojevima atoma.

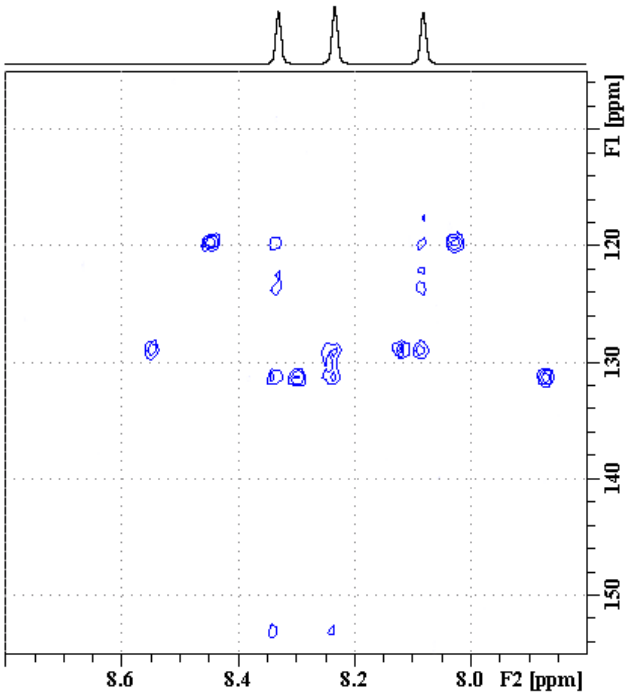
*4.5.9. Identifikacija i strukturna karakterizacija spoja **10***

Spoj **10** može se opaziti na relativnoj retenciji 2,14 kao posljednje od kasno eluirajućih spojeva uočenih u uzorku **III** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (slika 21) gdje je prisutan u znatnom udjelu (tablica 24). Usporedbom vremena izlaženja spojeva **9** i **10**, može se zaključiti da je spoj **10** nepolarnije onečišćenje (slika 104).

U aromatskom dijelu ^{1}H spektra NMR spoja **10** (slika 106) mogu se uočiti tri singleta pri 8,33 ppm, 8,23 ppm i 8,08 ppm s omjerima integrala ≈ 1:1:1. ^{19}F spektar NMR sadrži dva signala različitih intenziteta pri -63,4 ppm i -63,8 ppm koji se mogu pripisati trifluormetilnim skupinama (slika 107). Signal većeg intenziteta pri -63,4 ppm može se pripisati trifluormetilnoj skupini spoja **10** dok signal pri -63,8 ppm vjerojatno potječe od onečišćenja prisutnog u uzorku izoliranog spoja **10** čiji signali se opažaju i u ^{1}H spektru NMR. Korelacije u 2D COSY spektru (slika 108) ukazuju da su aromatski protoni u *meta*-položaju jedan naspram drugog. Analizom 2D HSQC spektra spoja **10** (slika 109) omogućena je neupitna asignacija protoniranih atoma ugljika, budući da se opažaju tri signala koja odgovaraju atomima ugljika CH skupina. Signal ugljika pri 129,0 ppm je u korelaciji s aromatskim

protonom pri 8,33 ppm, signal ugljikovog atoma pri 119,7 ppm u korelaciji s aromatskim protonom pri 8,23 ppm, a signal ugljika pri 131,3 ppm je u korelaciji s aromatskih protonom pri 8,08 ppm. Iz 2D HMBC spektra je dobivena informacija o kvaternim ugljikovim atomima. U aromatskom dijelu 2D HMBC spektra (slika 42) mogu se opaziti korelacije između aromatskog protona pri 8,33 ppm i kvaternih ugljikovih atoma pri 153,0 ppm, 123,4 ppm i 122,0 ppm, te ugljikovih atoma CH skupina pri 131,3 ppm i 119,7 ppm. Aromatski proton pri 8,23 ppm pokazuje HMBC korelacije s kvaternim aromatskim atomom ugljika koji se može opaziti pri 153,0 ppm, te dodatno s ugljikovim atomima CH skupina pri 131,3 ppm i 129,0 ppm. U spektru također postoje korelacije aromatskog protona pri 8,08 ppm s kvaternim aromatskim atomima ugljika pri 123,4 ppm, 122,0 ppm i 117,6 ppm te ugljikovim atomima CH skupina pri 129,0 ppm i 119,7 ppm.

Kemijske pomake atoma ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F spoja **10** prikazuje tablica 37.



Slika 42. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **10** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

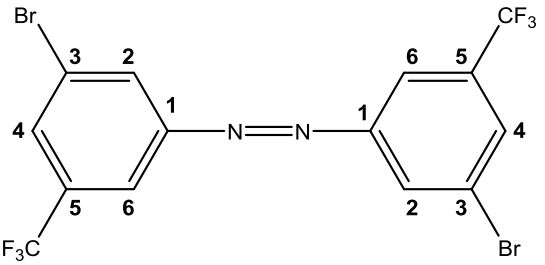
Navedeni podaci ukazuju da spoj **10** sadrži tri različita supstituenta na benzenskom prstenu. Jedan supstituent je trifluormetilna skupina kojoj su susjedna dva aromatska protona, a sva tri opažena aromatska protona su u međusobnom *meta*-položaju.

Tablica 37. ^{1}H, ^{13}C i ^{19}F kemijski pomaci spoja **10** u acetonitrilu-d_3 pri sobnoj temperaturi.

Atom / Skupina	δ / ppm		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		153,0	
2	8,33	129,0	
3		122,0	
4	8,08	131,3	
5		123,4	
6	8,23	119,7	
CF_3		117,6	-63,4

Kako bi se identificirali preostali supstituenti na benzenskom prstenu, izolirana otopina spoja **10** je analizirana i upotrebom tehnike MS. U spektru masa analizirane otopine spoja **10** uz negativnu ionizaciju (slika 111) mogu se uočiti tri skupine signala s 1:2:1 izotopnom raspodjelom koja je karakteristična za molekule koje sadrže dva atoma broma. Najviše je zastupljena molekulska vrsta koja se može uočiti pri *m*/*z* 475:477:479, a djelomično se preklapa s manje zastupljenim skupinom pri 474:476:478 (slika 112). Pri višim *m*/*z* vrijednostima opaža se skupina signala pri 489:491:493. Manja osjetljivost pri negativnoj ionizaciji otežala je određivanje molekulskog iona, no može se pretpostaviti da dvije opažene skupine pri vrijednostima *m*/*z* 474:476:478 i *m*/*z* 475:477:479 odgovaraju neutralnoj, odnosno negativno nabijenoj molekuli, dok je adukt pri *m*/*z* 489:491:493 mogao nastati gubitkom skupine CF_3 i adicijom acetonitrila i aniona mravlje kiseline iz pokretne faze. Uočeni signali MS ukazuju da se radi o molekuli koja sadrži dva atoma broma te moguće dvije trifluormetilne skupine.

Evaluacija rezultata dobivenih tehnikom LC-MS, te asignacija signala u spektrima NMR i analiza korelacija u HMBC spektru ukazuju da je spoj **10** simetrični azo derivat polaznog 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (slika 43).



Slika 43. Predložena struktura spoja **10** s označenim brojevima atoma.

4.6. Usporedba semi-preparativne tekućinske kromatografije i tehnike LC-SPE: prednosti vezanog sustava LC-SPE/krio-NMR

U ovom radu su prikazana dva različita načina izolacije, semi-preparativna kromatografija i tehnika LC-SPE, u svrhu strukturne identifikacije nepoznatih onečišćenja spoja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina. Semi-preparativnu kromatografiju karakterizira jednostavnija instrumentacija te mogućnost izolacije veće količine onečišćenja, uz uvjet da je onečišćenje prisutno u uzorku u prihvatljivoj količini. No, parametri poput utroška otapala, vremena trajanja analize, ekološke prihvatljivosti i zahtjevnosti obrade izoliranih frakcija tehniku LC-SPE čine boljim odabirom. Na primjeru izolacije onečišćenja prisutnog u uzorku 3-brom-5-(trifluormetil)anilina na razini od 0,5% te semi-preparativnih i LC-SPE metoda opisanih ranije (tablica 13 i tablica 15), načinjena je usporedba utroška organske pokretne faze i vremena potrebnog za izolaciju (tablica 38).

Tablica 38. Usporedba cijene i vremena trajanje analize prilikom izolacije 0,5% onečišćenja pomoću semi-preparativne kromatografije i tehnike LC-SPE.

	Analiza	**Broj injektiranja**	**Utrošak CH_3CN po analizi**	**Cijena CH_3CN po izolaciji**	**Trajanje izolacije**
semi-prep LC[1]	30 min	50	15 L	1450 HRK	25 h
LC-SPE[2]	20 min	15	0,1 L	14,5 HRK	4 h

[1] uz protok pokretne faze od 20 mL min^{-1} i volumen injektiranja od 1500 μL

[2] uz protok pokretne faze od 1 mL min^{-1} i volumen injektiranja od 15 μL

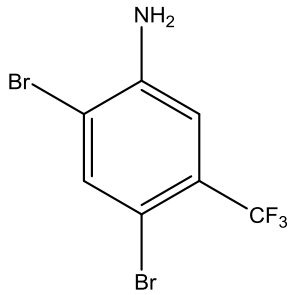
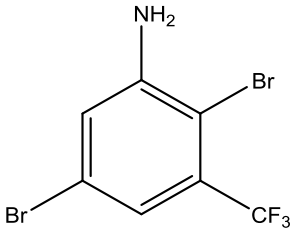
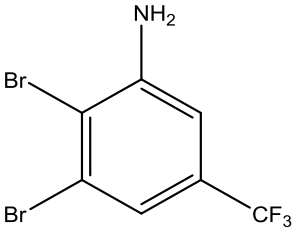
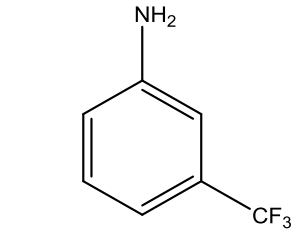
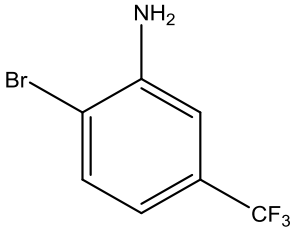
Primjenom tehnike LC-SPE/NMR moguće je izolirati, načiniti strukturnu karakterizaciju i identificirati onečišćenja na vrlo niskim razinama (< 0,10%). Primjerice, uspješno identificirani ko-eluirajući spojevi **5** i **6** su u uzorku **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina prisutni na razini od samo 0.09%. Efikasnost analize ovisi i o optimizaciji SPE parametara te fizikalno-kemijskim karakteristikama samog onečišćenja, s obzirom na zadržavanje na SPE koloni te topljivost u deuteriranim otapalima koja se koriste za eluiranje sa SPE nosača.

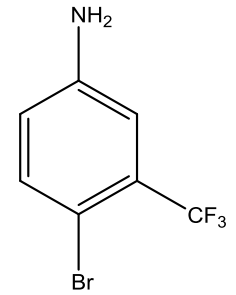
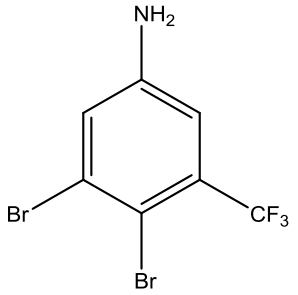
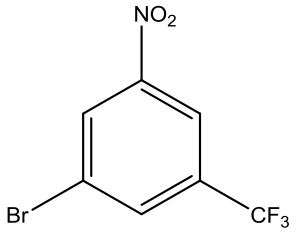
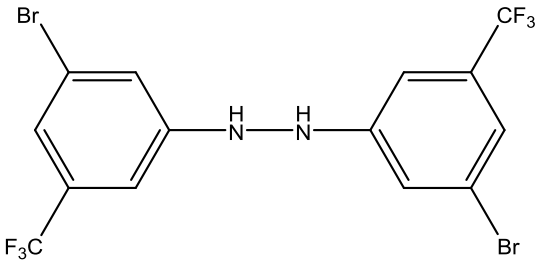
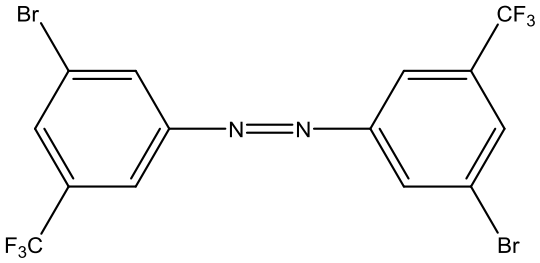
Optimizacija SPE parametara je načinjena usporedbom *S*/*N* vrijednosti za spojeve **1**, **2**, **3** i **7** prisutne u uzorku **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom različitih kolona SPE, protoka poslijekolonskog dodatka vode, različitih deuteriranih otapala te inverzne BBI sonde odnosno direktne BBO krio-sonde NMR (tablica 17). Iz rezultata (tablica 25 – tablica 28) se može uočiti neprikladnost CN skupine nosača SPE i visokog poslijekolonskog protoka vode

(4 mL min^{-1}). Vrijednosti ostalih istraženih parametara su se pokazale više ili manje povoljnima ovisno o promatranom spoju. Primjerice, deuterirani metanol se za spojeve **2** i **3** pokazao kao bolje otapalo za ispiranje SPE nosača, no razlika *S*/*N* vrijednosti u usporedbi s deuteriranim acetonitrilom nije znatna. Naprotiv, *S*/*N* vrijednosti za spoj **1** su primjenom deuteriranog acetonitrila veće gotovo za 50%. Primjena direktne BBO krio-sonde NMR, u usporedbi s inverznom BBI sondom NMR, dala je više vrijednosti *S*/*N* za promatrani spoj **7**, kod svih korištenih vrsta kolona SPE. Iz navedenog se može zaključiti da se optimizacija SPE parametara može provesti brzo i jednostavno, uz manji broj injektiranja, no kako optimalna vrijednost parametara ovisi o pojedinom spoju, optimizaciju je potrebno provesti zasebno za svako onečišćenje od interesa.

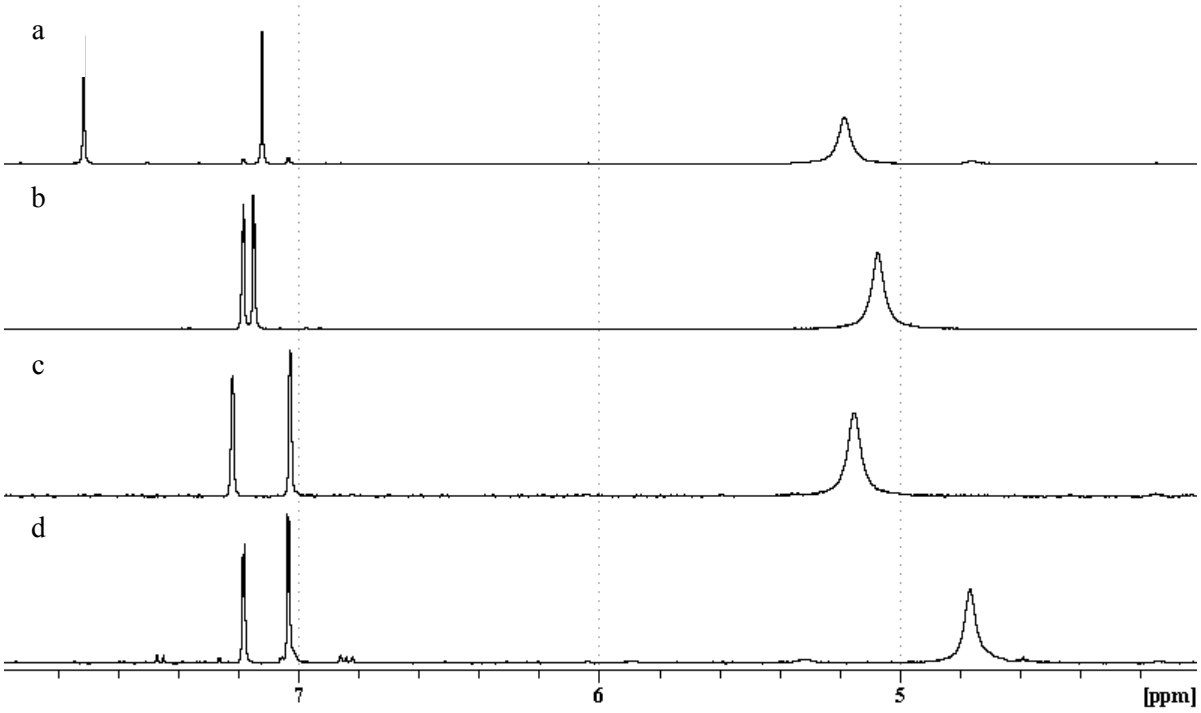
Strukturna karakterizacija onečišćenja izoliranih tehnikom LC-SPE provedena je primjenom spektroskopije NMR te spektrometrije masa. Snimljeni su i analizirani ^{1}H i ^{19}F 1D te 2D homo- i heteronuklearni spektri NMR (COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC) izoliranih onečišćenja. Na temelju prikupljenih podataka predložene su strukture izoliranih procesnih onečišćenja **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** i **10** kako je opisano u poglavlju 4.5 te sumarno prikazano niže (tablica 39).

Tablica 39. Predložene strukture procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.

Oznaka spoja	Struktura	Ime
1		2,4-dibrom-5-(trifluormetil)anilin
2		2,5-dibrom-3-(trifluormetil)anilin
3		2,3-dibrom-5-(trifluormetil)anilin
4		3-(trifluormetil)anilin
5		2-brom-5-(trifluormetil)anilin

Oznaka spoja	Struktura	Ime
6		4-brom-3-(trifluormetil)anilin
7		3,4-dibrom-5-(trifluormetil)anilin
8		1-brom-3-nitro-5-(trifluormetil)benzen
9		1,2-bis(3-brom-5-(trifluormetil)fenil)hidrazin
10		1,2-bis(3-brom-5-(trifluormetil)fenil)diazen

Usporedbom spektara ^{1}H NMR dibrom onečišćenja **1**, **2**, **3** i **7** (slika 44) mogu se uočiti male razlike u kemijskim pomacima protona amino skupine, utjecaj atoma broma na kemijske pomake aromatskih protona te cijepanje uslijed sprege s atomima fluora. Najveći kemijski pomak promatranih aromatskih protona (7,71 ppm) opaža se kod spoja **1** i jezgre smještene između dva atoma broma (slika 24) koji svojom elektronegativnošću doprinose odsjenjenju, odnosno gdje prevladava induktivni efekt. Spoj **3** karakterizira kvartet dubleta aromatskog protona nastao cijepanjem signala zbog utjecaja susjedne trifluormetilne skupine.



Slika 44. Spektri ^{1}H NMR spojeva **1** (a), **2** (b), **3** (c) i **7** (d) u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

Predložena struktura spoja **4** opisuje desbrom onečišćenje, spojevi **5** i **6** regio-izomere istraživane molekule, a spoj **8** je identificiran kao polazni spoj 1-brom-3-nitro-5-(trifluormetil)benzen prema sintetskom putu priprave 3-brom-5-(trifluormetil)anilina (slika 103). Predložene strukture spojeva **9** i **10** su hidrazinski i azo derivat 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.

Osim navedenih spojeva, iz uzoraka **I**, **II** i **III** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, primjenom tehnike LC-SPE pokušalo se izolirati još sedam drugih onečišćenja. Zbog vrlo malih količina onečišćenja u dostupnim uzorcima (< 0,1%) i moguće nestabilnosti pojedinih spojeva nije ih bilo moguće izolirati u količini koja bi omogućila snimanje 2D spektara NMR, a samim time asignaciju signala NMR, strukturnu karakterizaciju te identifikaciju nepoznatih spojeva.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada detektirana su nepoznata procesna onečišćenja prisutna u različitim uzorcima 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, polaznog materijala u sintezi djelatnih tvari. Korištena je metoda UHPLC, uspoređene su izolacijske tehnike semi-preparativne tekućinske kromatografije i tehnike LC-SPE te je načinjena strukturna karakterizacija izoliranih onečišćenja snimanjem i analizom 1D ^{1}H, ^{19}F te 2D homo- i heteronuklearnih spektara NMR (COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC), uz mjerenja tehnikom MS u svrhu potvrde predloženih strukturnih formula.

Procesna onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina detektirana su tehnikom UHPLC u tri uzorka, dva uzorka čistog spoja (uzorci **I** i **II**) te uzorku uparenog matičnog luga (uzorak **III**). Prilikom analize uzorka **III** tehnikom UHPLC uočeni su kasno eluirajući, nepolarni spojevi te je izvorni gradijentni program izmijenjen dodatkom visokog udjela acetonitrila u sastavu pokretne faze. Usporedba izolacijskih metoda načinjena je na spojevima **1**, **2** i **3** uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina. Tehnika LC-SPE/NMR uspješno je primijenjena na spojevima detektiranima u sva tri uzorka i na temelju analize snimljenih spektara NMR i dodatnih podataka dobivenih primjenom tehnike MS predložene su strukture izoliranih onečišćenja.

Primjenom semi-preparativne tekućinske kromatografije izolirani su spojevi **1**, **2** i **3**, no ^{1}H, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC i ^{1}H-^{13}C HMBC spektre NMR bilo je moguće snimiti tek za spojeve **2** i **3** prisutne u uzorku **I** u udjelu od 0,74% odnosno 1,33%. Time je potvrđen ranije iznesen zaključak da je uvjet uspješne izolacije semi-preparativnom kromatografijom prihvatljiva količina onečišćenja u uzorku. Za ovdje primijenjenu metodu semi-preparativne tekućinske kromatografije može se procijeniti da bi izolacija biti uspješna za onečišćenja prisutna u količini iznad 0,5%. Upravo je na primjeru izolacije onečišćenja prisutnog u uzorku 3-brom-5-(trifluormetil)anilina na razini od 0,5% načinjena usporedba utroška organske pokretne faze i vremena potrebnog za izolaciju semi-preparativnom i LC-SPE metodom opisanima u ovom radu. Pokazalo se da je za jednu izolaciju kod tehnike LC-SPE potrebno upotrijebiti sto puta manje acetonitrila nego kod semi-preparativne kromatografije, a ukupno vrijeme potrebno za izolaciju je kraće više od šest puta. Faktor uštede vremena i novca, te

sveukupni utjecaj potrošnje organskih otapala na okoliš čine tehniku LC-SPE mnogo prihvatljivijim izborom metode izolacije nepoznatih onečišćenja.

Optimizacija SPE parametara je načinjena usporedbom *S*/*N* vrijednosti za spojeve **1**, **2**, **3** i **7** prisutne u uzorku **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom različitih kolona SPE, protoka poslijekolonskog dodatka vode, različitih deuteriranih otapala te inverzne BBI sonde NMR odnosno direktne BBO krio-sonde NMR. Evaluacijom rezultata optimizacija SPE parametara uočeno je da optimalna vrijednost parametara varira ovisno o promatranoj molekuli, što znači da je optimizaciju potrebno provesti za svako onečišćenje od interesa. Direktna BBO krio-sonda NMR je, u usporedbi s inverznom BBI sondom NMR, za sve korištene kolone SPE dala više vrijednosti *S*/*N* za promatrani spoj **7** i time opravdala primjenu u većini eksperimenata LC-SPE/NMR u ovom radu.

Vezani sustav LC-SPE/NMR s krio-sondom uspješno je primijenjen za brzu izolaciju i identifikaciju nepoznatih procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina iz uzoraka **I**, **II** i **III**. Onečišćenja su nakon razdvajanja tekućinskom kromatografijom eluirana na nosače SPE. Opetovanim analizama su količine spojeva na nosačima umnogostručene i nakon sušenja u struji dušika s nosača eluirane malom količinom deuteriranog otapala. Takvim otopinama su snimljeni 1D i 2D spektri NMR te spektri MS. Iz aromatskih područja ^{1}H spektara NMR dobivene su informacije o broju i okolini aromatskih protona, široki singleti nižih kemijskih pomaka su ukazali na postojanje protona amino skupina, a korelacije u spektru COSY na međusobne odnose opaženih aromatskih protona. Na temelju ^{19}F spektara NMR dokazana je prisutnost trifluormetilne skupine. Analizom ^{1}H-^{13}C HSQC spektra dobiveni su podaci o protoniranim ugljikovim atomima, a u kombinaciji s analizom ^{1}H-^{13}C HMBC spektara i podaci o kvaternim ugljikovim atomima te relativnom položaju supstituenata na benzenskom prstenu.

Kao rezultat evaluacije spektroskopskih i spektrometrijskih mjerenja predložene su strukture izoliranih spojeva **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** i **10** (tablica 39). Iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina izolirani su spojevi **1**, **2**, **3** i **7**, te smjesa spojeva **5** i **6**. Iz uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina izolirani su spojevi **4**, **6** i **8**, a iz uzorka **III** spojevi **9** i **10**. Budući da je spoj **5** uočen u uzorku **I** u smjesi sa spojem **6** u udjelu od 0,09%, njegova struktura je predložena temeljem izdvajanja podataka koji se odnose na spoj **6** iz spektara NMR smjese spojeva **5** i **6**. Osim navedenih spojeva, primjenom tehnike LC-SPE pokušalo se izolirati još sedam drugih onečišćenja iz uzoraka **I**, **II** i **III** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, no

izolirane količine nisu bile dovoljne da se omogući snimanje 2D spektara NMR. Zbog vrlo malih količina onečišćenja u dostupnim uzorcima (< 0,1%) i moguće nestabilnosti pojedinih spojeva nije ih bilo moguće izolirati u dovoljnoj količini da se omogući snimanje 2D spektara NMR.

Predložene strukture izoliranih procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina opisuju dibrom onečišćenja (spojevi **1**, **2**, **3** i **7**), desbrom onečišćenje (spoj **4**) te regioizomere istraživane molekule (spojevi **5** i **6**). Prema poznatoj reakciji dobivanja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina, spoj **8** je identificiran kao polazni spoj 1-brom-3-nitro-5-(trifluormetil)benzen. Predložene strukture spojeva **9** i **10** su dibenzenski hidrazinski i azo derivat polazne komponente vjerojatno nastali kao nusprodukti reakcije redukcije nitro skupine 1-brom-3-nitro-5-(trifluormetil)benzena.

Provedeno istraživanje obuhvatilo je razvoj i primjenu tekućinske kromatografije i ekstrakcije na čvrstoj fazi potpomognute spektroskopijom NMR te tehnikom MS za identifikaciju i određivanje struktura niskih razina (do 0,09%) onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina. Uspoređena je učinkovitost odjeljivanja i izolacije onečišćenja semi-preparativnom tekućinskom kromatografijom te vezanim sustavom LC-SPE. Uspješna primjena vezanog sustava LC-SPE/NMR primjer je suvremenog pristupa strukturnoj karakterizaciji i identifikaciji vrlo niskih razina onečišćenja. Smatra se da će rezultati provedenog istraživanja doprinijeti razvoju bržih i učinkovitijih metoda izolacije i identifikacije spojeva u farmaceutskim sirovinama i aktivnim farmaceutskim sastojcima.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

6.1. Popis oznakâ izoliranih spojeva

Oznakâ spoja	Ime
1	2,4-dibrom-5-(trifluormetil)anilin
2	2,5-dibrom-3-(trifluormetil)anilin
3	2,3-dibrom-5-(trifluormetil)anilin
4	3-(trifluormetil)anilin
5	2-brom-5-(trifluormetil)anilin
6	4-brom-3-(trifluormetil)anilin
7	3,4-dibrom-5-(trifluormetil)anilin
8	1-brom-3-nitro-5-(trifluormetil)benzen
9	1,2-bis(3-brom-5-(trifluormetil)fenil)hidrazin
10	1,2-bis(3-brom-5-(trifluormetil)fenil)diazen

6.2. Popis kraticâ

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
API	*Active Pharmaceutical Ingredient*	Djelatna tvar / Aktivni farmaceutski sastojak
APT	*Attached Proton Test*	1D tehnika NMR
BBI	*Broad Band Inverse*	Širokopojasna inverzna sonda NMR
CASE	*Computer-Assisted Structure Elucidation*	Računalni program za predviđanje strukture
CE	*Capillary Electrophoresis*	Kapilarna elektroforeza
COSY	*Correlation Spectroscopy*	Homonuklearna tehnika NMR

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
D	-	Period detekcije kod dvodimenzijskih tehnika spektroskopije NMR
DAD	*Diode Array Detector*	Apsorpcijski detektor s nizom fotodioda
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*	1D tehnika NMR
E	-	Period evolucije kod dvodimenzijskih tehnika spektroskopije NMR
ESI	*Electrospray Ionization*	Ionizacija elektroraspršenjem
FDA	*Food and Drug Administration*	Američka agencija za hranu i lijekove
FID	*Free Induction Decay*	Slobodno opadanje magnetizacije
FT	*Fourier transform*	Fourierova transformacija
GC	*Gas Chromatography*	Plinska kromatografija
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*	Heteronuklearna tehnika NMR
HMQC	*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*	Heteronuklearna tehnika NMR
HOSE	*Hierarchical Organisation of Spherical Environments*	Hijerarhijska organizacija memorije
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Coherence*	Heteronuklearna tehnika NMR
INEPT	*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*	1D tehnika NMR
IR	*Infrared Spectroscopy*	Spektroskopija infracrvenog zračenja
LC-MS	*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*	Tekućinska kromatografija/spektrometrija masa

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
M	-	Period miješanja kod dvodimenzijskih tehnika spektroskopije NMR
m*/*z	*Mass-to-charge ratio*	Omjer mase i naboja
MIP	*Molecularly Imprinted Polymer*	Molekularno utisnuti polimeri
NOESY	*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*	Tehnika NMR
NMR	*Nuclear Magnetic Resonance*	Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
P	-	Period pripreme kod dvodimenzijskih tehnika spektroskopije NMR
PDA	*Photodiode Array*	Apsorpcijski detektor s nizom fotodioda
PENDANT	*Polarisation Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing*	1D tehnika NMR
Q	*Quadrupole*	Kvadrupol
QbD	*Quality by Design*	Dizajnom osigurana kvaliteta
ROESY	*Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*	Tehnika NMR
RRT	*Relative Retention Time*	Relativno vrijeme zadržavanja
SDE	*Self-Disproportionation of Enantiomers*	Auto-disproporcioniranje enantiomera
SEI	*Selective Inverse Probe*	Inverzna sonda NMR
SIM	*Single Ion Monitoring*	Praćenje odabranog iona
S*/*N	*Signal-to-Noise value*	Omjer vrijednosti signala i šuma
SPE	*Solid Phase Extraction*	Ekstrakcija na čvrstoj fazi
SPP	*Superficially Porous Particles*	Površinski porozne čestice
t_R	*Retention Time*	Vrijeme zadržavanja
TTC	*Threshold of Toxicological Concern*	Vrijednost praga toksikološke brige

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
UHPLC	*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*	Tekućinska kromatografija ultra djelotvornosti

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Narodne novine (2013) *Zakon o lijekovima*. Zagreb: Narodne novine d.d., 76/2013.
2. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q8(R2): Pharmaceutical Development, 2009.
3. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, 1999.
4. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q11: Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities), 2012.
5. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q11: Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities) – Questions and Answers, 2017.
6. S. Thomas, C. S. Mathela, A. Agarwal, S. K. Paul, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56** (2011) 423–428.
7. C. Pan, F. Liu, Q. Ji, W. Wang, D. Drinkwater, R. Vivilecchia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 581–590.
8. F. Rinaldi, J. Fan, C. Pathirana, V. Palaniswamy, *Magn. Reson. Chem.* **51** (2013) 517–522.
9. P. Novak, *Kem. Ind.* **53** (2004) 441–447.
10. W. Gu, N. Li, E. L. Leung, H. Zhou, X. Yao, L. Liu, J. Wu, *Phytochem. Anal.* **26** (2015) 428–435.
11. S. Swallow, *Prog. Med. Chem.* **54** (2015) 65–133.
12. J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Aceña, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **114** (2014) 2432–2506.
13. Y. Zhou, J. Wang, Z. Gu, S. Wang, W. Zhu, J. L. Aceña, V. A, Soloshonok, K. Izawa, H. Liu, *Chem. Rev.* **116** (2016) 422–518.
14. D. O'Hagan, *J. Fluorine Chem.* **131** (2010) 1071-1081.
15. J. Fried, E. F. Sabo, *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 2273–2274.
16. J. Fried, E. F. Sabo, *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 1455–1456.
17. S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 320–330.

18. K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **317** (2007) 1881–1886.
19. B. E. Smart, *J. Fluorine Chem.* **109** (2001) 3-11.
20. M. Schlosser, *Angew. Chem.* **110** (1998) 1496-1513.
21. R. D. Chambers, *Fluorine in Organic Chemistry*, Blackwell Publishing, Oxford, 2000.
22. H.-J. Federsel, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 5775–5794.
23. A. Strunecká, J. Patočka, P. Connett, *J. Appl. Biomed.* **2** (2004) 141-150.
24. V. A. Soloshonok, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 766-769.
25. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances, 2006.
26. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q3B(R2): Impurities in New Drug Products, 2006.
27. R. Holm, D. Elder, Eur. J. Pharm. Sci. **87** (2016) 118–135.
28. E. Regalado, W. Schafer, R. McClain, C. J. Welch, *J. Chromatogr. A* **1314** (2013) 266–275.
29. G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler, *Arzneim.-Forsch.* **29** (1979) 1640–1642.
30. W. H. De Camp, *Chirality*, **1** (1989) 2–6.
31. F. Plavšić, A. Wolf-Čoporda, Z. Lovrić, D. Čepelak, *Siguran rad s kemikalijama*, O-tisak, Zagreb, 2006.
32. L. Mueller, R. J. Mauthe, C. M. Riley, M. M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. De George, A. G. M. De Knaep, D. Ellison, J. A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C. D. N. Humfrey, A. S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D. K. Ness, M. R. O'Donovan, M. D. Smith, G. Vudathala, L. Yotti, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **44** (2006) 198–211.
33. ICH Harmonized Guideline, M7(R1): Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, 2017.
34. C. D. N. Humfrey, *Toxicol. Sci.* **100** (2007) 24–28.
35. S. Provera, L. Rovatti, L. Turco, S. Mozzo, A. Spezzaferri, S. Bacchi, A. Ribecai, S. Guelfi, A. Mingardi, C. Marchioro, D. Papini, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 517–525.
36. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 148–173.

37. N. Ferreirós, S. Dresen, R. M. Alonso, W. Weinmann, *J. Chromatogr. B* **855** (2007) 134–138.
38. R. Kormány, J. Fekete, D. Guillarme, S. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **89** (2014) 67–75.
39. R. Kormány, I. Molnár, H. Rieger, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **80** (2013) 79–88.
40. A. H. Schmidt, M. Stanic, *LC-GC North Am.* **32** (2014) 126–148.
41. J. Kochling, W. Wu, Y. Hua, Q. Guan, J. Castaneda-Merced, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **125** (2016) 130–139.
42. E. Boll, H. Drobecq, N. Ollivier, A. Blanpain, L. Raibaut, R. Desmet, J. Vicogne, O. Melnyk, *Nature Protocols* **10** (2015) 269–292.
43. N. Watanabe, E. Niki, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **54** (1978) 194–199.
44. H. Kovacs, D. Moskau, M. Spraul, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **46** (2005) 131–155.
45. R. Mukhopadhyay, *Anal. Chem.* **79** (2007) 7959–7963.
46. Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, *Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998.*, HINUS d.o.o. i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
47. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
48. USP Chromatography <621>
49. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed., Harcourt Brace & Company, San Francisco, 1998.
50. J. W. Jorgenson, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **3** (2010) 129–150.
51. J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **69** (1997) 983–989.
52. B. J. R. Mazzeo, U. D. Neue, M. Kele, R. S. Plumb, *Anal. Chem.* **77** (2005) 460A–467A.
53. L. E. Blue, E. G. Franklin, J. M. Godinho, J. P. Grinias, K. M. Grinias, D. B. Lunn, S. M. Moore, *J. Chromatogr. A* **1523** (2017) 17–39.
54. S. Fekete, J. Schappler, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, *TrAC* **63** (2014) 2–13.
55. S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 105–119.
56. S. Fekete, J. Schappler, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, *TrAC* **63** (2014) 2–13.
57. http://www.waters.com

58. D. Åsberg, J. Samuelsson, T. Fornstedt, *J. Chromatogr. A* **1457** (2016) 97–106.
59. D. Åsberg, M. Chutkowski, M. Lésko, J. Samuelsson, K. Kaczmarski, T. Fornstedt, *J. Chromatogr. A* **1479** (2017) 107–120.
60. D. Collins, E. Nesterenko, D. Connolly, M. Vasquez, M. Macka, D. Brabazon, B. Paull, *Anal. Chem.* **83** (2011) 4307–4313.
61. S. R. Groskreutz, S. G. Weber, *J. Chromatogr. A* **1354** (2014) 65–74.
62. F. Gritti, *J. Chromatogr. A* **1473** (2016) 38–47.
63. H. G. Gika, G. Theodoridis, J. Extance, A. M. Edge, I. D. Wilson, *J. Chromatogr. B* **871** (2008) 279–287.
64. D. T. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Heinisch, M. P. Barrioulet, J. L. Rocca, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* **1167** (2007) 76–84.
65. J. Billen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, H. Ritchie, B. Grady, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* **1161** (2007) 224–233.
66. A. Daneyko, A. Höltzel, S. Khirevich, U. Tallarek, *Anal Chem.* **83** (2011) 3903–3910.
67. D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 2887–2897.
68. J. Ruta, D. Zurlino, C. Grivel, S. Heinisch, J. L. Veuthey, D. Guillarme, *J. Chromatogr. A* **1228** (2012) 221–231.
69. C. Liu, Z. Yu, F. Wang, X. Zhong, L. Jiang, F. Zhang, Y. Tang, Z. Yan, S. Zeng, T. Pu, *J. Chromatogr. Sci.* **53** (2015) 1163–1168.
70. B. Raman, B. A. Sharma, P. D. Ghugare, P. P. Karmuse, A. Kumar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 377–383.
71. S. Provera, L. Rovatti, L. Turco, S. Mozzo, A. Spezzaferri, S. Bacchi, A. Ribecai, S. Guelfi, A. Mingardi, C. Marchioro, D. Papini, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 517–515.
72. G. Guiochon, A. Katti, *Chromatographia* **24** (1987) 165–189.
73. L. Griffiths, R. Horton, *Magn. Reson. Chem.* **36** (1998) 104–109.
74. S. Sturm, C. Seger, *J. Chromatogr. A* **1259** (2012) 50–61.
75. J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* **904** (2000) 171–188.
76. A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, *TrAC* **80** (2016) 641–654.
77. J. Płotka-Wasylka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *TrAC* **73** (2015) 19–38.

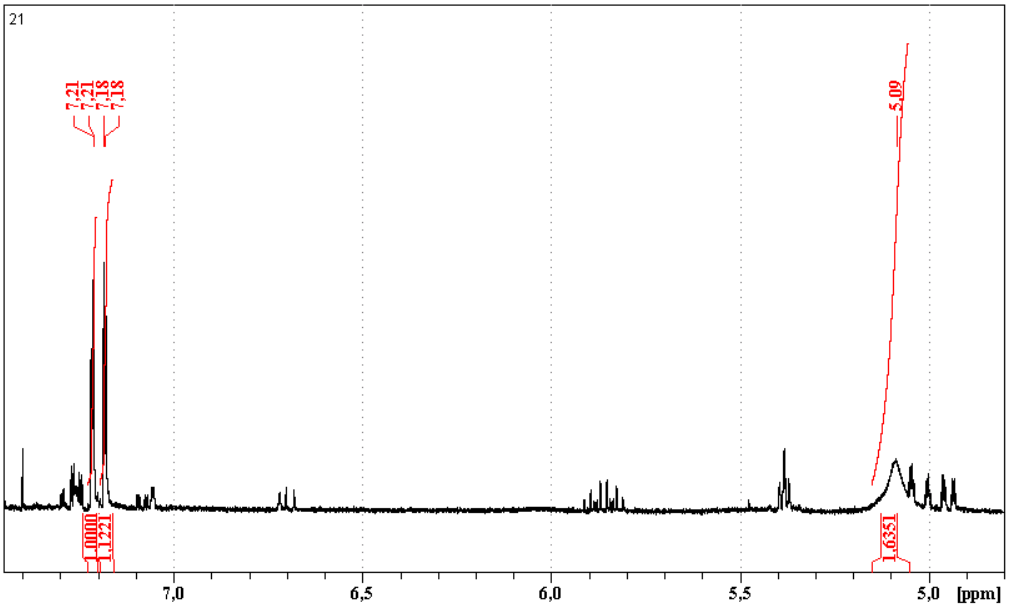
78. L. Chen, H. Wang, Q. Zeng, Y. Xu, L. Sun, H. Xu, L. Sun, H. Xu, L. Ding, *J. Chromatogr. Sci.* **47** (2009) 614–623.
79. S. Rodriguez-Mozaz, M. J. Lopez de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **1152** (2007) 97–115.
80. E. D. Becker, *High resolution NMR*, Academic Press, San Diego, 2000.
81. J. B. Lambert, E. P. Mazzola, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy, An introduction to principles, applications and experimental methods*, Pearson Education Inc., New Jersey, 2002.
82. M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance*, John Wiley & Sons. Inc., Chichester, 2001.
83. J. Keeler, *Understanding NMR spectroscopy*, John Wiley & Sons. Inc., New York, 2002.
84. A. Gossert, W. Jahnke, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **97** (2016) 82–125.
85. J. T. Arnold, S. S. Dharmatti, M. E. Packard, *J. Chem Phys.* **19** (1951) 507.
86. K. Pičuljan, T. Jednačak, N. Cindro, P. Novak, *Osnovni priručnik za rad sa spektrometrom NMR visoke rezolucije*, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb, 2016.
87. H. Pourmodheji, E. Ghafar-Zadeh, S. Magierowski, *Sensors* **16** (2016) 1–18.
88. R. M. Fratila, M. V. Gomez, S. Sýkora, A. H. Velders, *Nat. Commun.* **5** (2014) 3025.
89. D. D. Marshall, R. Powers, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **100** (2017) 1–16.
90. D. I. Hoult, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* **24** (1976) 71–85.
91. P. Styles, N. F. Soffe, C. A. Scott, D. A. Cragg, F. Row, D. J. White, P. C. J. White, *J. Magn. Reson.* **60** (1984) 397–404.
92. N. Bohni, K. Ndjoko-Ioset, A. S. Edison, J.-L. Wolfender, *Advanced spectroscopic detectors for identification and quantification: Nuclear magnetic resonance* u S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Elsevier Science Ltd., 2017.
93. M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Maas, O. Corcoran, *Anal. Chem.* **75** (2003) 1546–1551.
94. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 3rd ed., Wiley, Chichester, 2002.
95. M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 4451–4459.

96. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57** (1985) 675–679.
97. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **246** (1989) 64–71.
98. N. Galić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 117–123.
99. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina* **45** (2009) 218–232.
100. L. Bai, M. Sun, J. An, D. Q. Liu, T. K. Chen, A. S. Kord, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 302–306.
101. D. Q. Liu, M. Sun, A. S. Kord, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51** (2010) 999–1014.
102. R. Baldwin, R. A. Bethem, R. K. Boyd, W. L. Budde, T. Cairns, R. D. Gibbons, J. D. Henion, M. A. Kaiser, D. L. Lewis, J. E. Matusik, J. A. Sphon, R. Stephany, R. K. Trubey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8** (1997) 1180–1190.
103. N. Galić, M. Cindrić, *Kem. Ind.* **57** (2008) 231–243.
104. T. Tokunaga, K. Akagi, M. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **1508** (2017) 163–168.
105. G. Miliauskas, T. A. van Beek, P. de Waard, R. P. Venskutonis, E. J. R. Sudhölter, *J. Chromatogr. A* **1112** (2006) 276–284.
106. M. Godejohann, L. H. Tseng, U. Braumann, J. Fuchser, M. Spraul, *J. Chromatogr. A* **1058** (2004) 191–196.
107. C. Seger, M. Godejohann, L. H. Tseng, M. Spraul, A. Girtler, S. Sturm, H. Stuppner, *Anal. Chem.* **77** (2005) 878–885.
108. C. Seger, M. Godejohann, M. Spraul, H. Stuppner, F. Hadacek, *J. Chromatogr. A* **1136** (2006) 82–88.
109. J. Larsen, D. Staerk, C. Cornett, S. H. Hansen, J. W. Jaroszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49** (2009) 839–842.
110. S. Schmidt, C. Piechotta, M. Godejohann, T. Win, I. Nehls, C. Mügge, *Talanta* **82** (2010) 143–150.
111. O. Hendrawati, H. J. Woerdenbag, P. J. A. Michiels, H. G. Aantjes, A. van Dam, O. Kayser, *Phytochem.* **72** (2011) 2172–2179.
112. M. Cao, R. Muganga, I. Nistor, M. Tits, L. Angenot, M. Frederich, *Phytochem. Lett.* **5** (2012) 170–173.
113. Y. J. Xu, K. Foubert, L. Dhooghe, F. Lemière, S. Maregesi, C. M. Coleman, Y. Zou, D. Ferreira, S. Apers, L. Pieters, *Phytochem.* **79** (2012) 121–128.

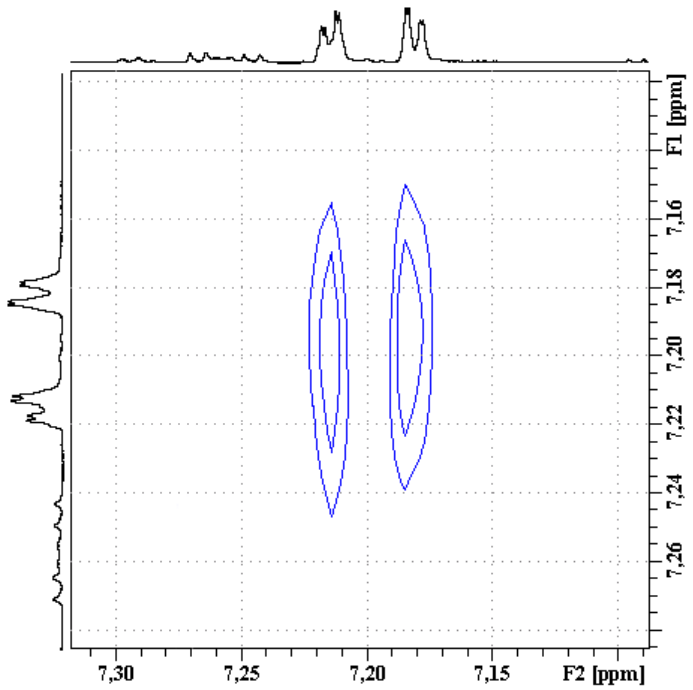
114. O. Kenny, T. J. Smyth, C. M. Hewage, N. P. Brunton, P. McLoughlin, *Phytochem.* **98** (2014) 197–203.
115. I. R. Capistrano, A. Wouters, K. Foubert, A. M. Baldé, S. Apers, F. Lardon, L. Pieters, V. Exarchou, *Phytochem. Lett.* **12** (2015) 119–124.
116. E. Tuenter, K. Foubert, D. Staerk, S. Apers, L. Pieters, *Phytochem.* **138** (2017) 163–169.
117. C. Wen, D. Wang, X. Li, T. Huang, C. Huang, K. Hu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **150** (2018) 144–151.
118. M. Elyashberg, *TrAC* **69** (2015) 88–97.
119. R. C. Breton,W. F. Reynolds, *Nat. Prod. Rep.* **4** (2013) 501–524.
120. B. Schlegel, A. Härtl, H. M. Dahse, F. A. Gollmick, U. Gräfe, *J. Antibiot.* **55** (2002) 814–817.
121. J. J. LaClair, *Angew. Chem.* **45** (2006) 2769–2773.
122. S. D. Rychnovsky, *Org. Lett.* **8** (2006) 2895–2898.
123. J. A. Porco, Jr., S. Su, X. Lei, S. Bardhan, S. D. Rychnovsky, *Angew. Chem.* **45** (2006) 5790–5792.
124. M. E. Elyashberg, K. A. Blinov, S. G. Molodtsov, A. J. Williams, G. E. Martin, E. R. Martirosian, *J. Chem. Inf. Model.* **44** (2004) 771–792.
125. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan, P. Novak, *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 543–547.

§ 8. DODATAK

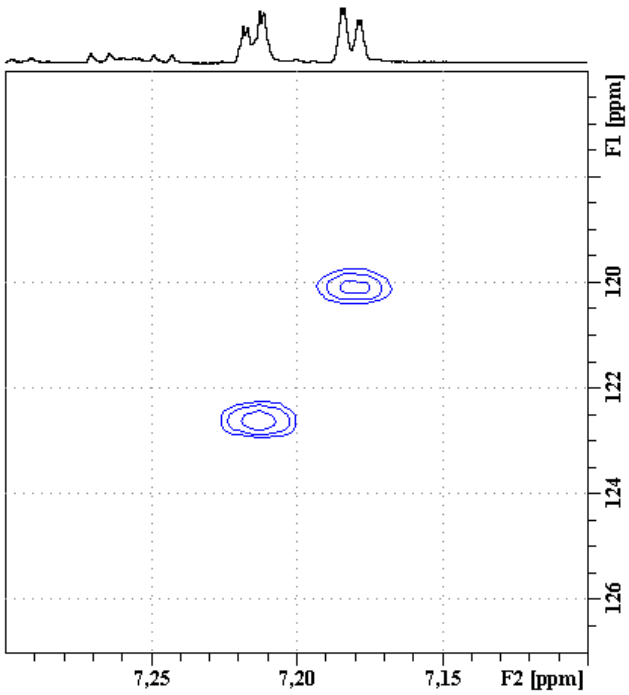
8.1. Spektri NMR spojeva 2 i 3 izoliranih tehnikom semi-preparativne tekućinske kromatografije



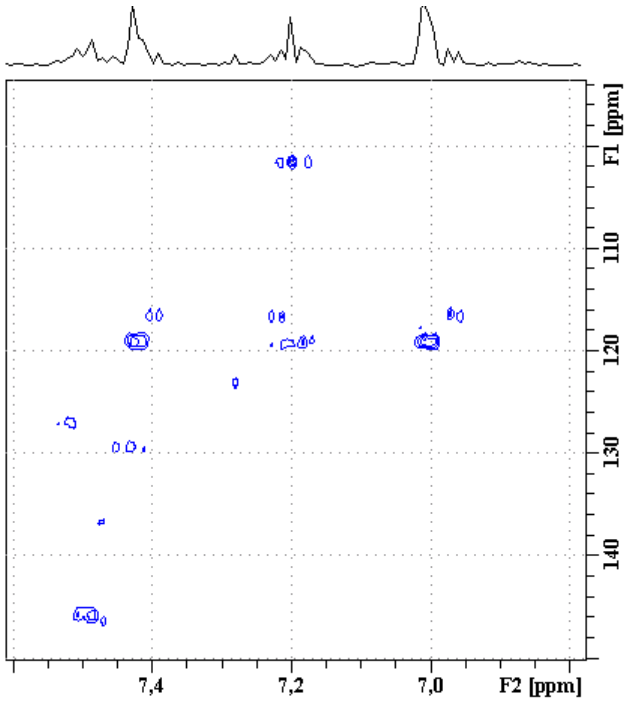
Slika 45. Spektar ^{1}H NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



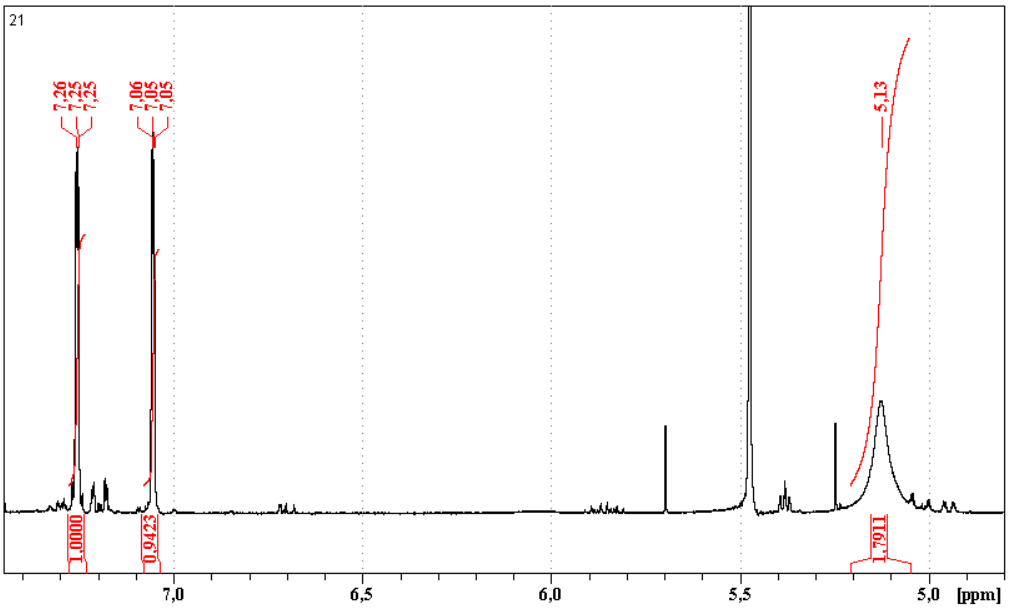
Slika 46. Spektar 2D COSY NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



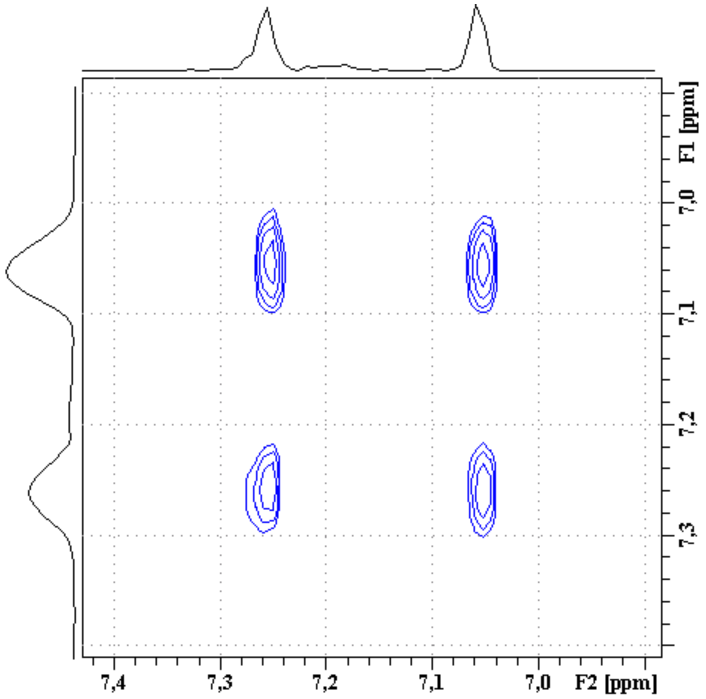
Slika 47. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



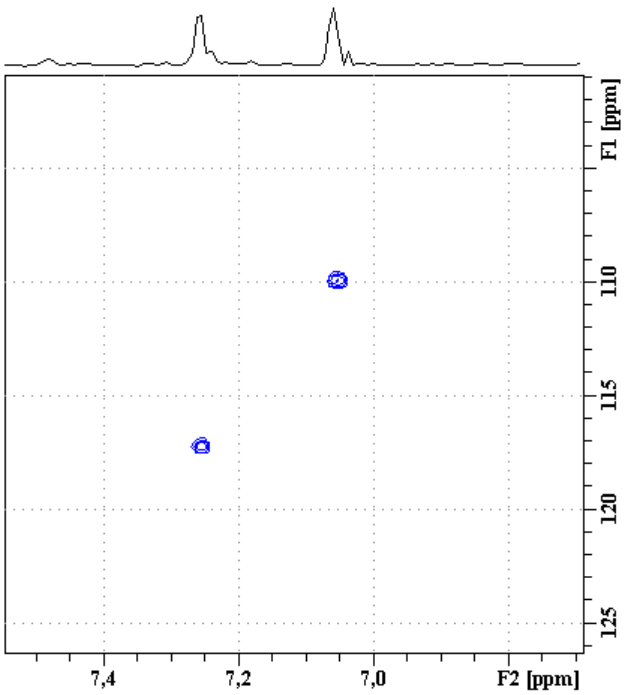
Slika 48. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



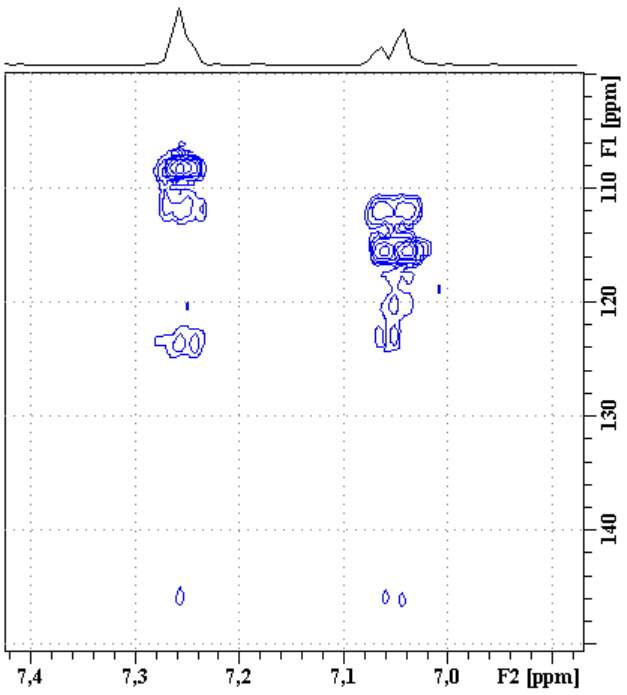
Slika 49. Spektar ^{1}H NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



Slika 50. Spektar 2D COSY NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

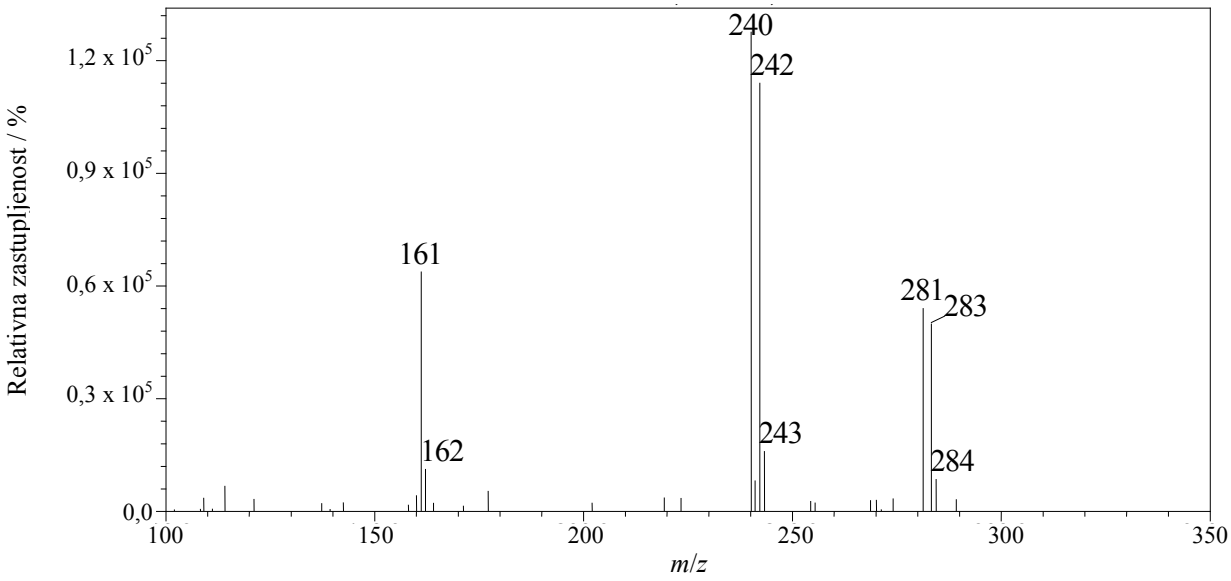


Slika 51. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



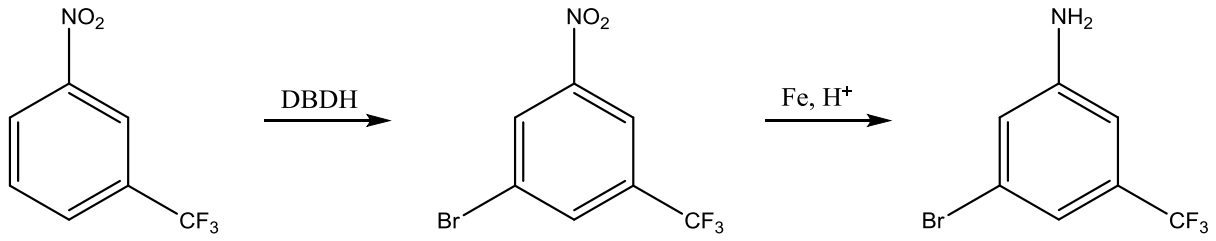
Slika 52. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.

8.2. Rezultati analize 3-brom-5-(trifluormetil)anilina tehnikom MS



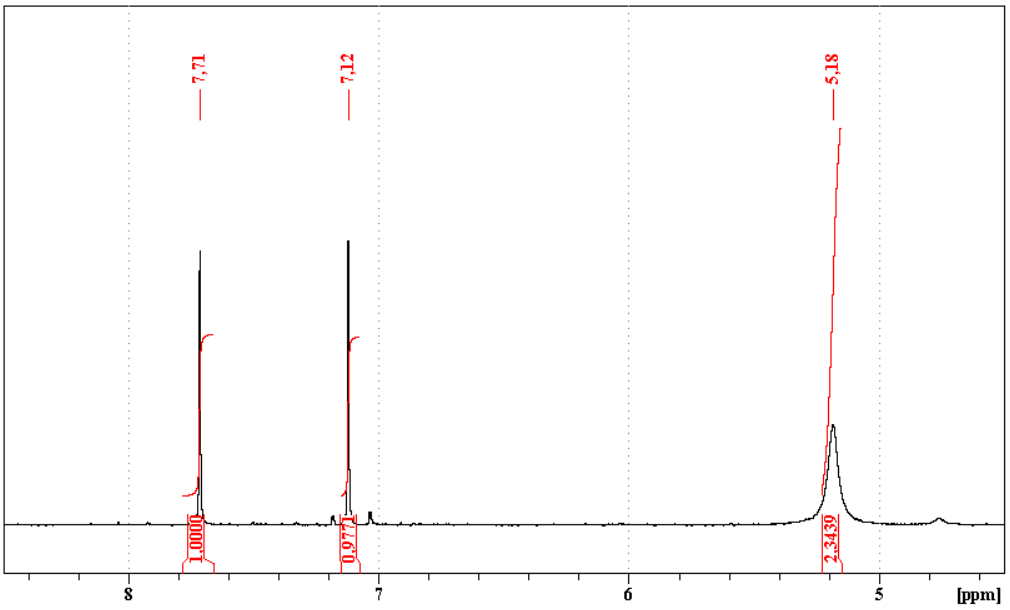
Slika 53. Spektar ESI-MS 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.

8.3. Reakcija dobivanja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina

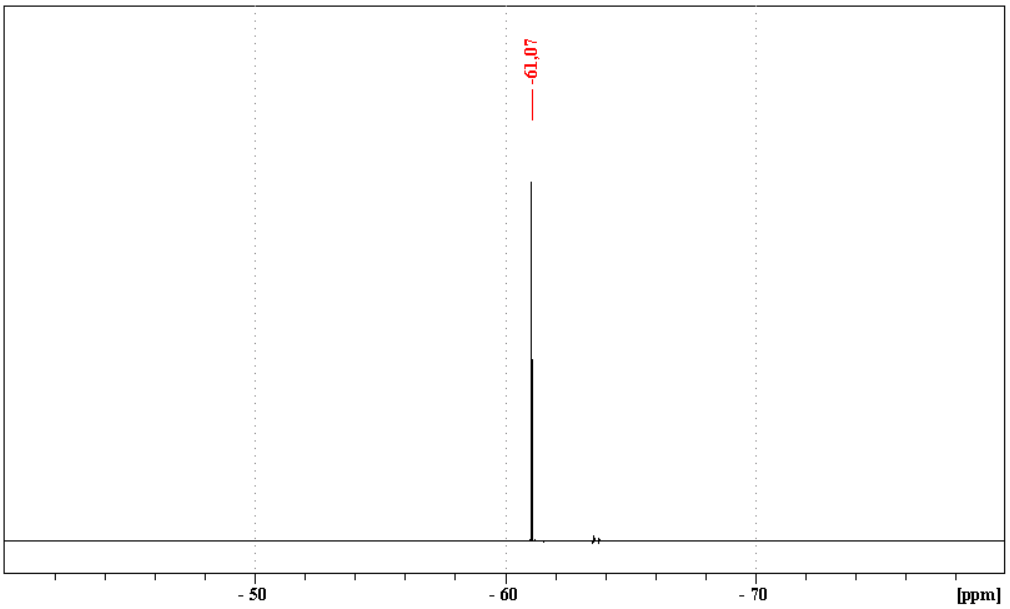


Slika 54. Shematski prikaz reakcije dobivanja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.

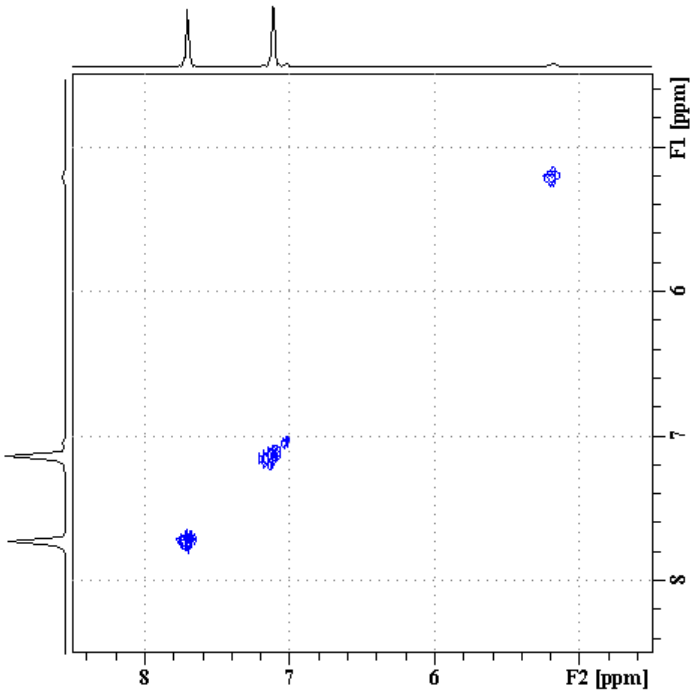
8.4. Identifikacija i strukturna karakterizacija primjenom LC-SPE/krio-NMR tehnike



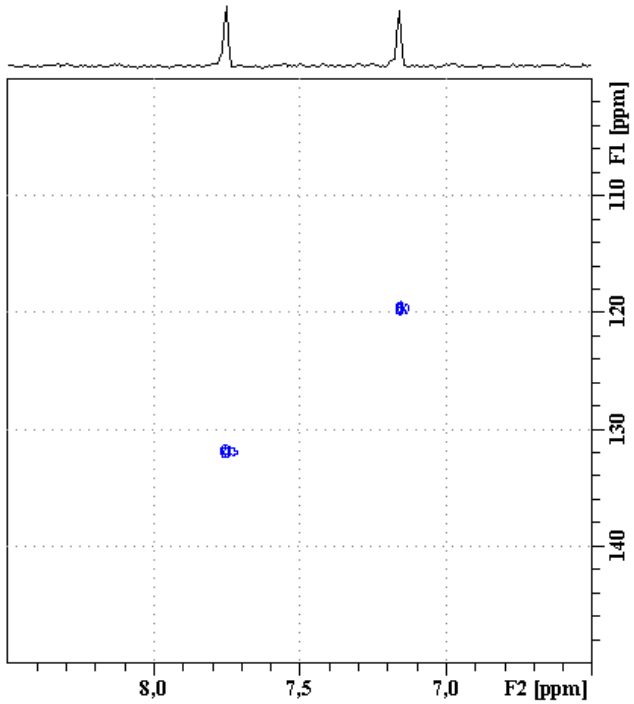
Slika 55. Spektar ^{1}H NMR spoja **1** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



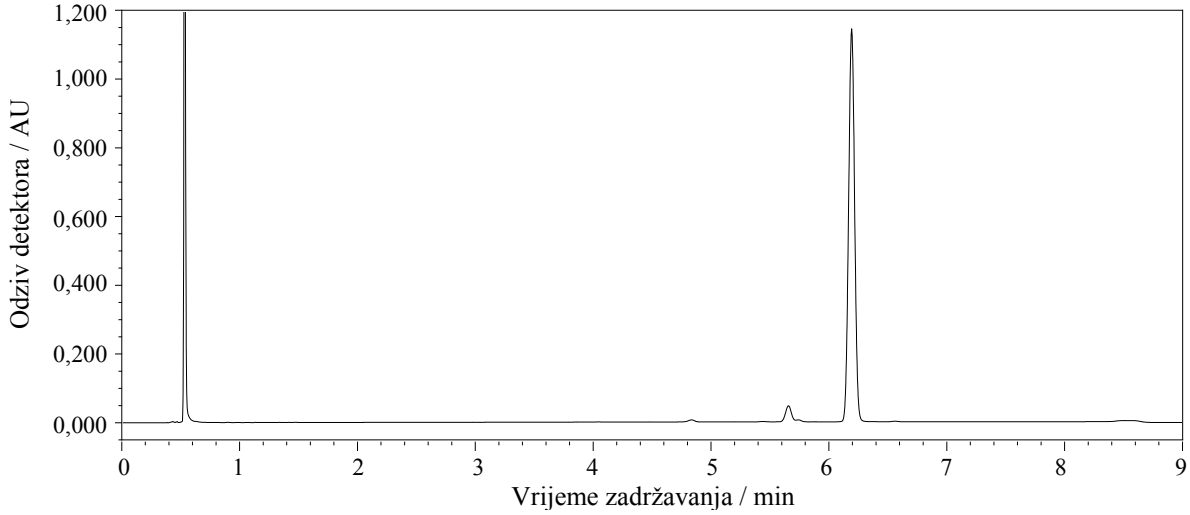
Slika 56. Spektar ^{19}F NMR spoja **1** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



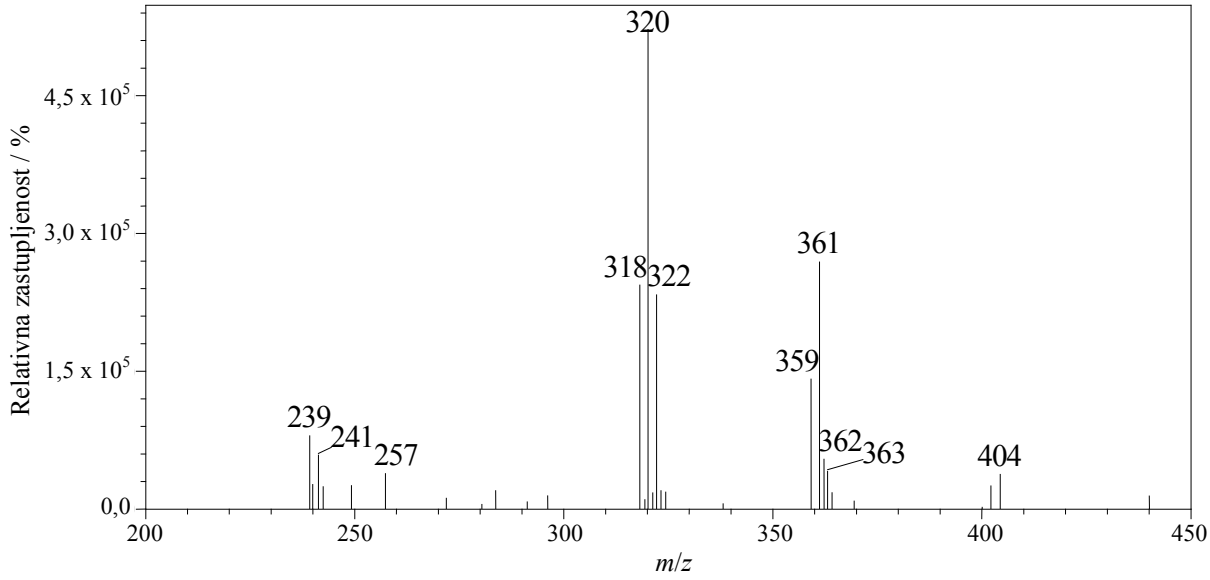
Slika 57. Spektar 2D COSY NMR spoja **1** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



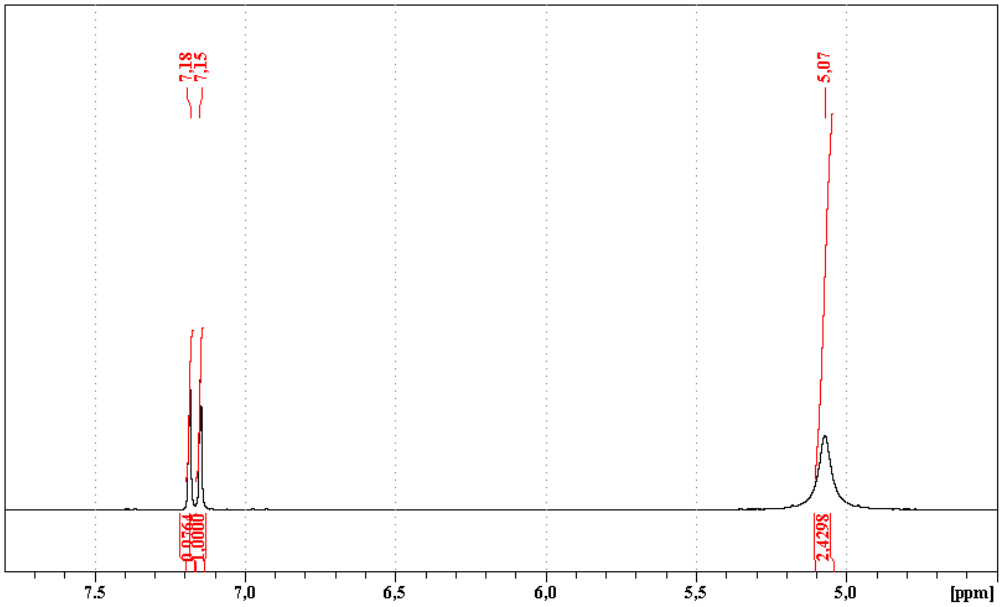
Slika 58. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **1** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



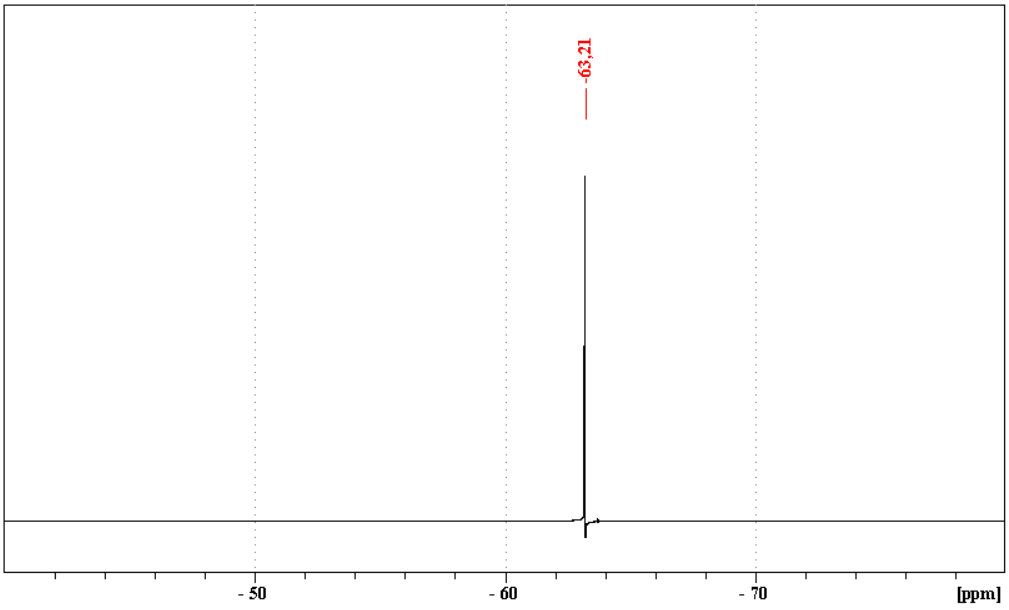
Slika 59. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **1** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.



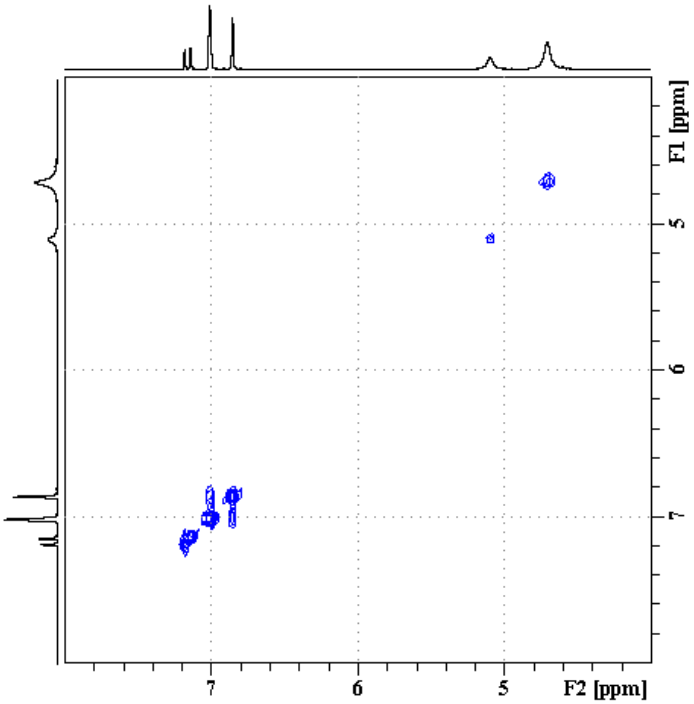
Slika 60. Spektar ESI-MS spoja **1** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.



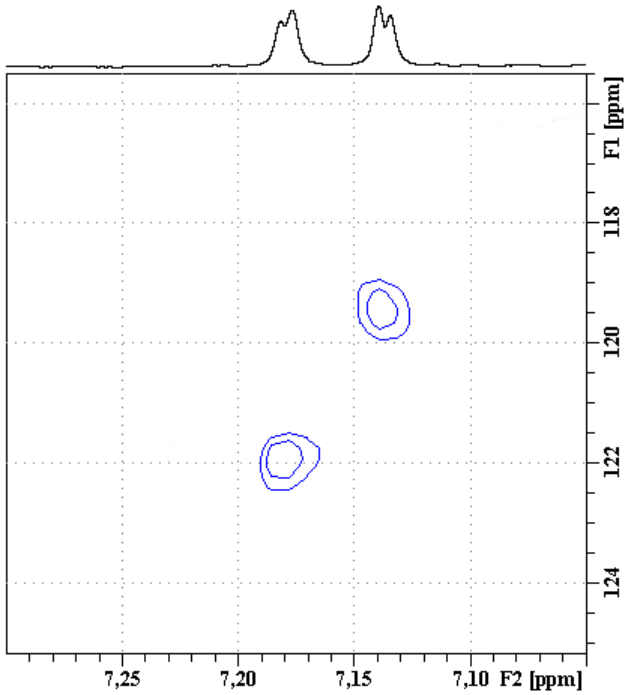
Slika 61. Spektar ^{1}H NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



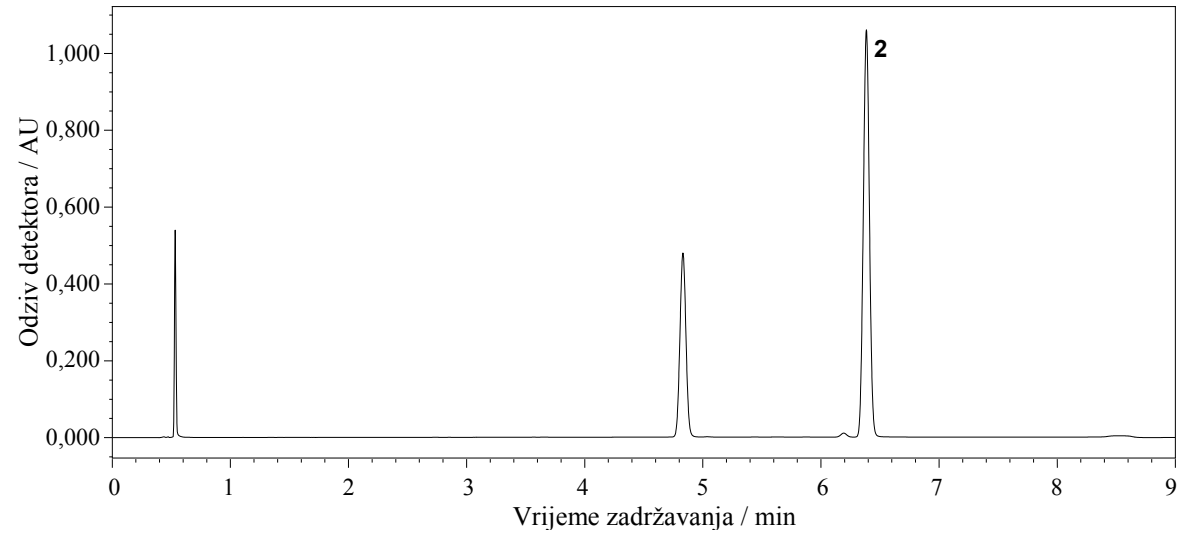
Slika 62. Spektar ^{19}F NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



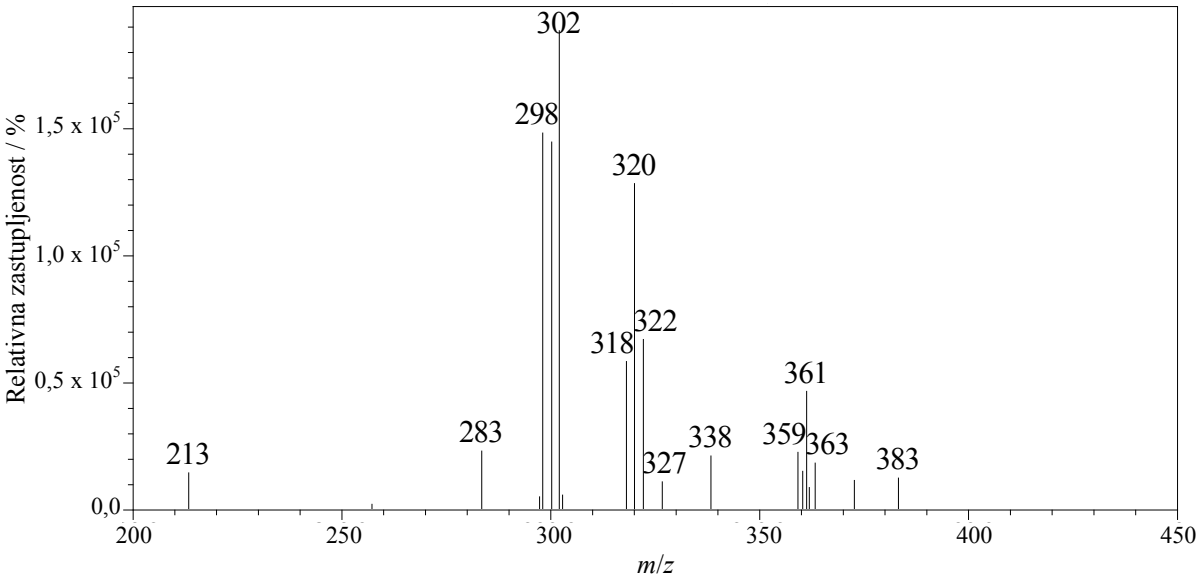
Slika 63. Spektar 2D COSY NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



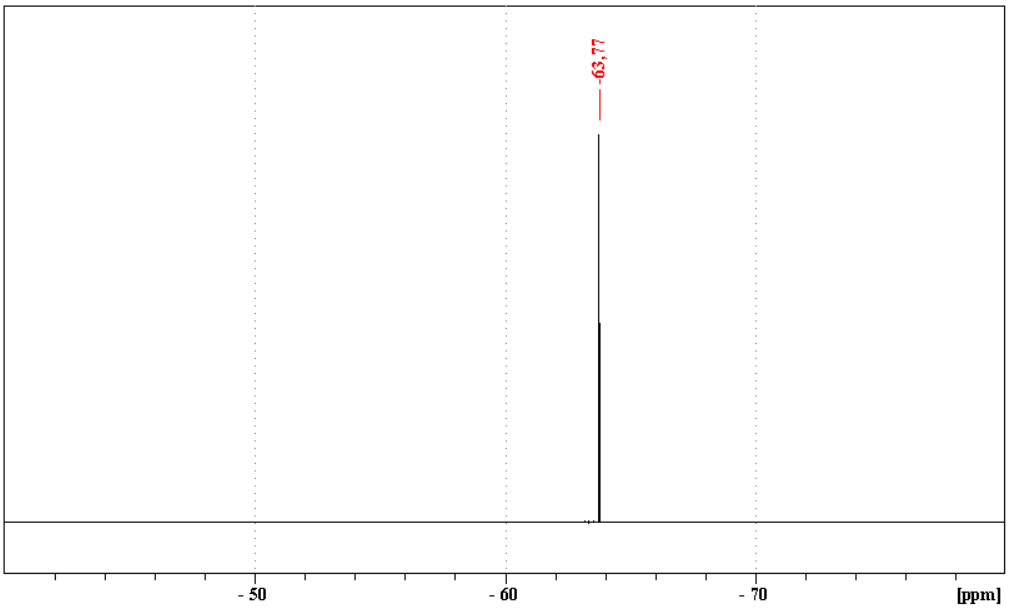
Slika 64. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **2** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



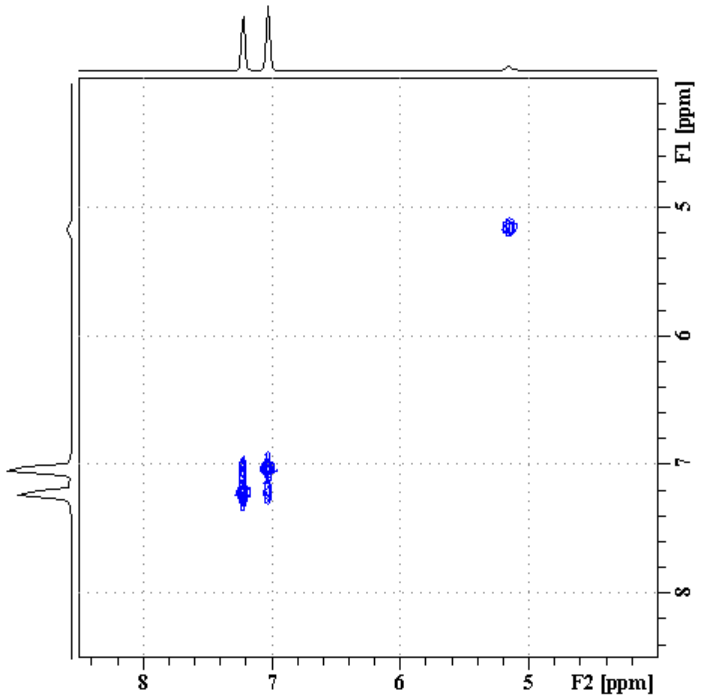
Slika 65. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **2** uz primjese, izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm, onečišćenog polaznim 3-brom-5-(trifluormetil)anilinom.



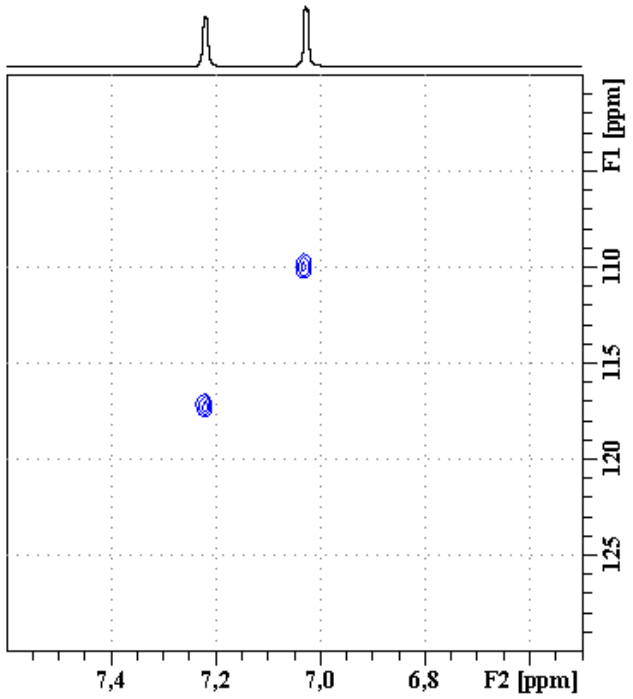
Slika 66. Spektar ESI-MS spoja **2** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.



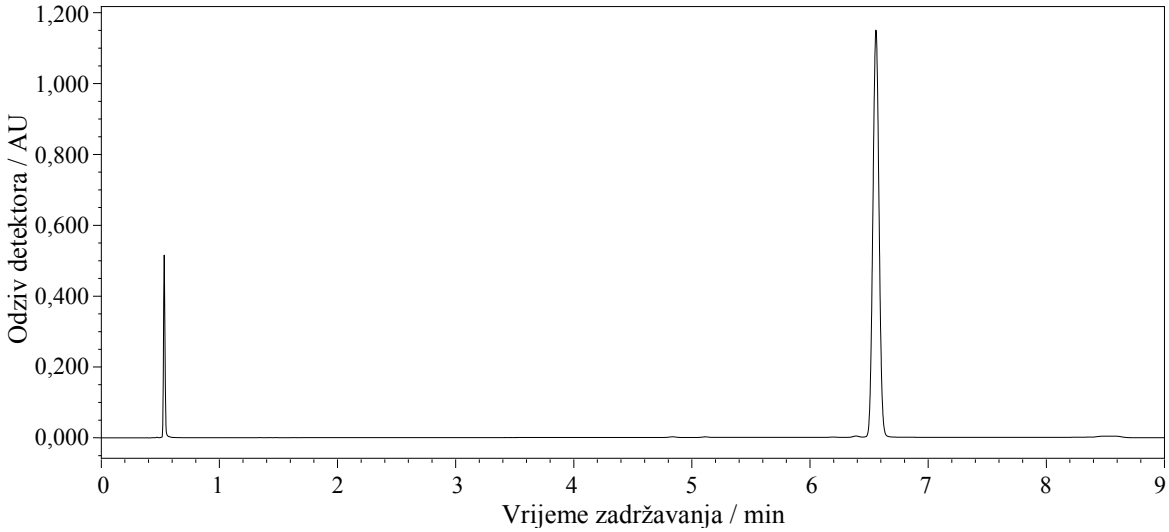
Slika 67. Spektar ^{19}F NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



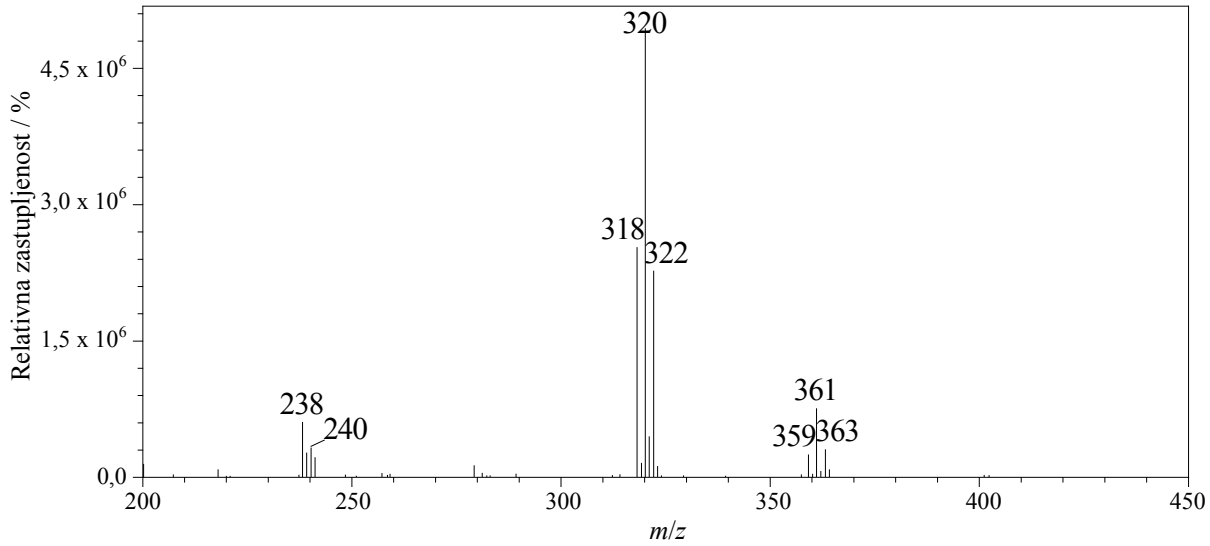
Slika 68. Spektar 2D COSY NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



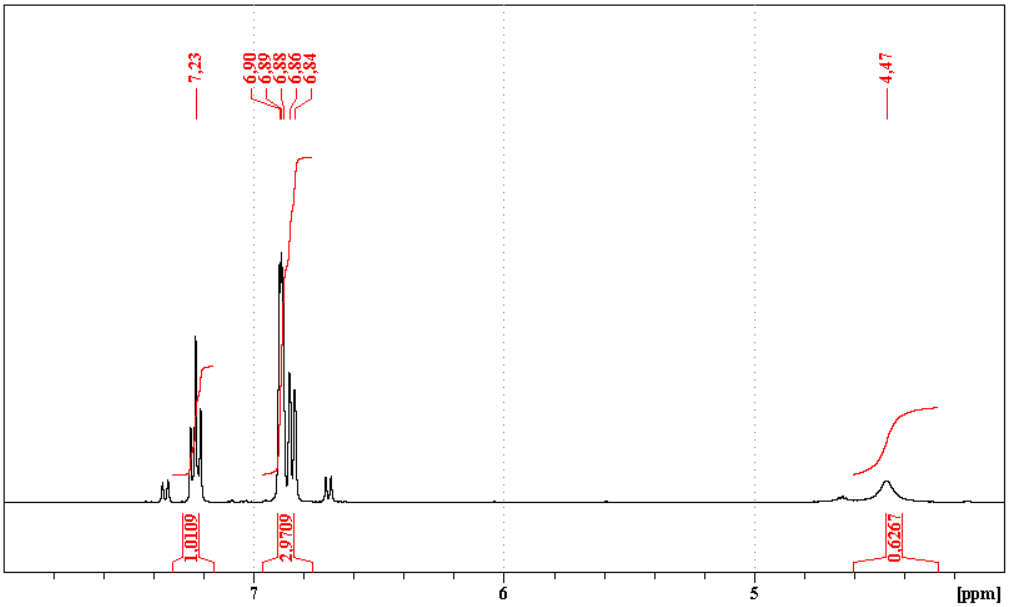
Slika 69. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **3** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



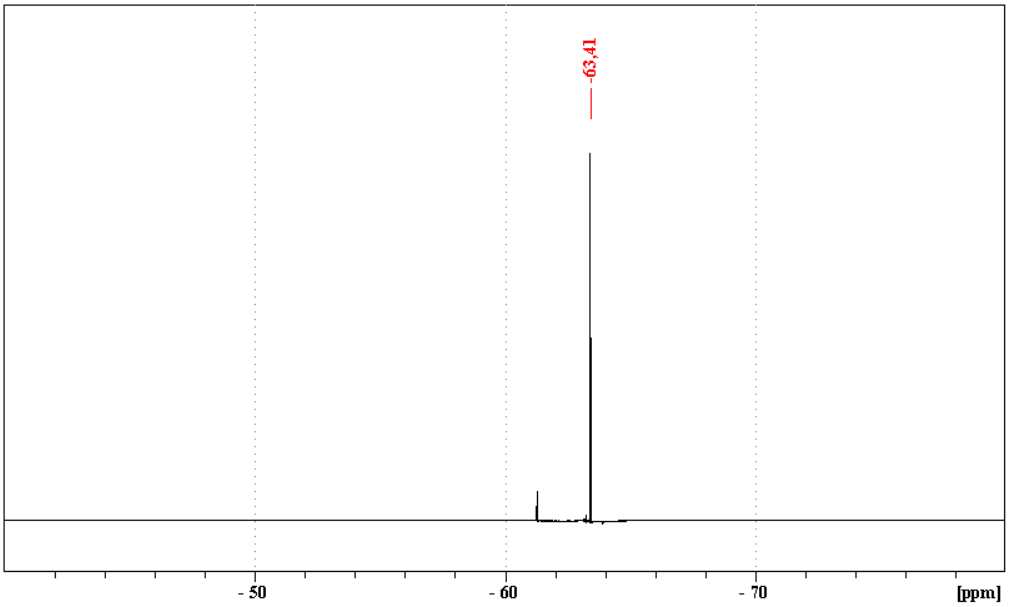
Slika 70. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **3** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.



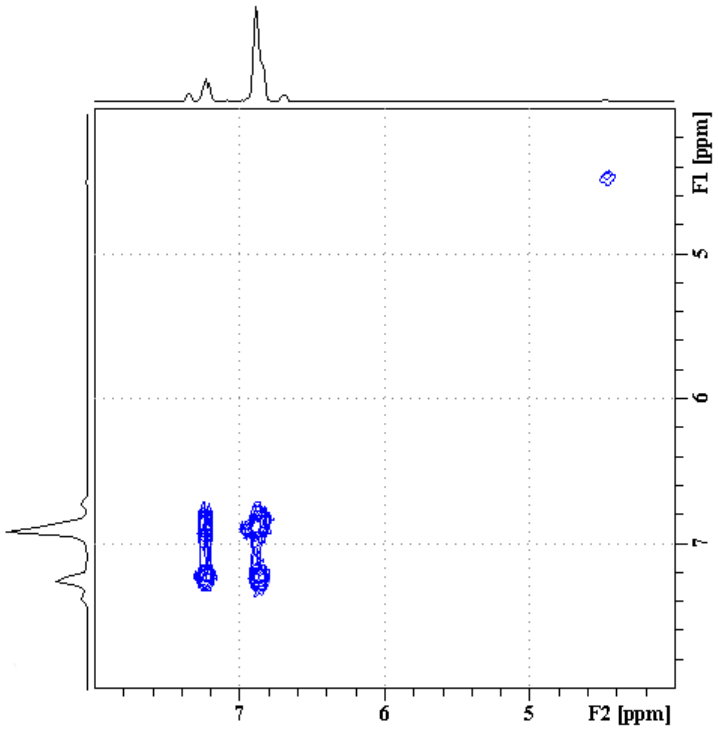
Slika 71. Spektar ESI-MS spoja **3** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.



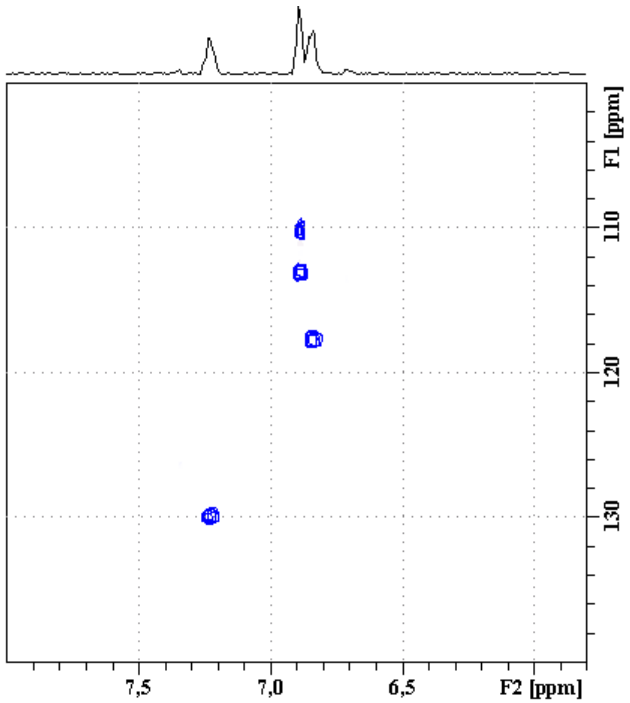
Slika 72. Spektar ^{1}H NMR spoja **4** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



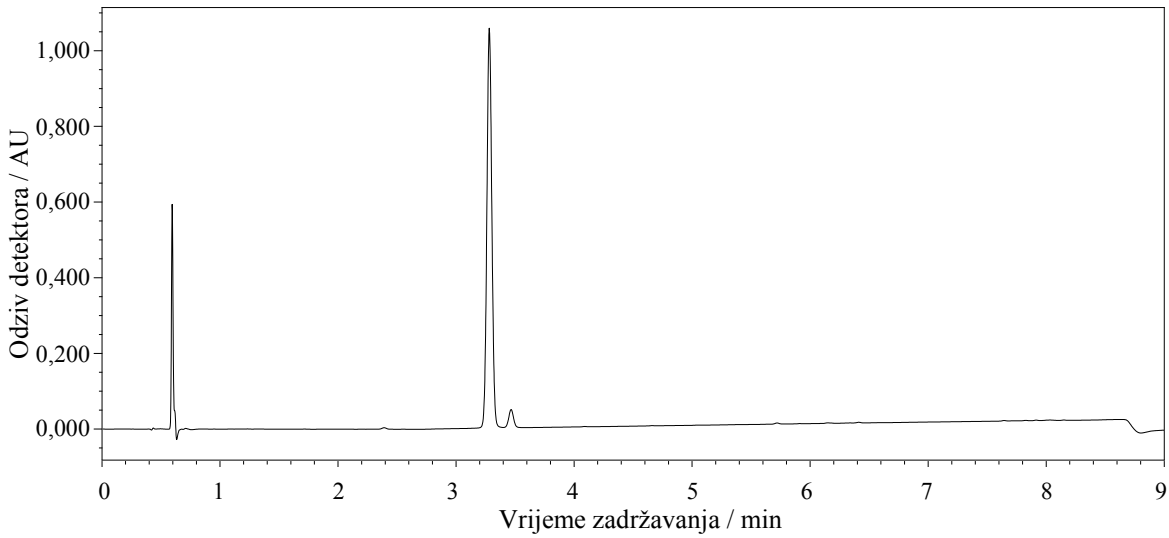
Slika 73. Spektar ^{19}F NMR spoja **4** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



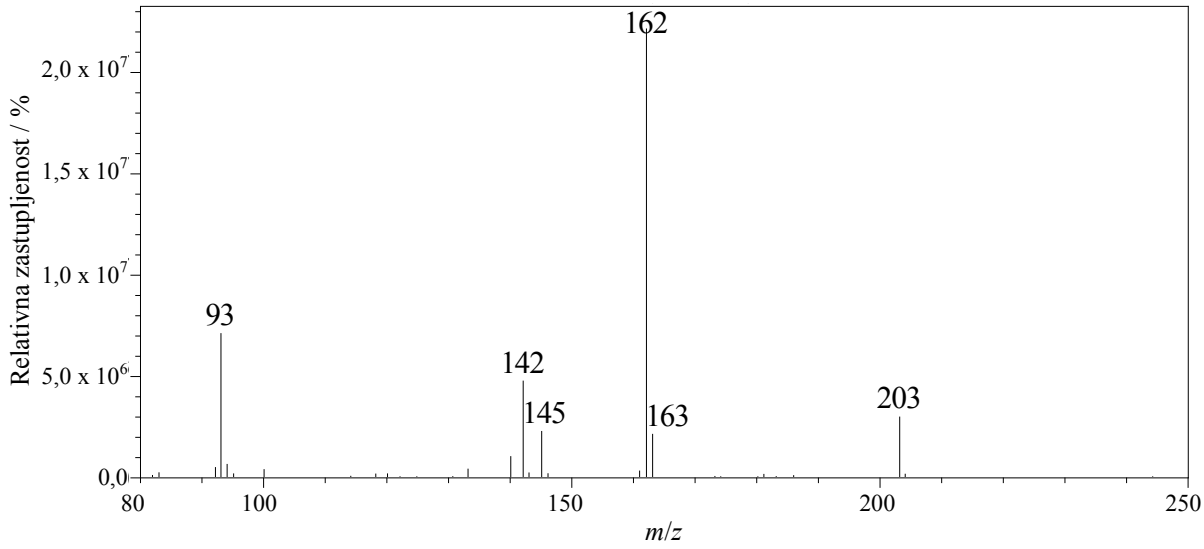
Slika 74. Spektar 2D COSY NMR spoja **4** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



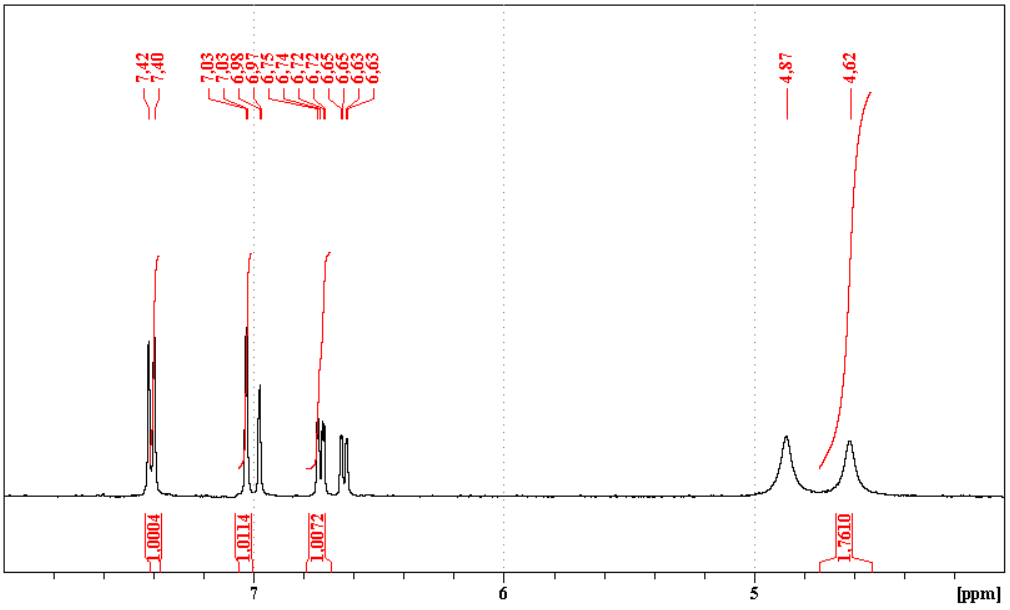
Slika 75. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **4** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



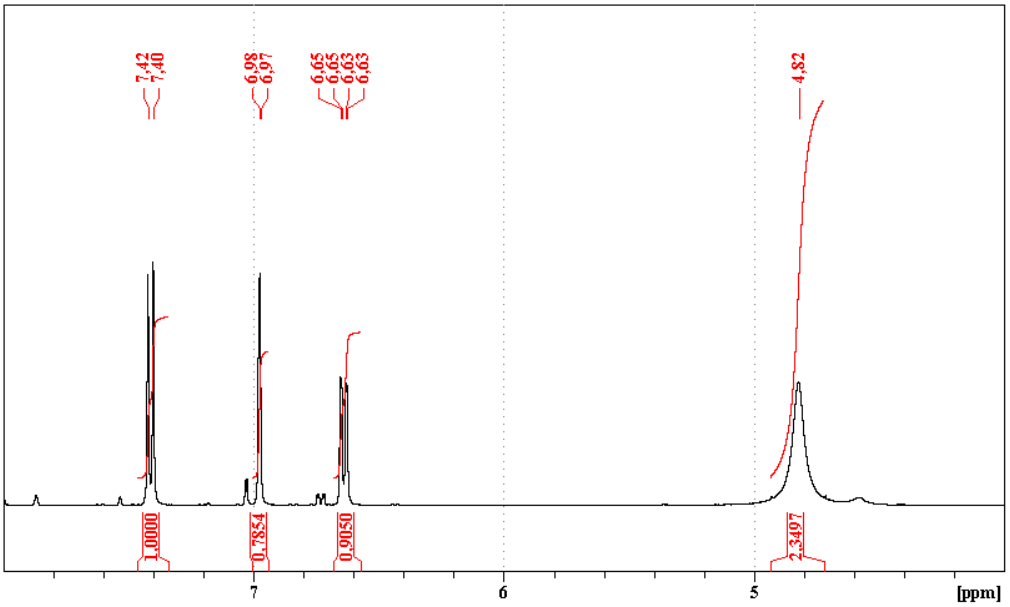
Slika 76. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **4** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.



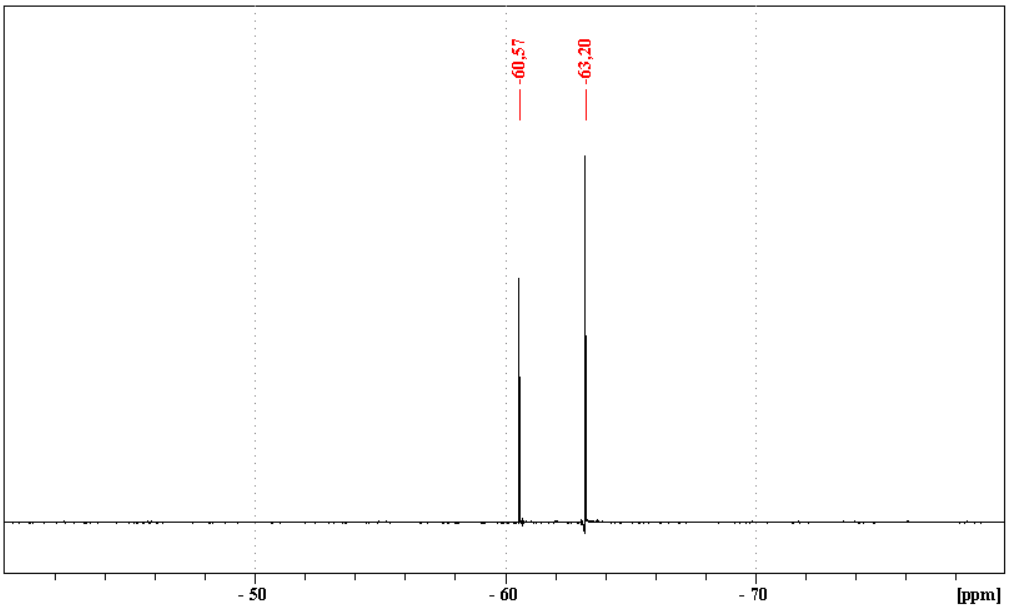
Slika 77. Spektar ESI-MS spoja **4** izoliranog iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.



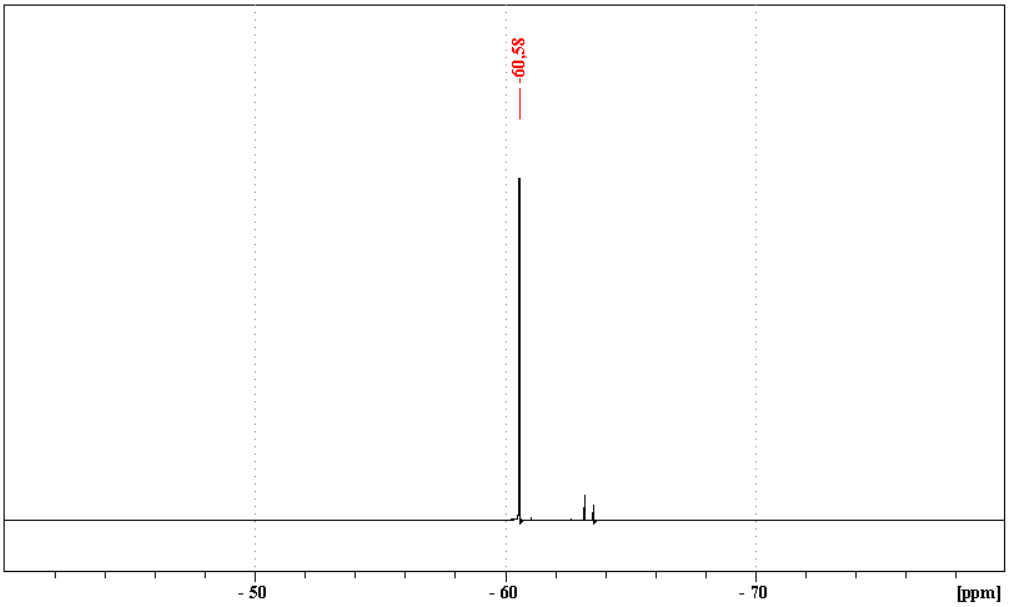
Slika 78. Spektar ^{1}H NMR smjese spojeva **5** i **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



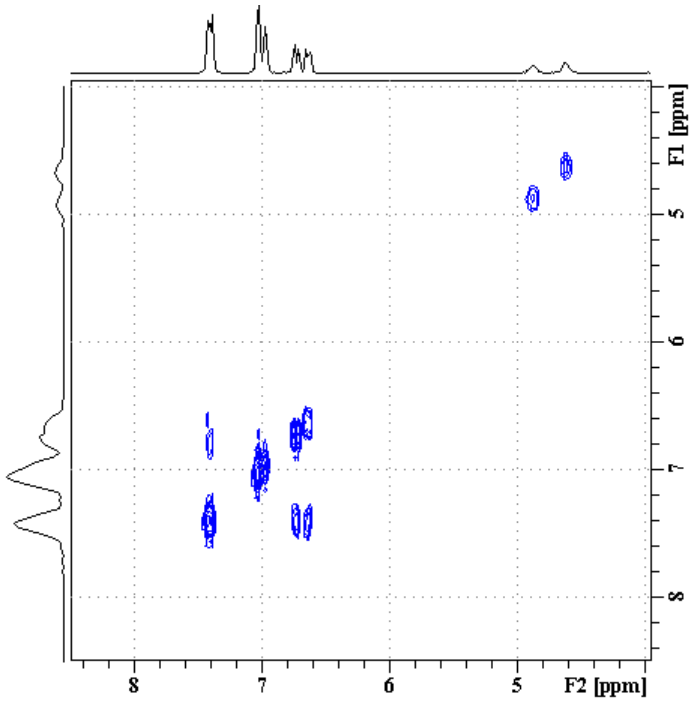
Slika 79. Spektar ^{1}H NMR spoja **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



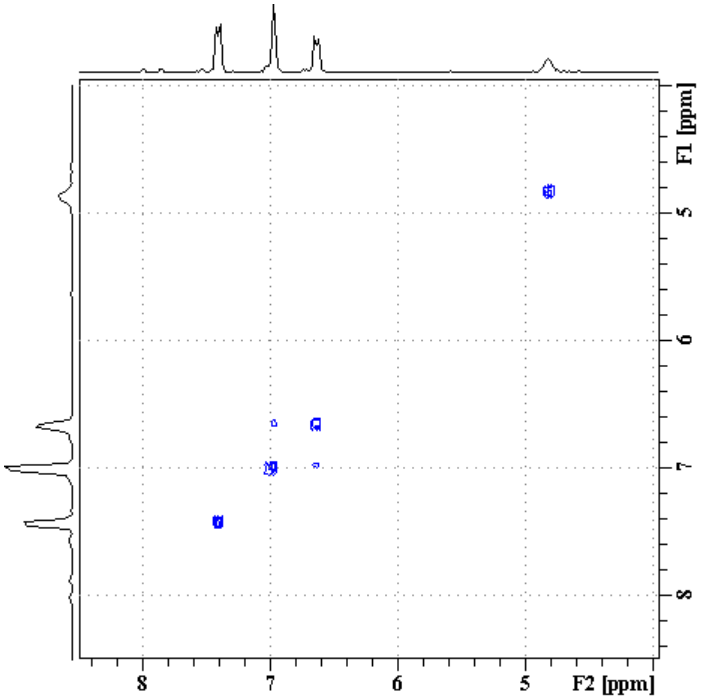
Slika 80. Spektar ^{19}F NMR smjese spojeva **5** i **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



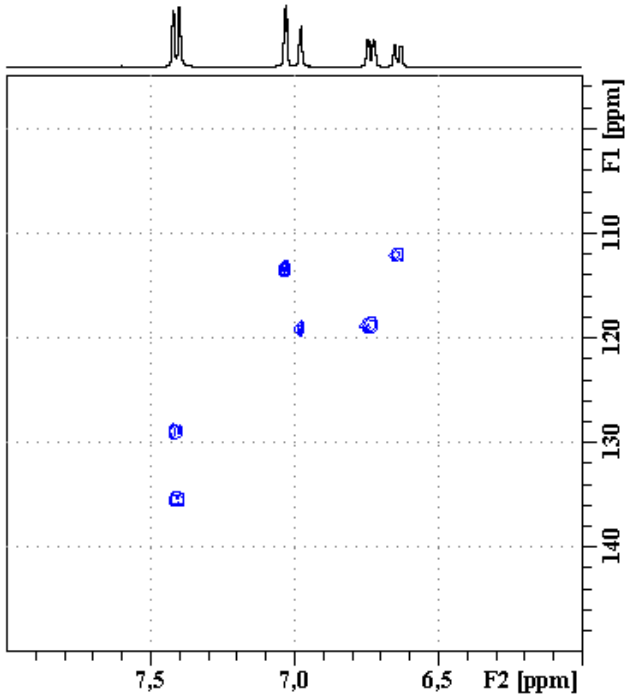
Slika 81. Spektar ^{19}F NMR spoja **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



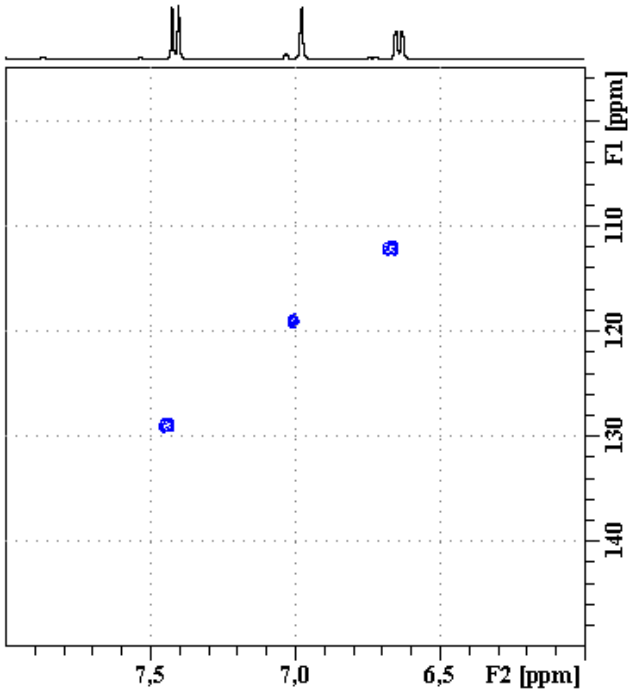
Slika 82. Spektar 2D COSY NMR smjese spojeva **5** i **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



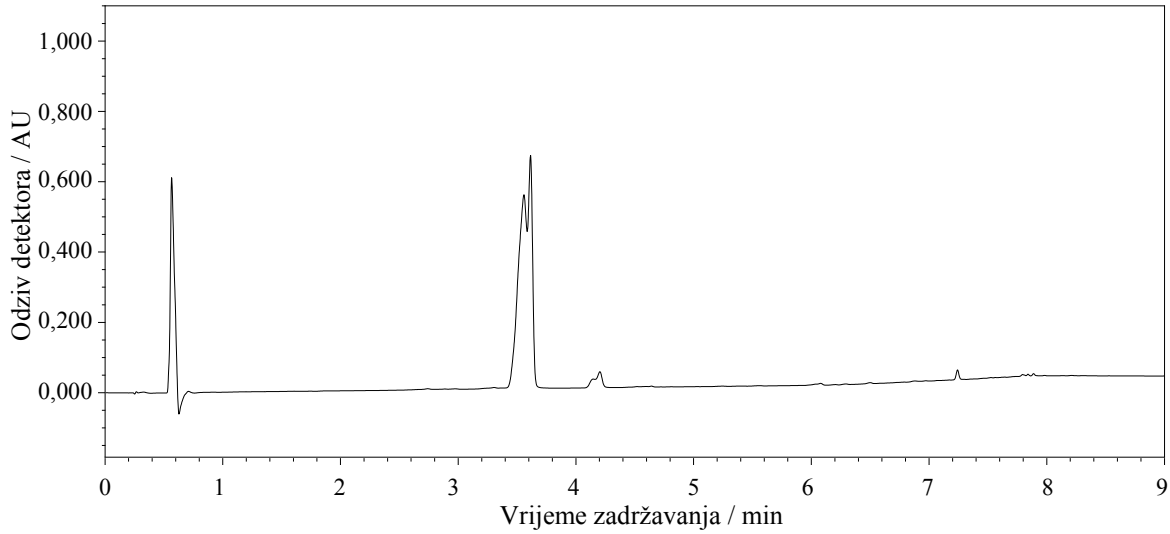
Slika 83. Spektar 2D COSY NMR spoja **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



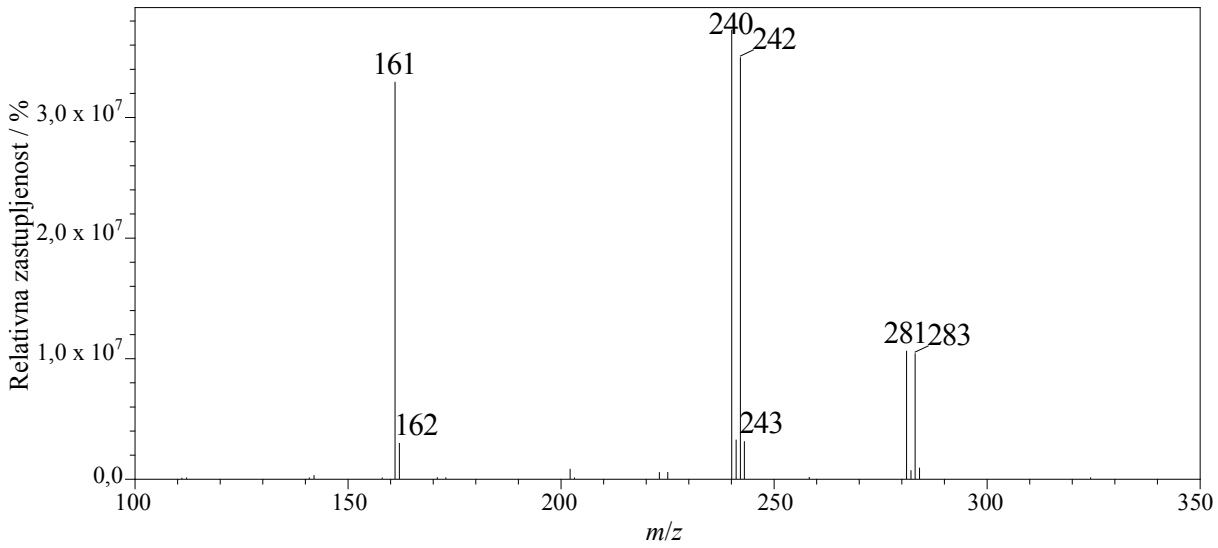
Slika 84. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR smjese spojeva **5** i **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



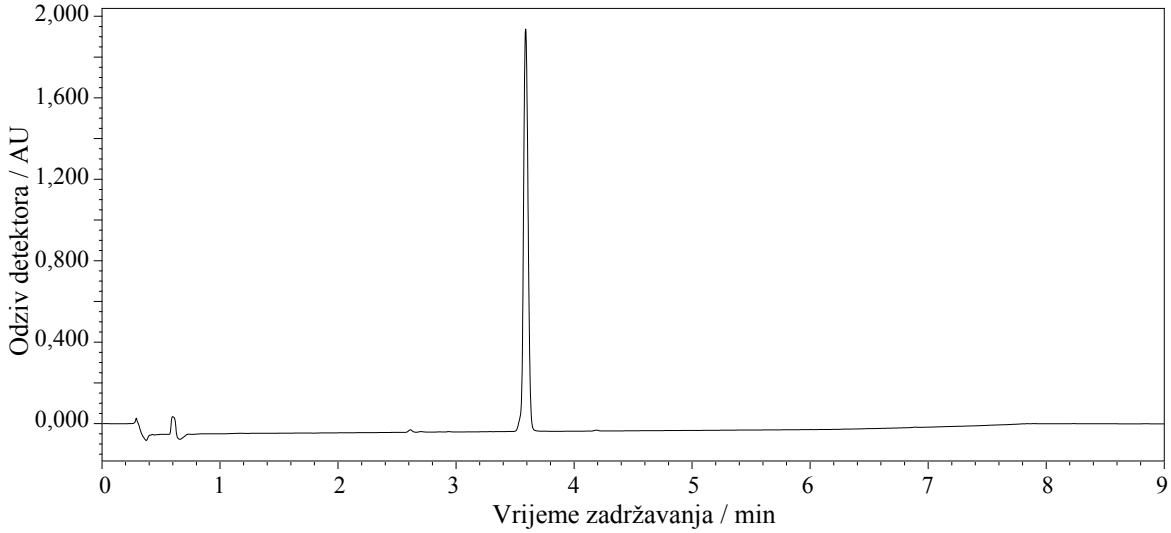
Slika 85. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **6** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



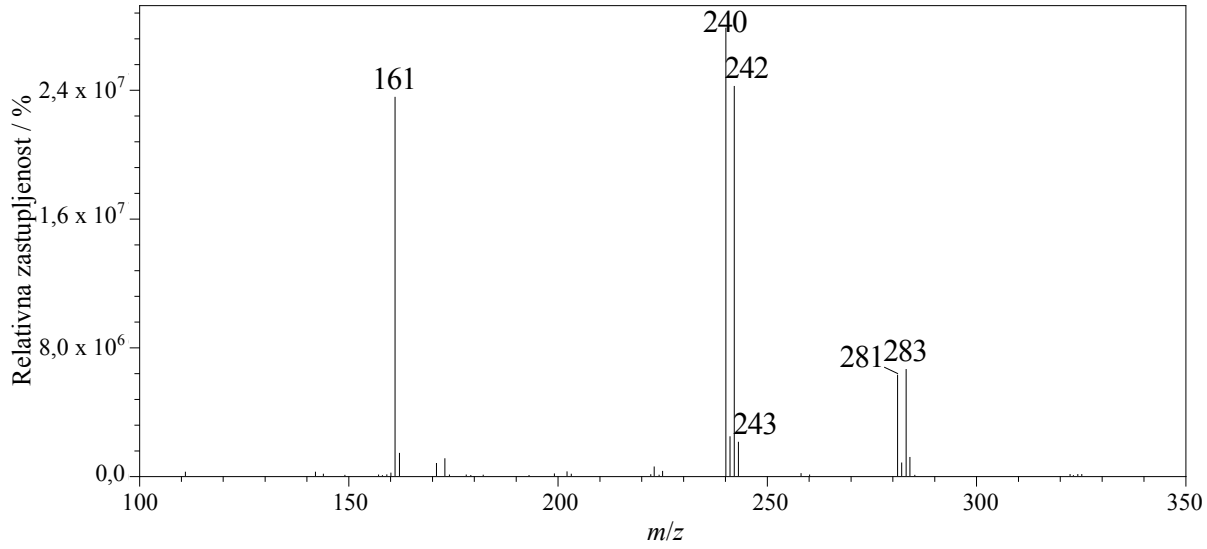
Slika 86. UHPLC-UV-DAD kromatogram smjese spojeva **5** i **6** izoliranih iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.



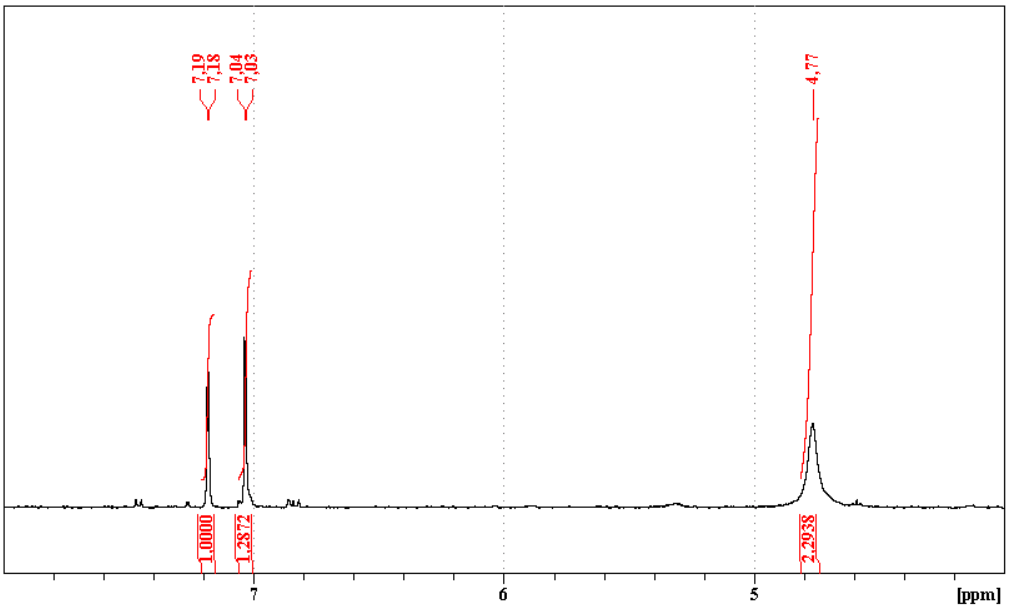
Slika 87. Spektar ESI-MS smjese spojeva **5** i **6** izoliranih iz uzorka **I** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.



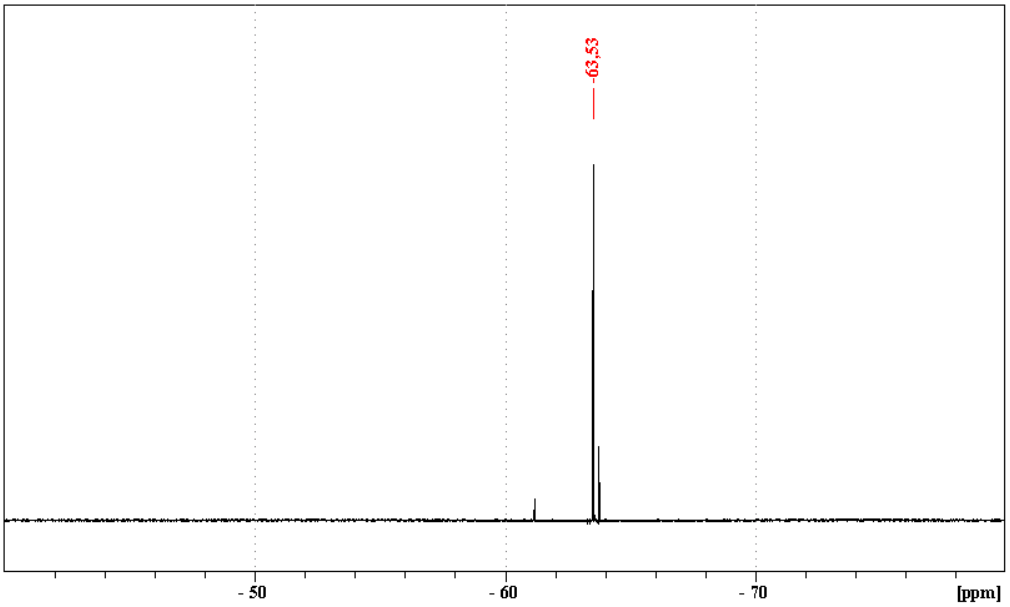
Slika 88. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **6** izoliranog iz uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina pri 224 nm.



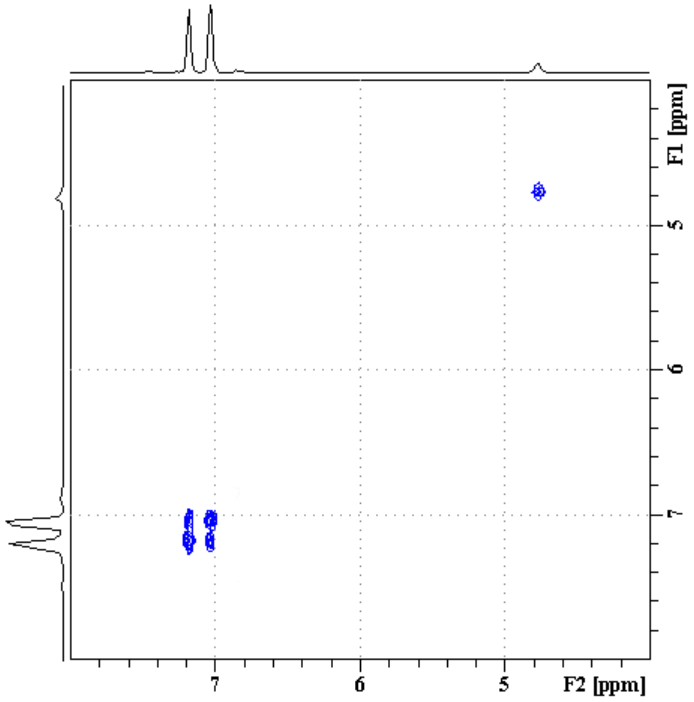
Slika 89. Spektar ESI-MS spoja **6** izoliranog iz uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)anilina.



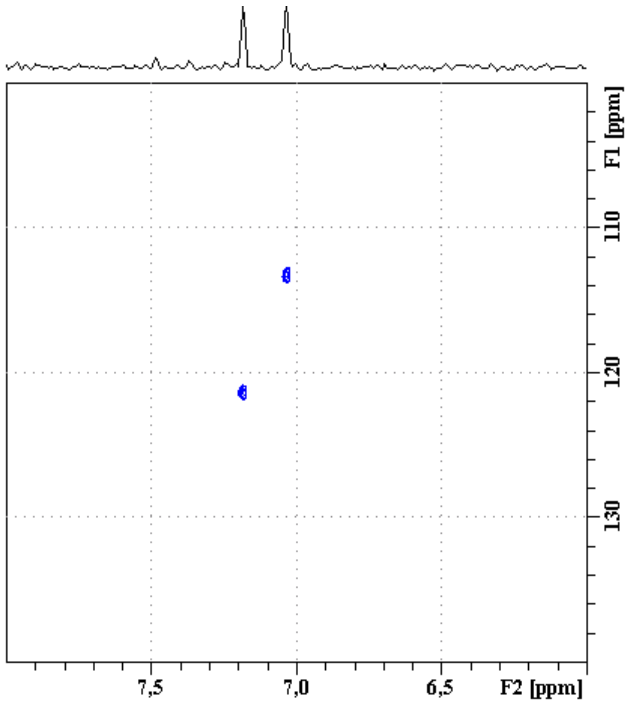
Slika 90. Spektar ^{1}H NMR spoja **7** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



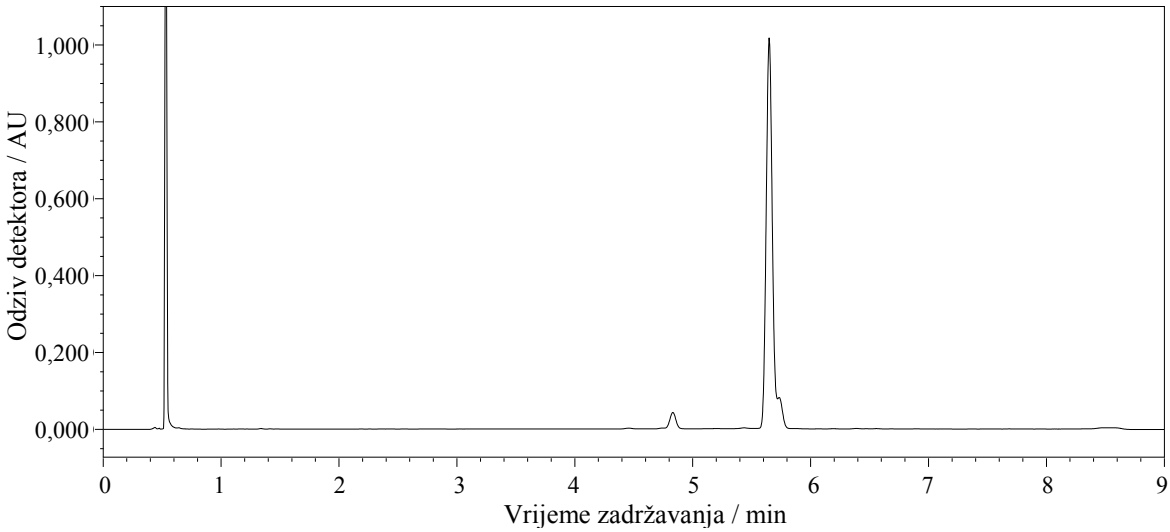
Slika 91. Spektar ^{19}F NMR spoja **7** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



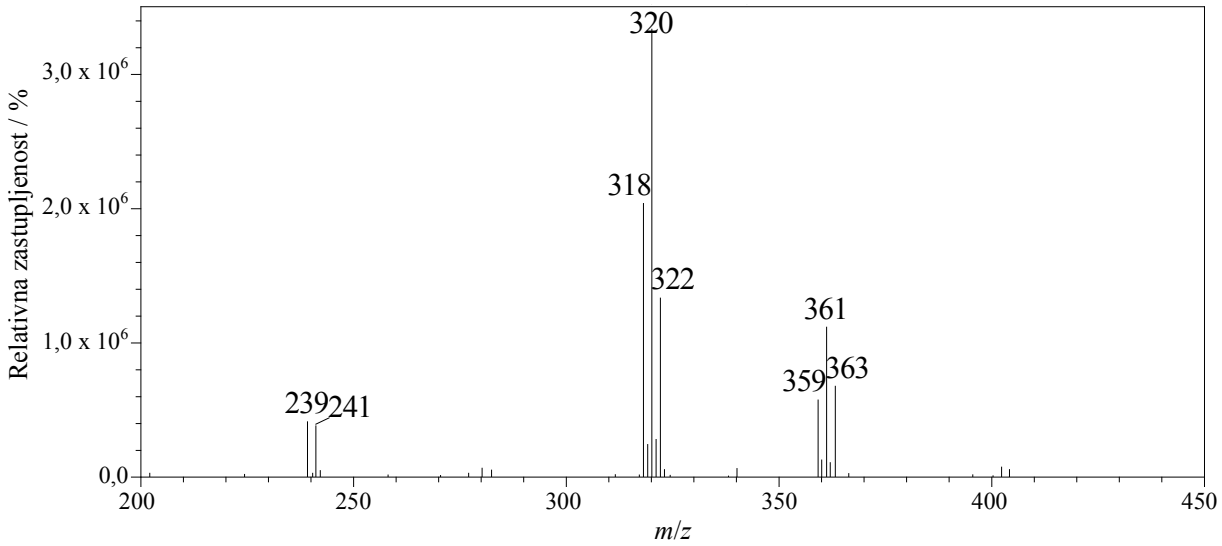
Slika 92. Spektar 2D COSY NMR spoja **7** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



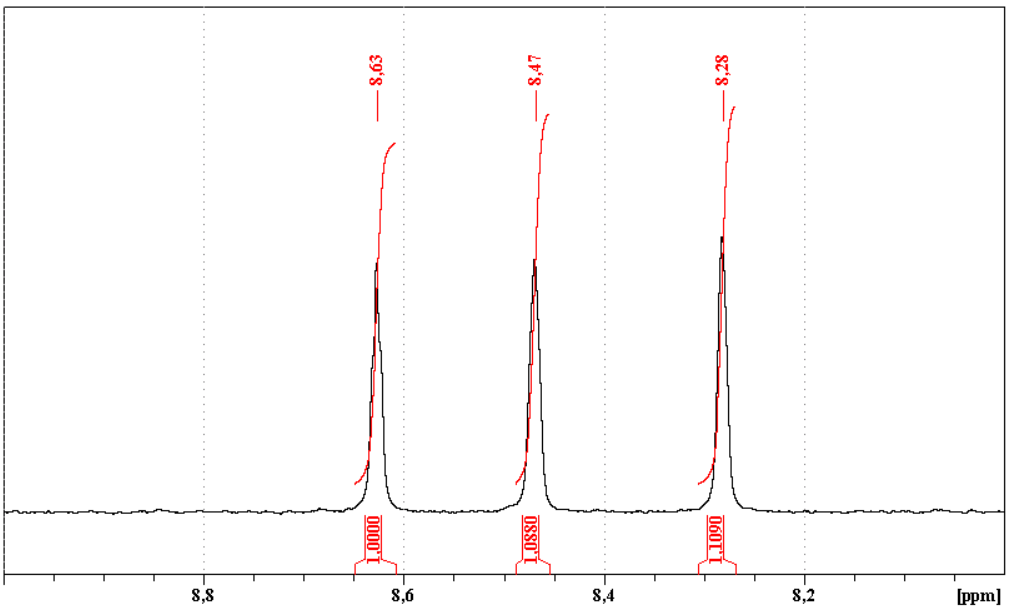
Slika 93. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **7** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



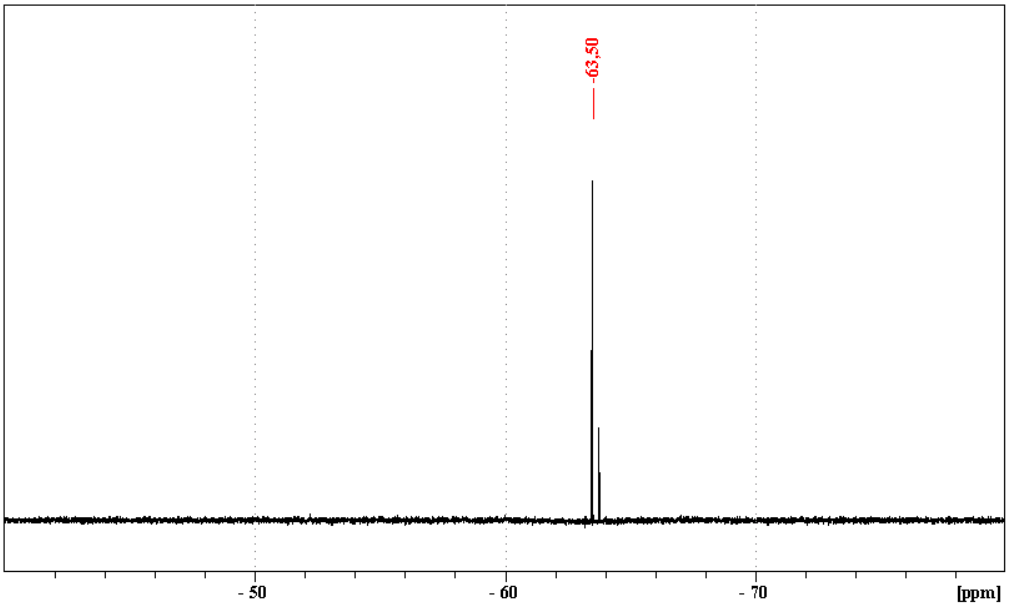
Slika 94. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **7** izoliranog iz uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)aniline pri 224 nm.



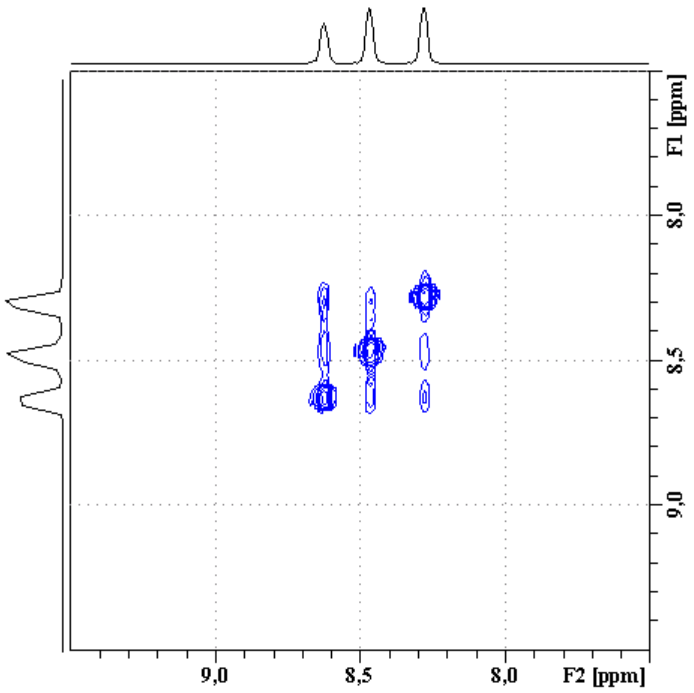
Slika 95. Spektar ESI-MS spoja **7**.



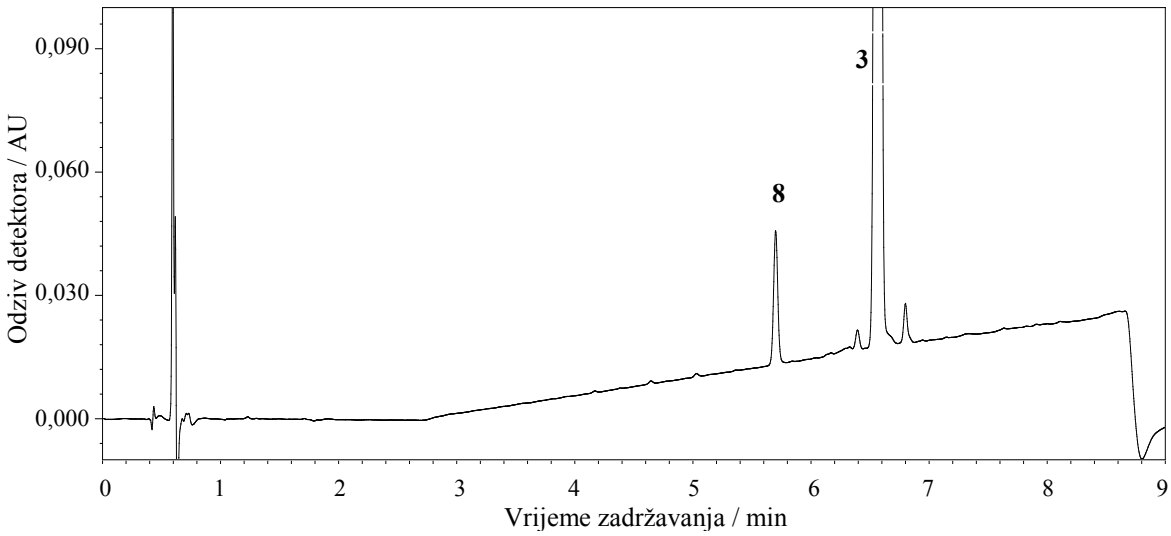
Slika 96. Spektar ^{1}H NMR spoja **8** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



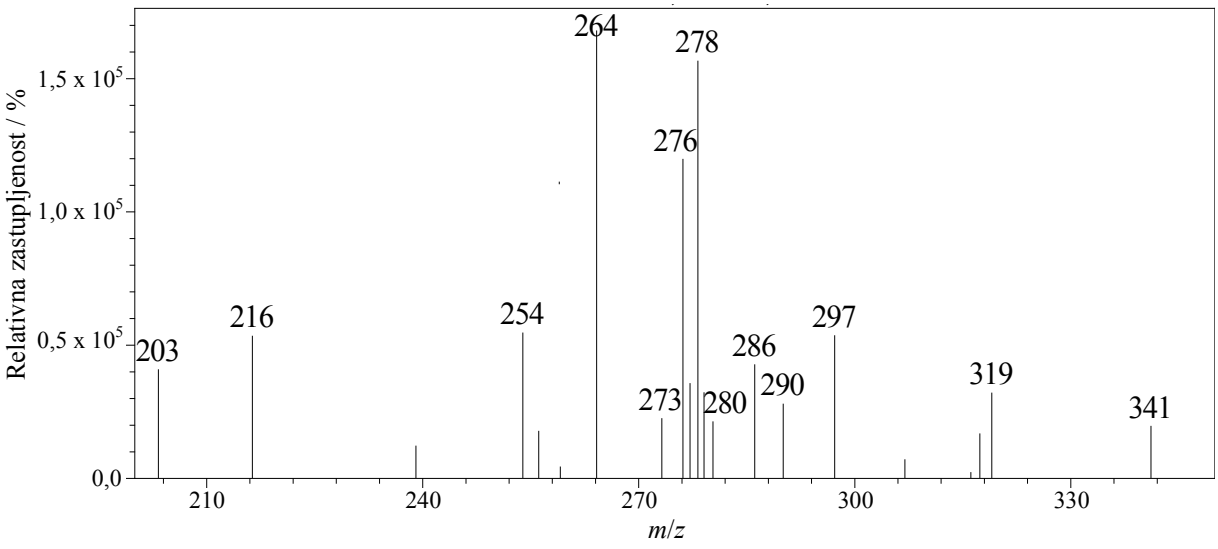
Slika 97. Spektar ^{19}F NMR spoja **8** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



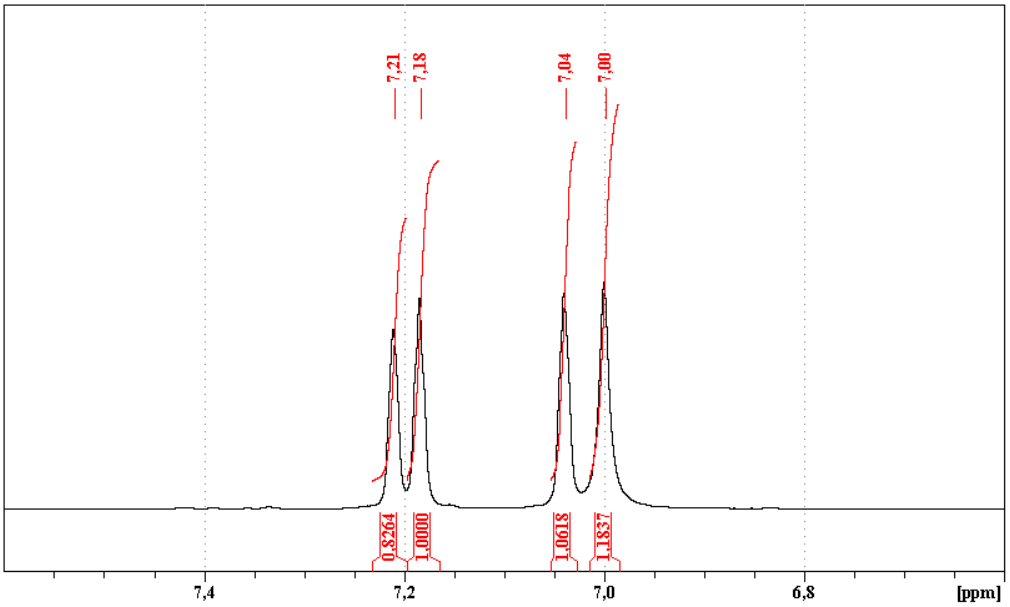
Slika 98. Spektar 2D COSY NMR spoja **8** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



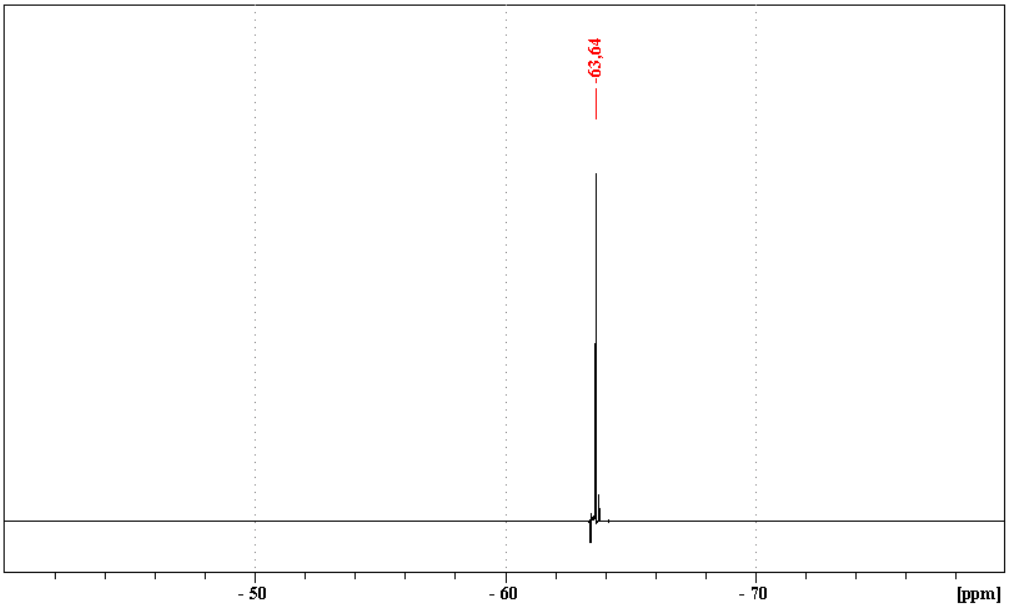
Slika 99. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **8** izoliranog iz uzorka **II** 3-brom-5-(trifluormetil)aniline pri 224 nm, onečišćenog spojem **3**.



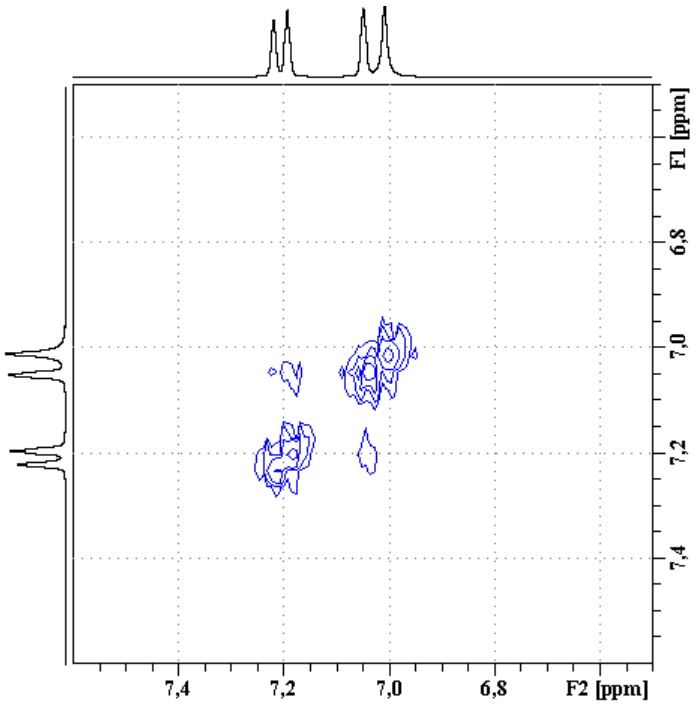
Slika 100. Spektar ESI-MS spoja **8**.



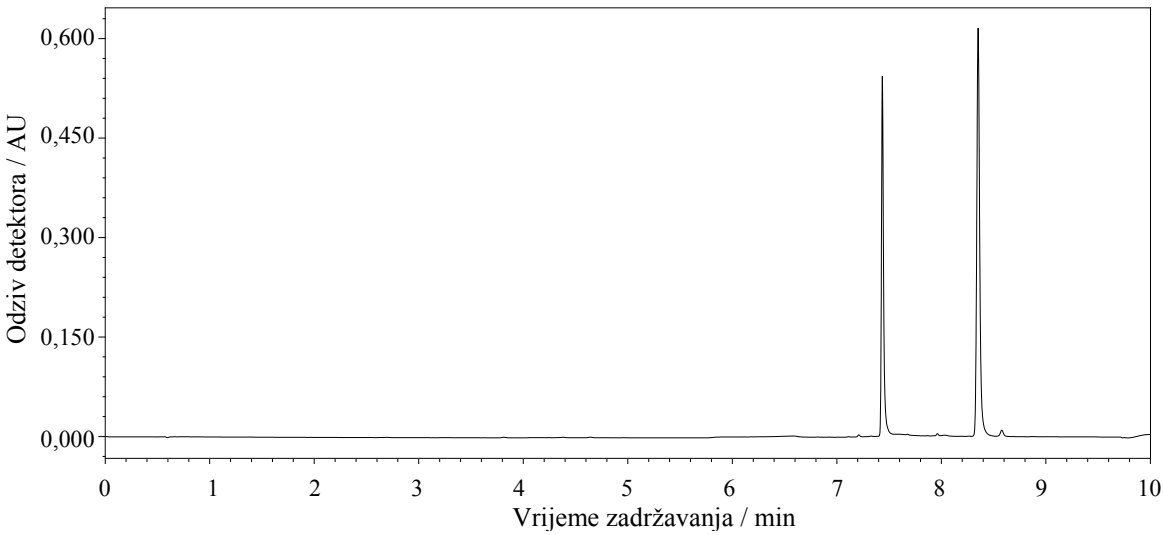
Slika 101. Spektar ^{1}H NMR spoja **9** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



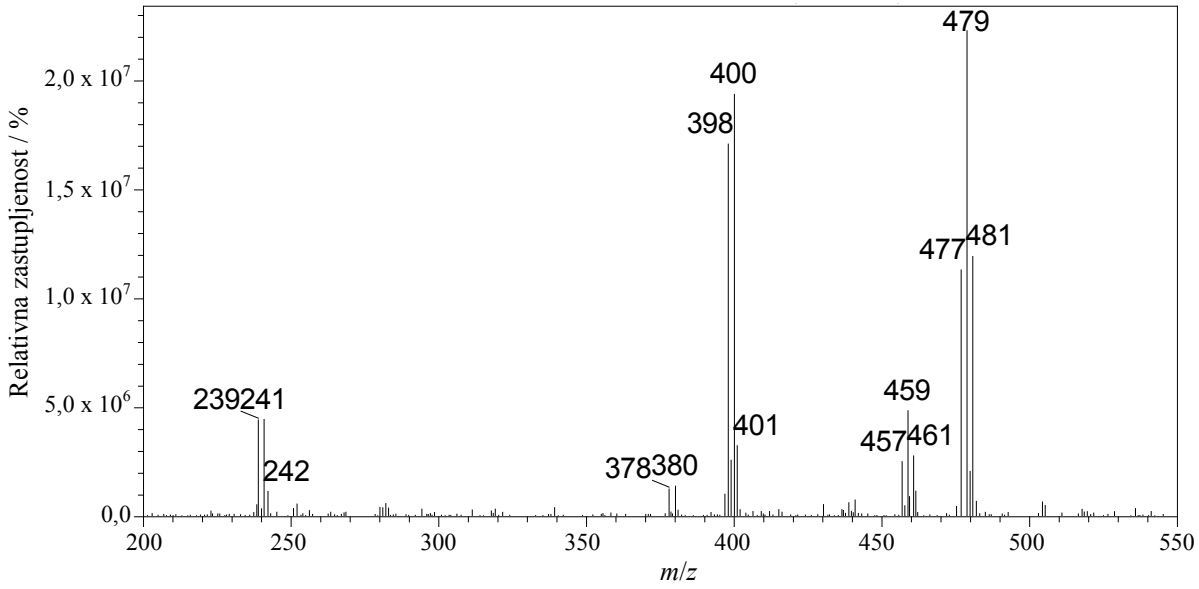
Slika 102. Spektar ^{19}F NMR spoja **9** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



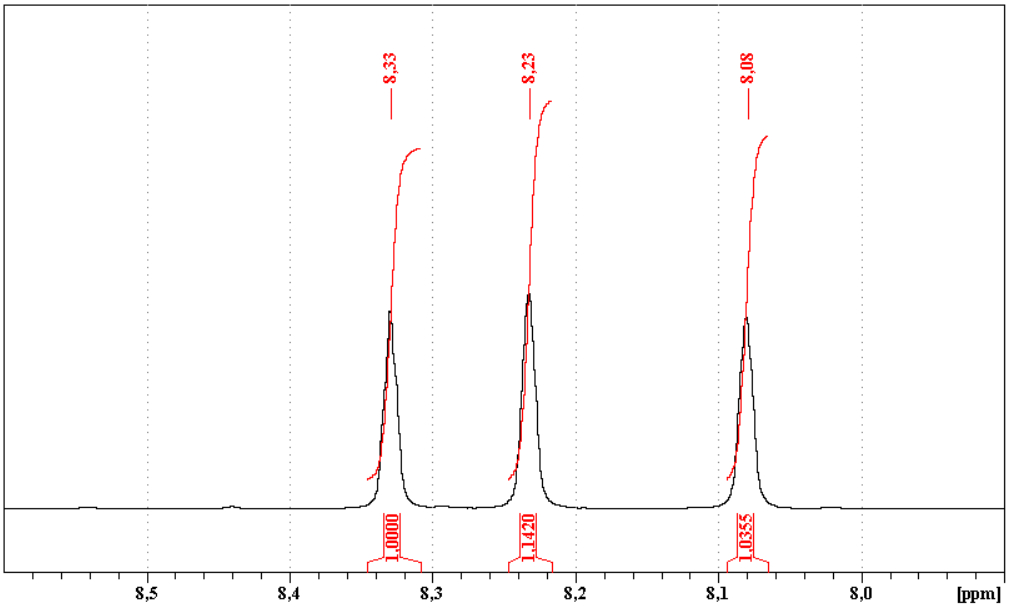
Slika 103. Spektar 2D COSY NMR spoja **9** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



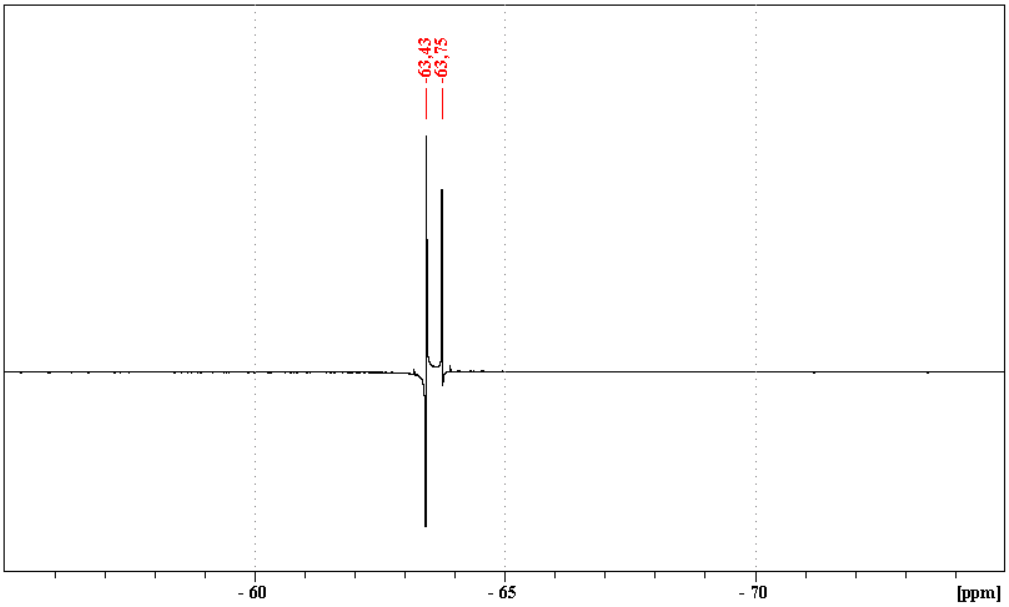
Slika 104. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **9** izoliranog iz uzorka **III** 3-brom-5-(trifluormetil)aniline pri 274 nm.



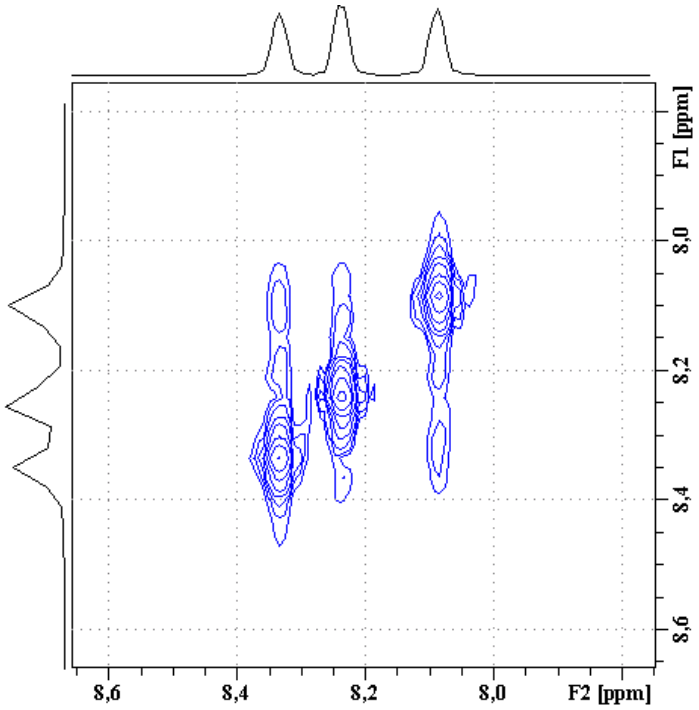
Slika 105. Spektar ESI-MS spoja **9**.



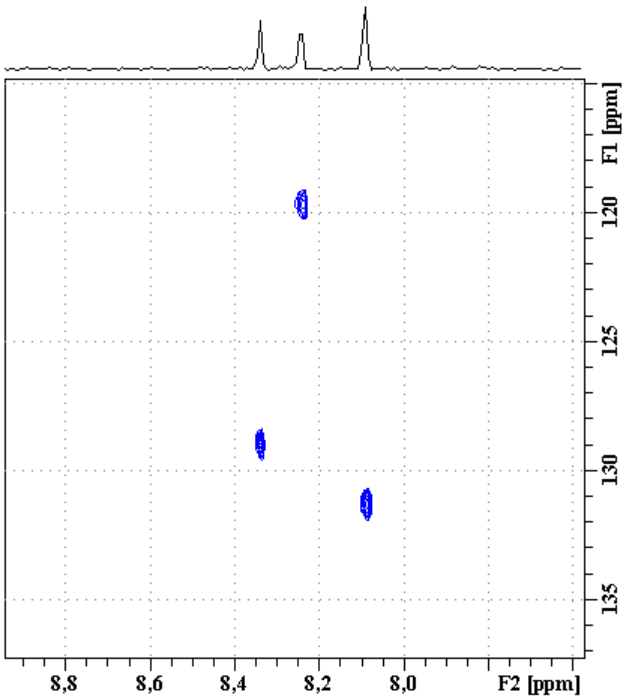
Slika 106. Spektar ^{1}H NMR spoja **10** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



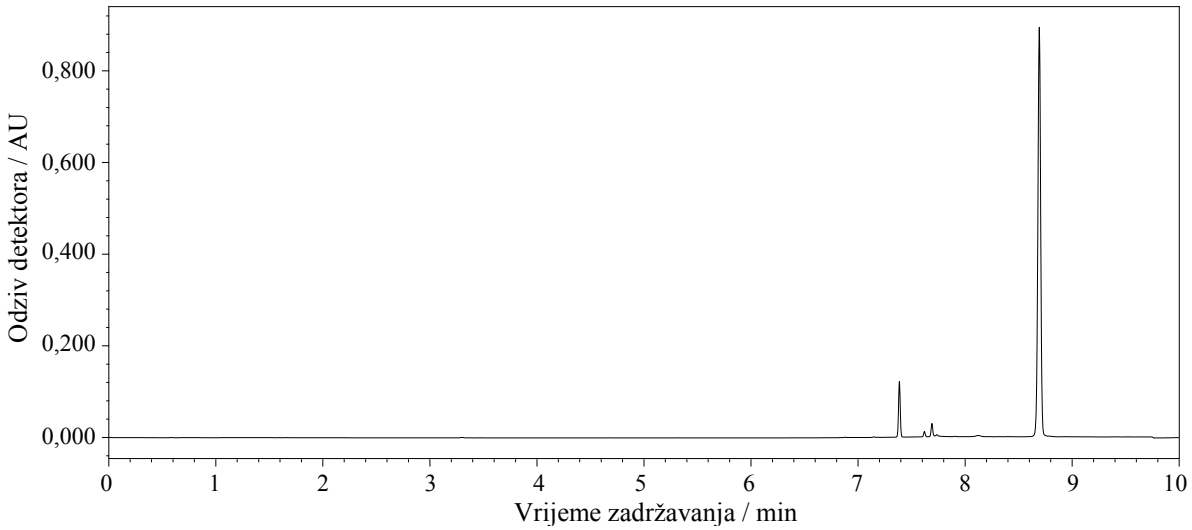
Slika 107. Spektar ^{19}F NMR spoja **10** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



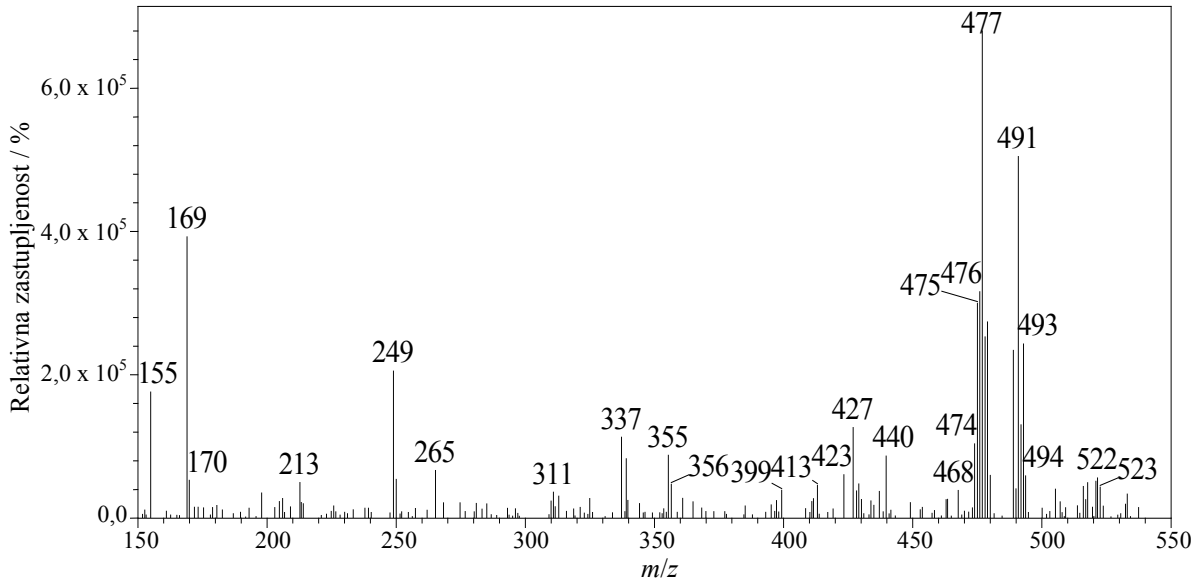
Slika 108. Spektar 2D COSY NMR spoja **10** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



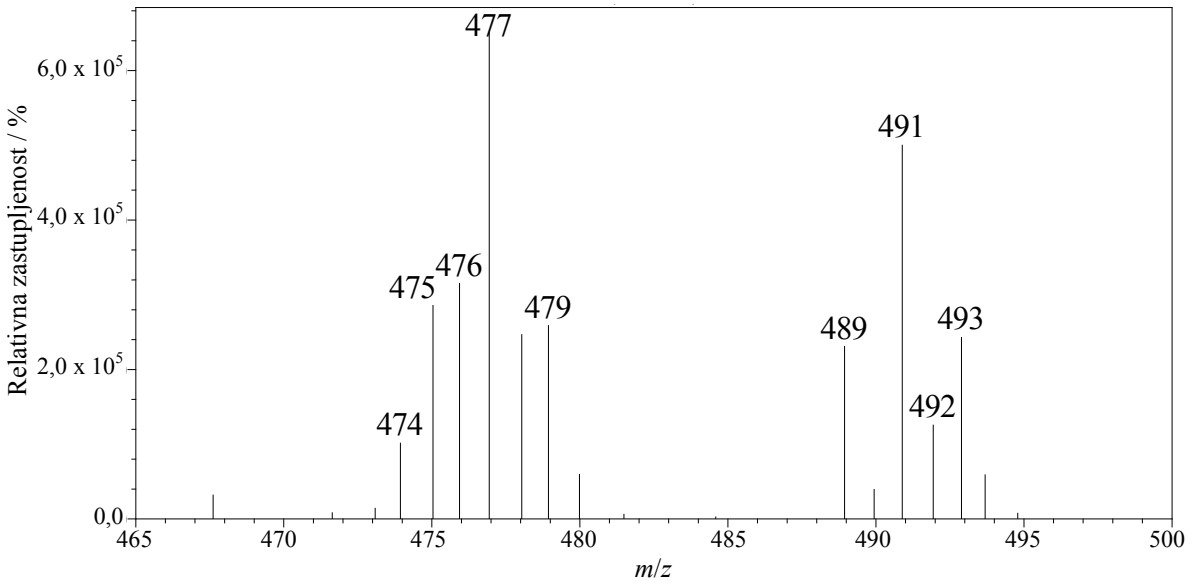
Slika 109. Spektar 2D ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spoja **10** u acetonitrilu-d_3 pri 298 K.



Slika 110. UHPLC-UV-DAD kromatogram spoja **10** izoliranog iz uzorka **III** 3-brom-5-(trifluormetil)aniline pri 274 nm.



Slika 111. Spektar ESI-MS spoja **10** (uz negativnu ionizaciju).



Slika 112. Uvećani spektar ESI-MS spoja **10** (uz negativnu ionizaciju).

§ 9. ŽIVOTOPIS

Miroslava Harča rođena je 28. prosinca 1983. godine u Koprivnici.

Obrazovanje:

2002.–2007. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, dipl. ing. kemije

1998.–2002. Gimnazija Ivana Zakmardija Dijankovečkoga, Križevci

Radno iskustvo:

2015.– danas PLIVA Hrvatska d.o.o., TAPI Istraživanje i razvoj, Viši voditelj grupe

2009.– 2015. PLIVA Hrvatska d.o.o., TAPI Istraživanje i razvoj, Voditelj grupe

2007.– 2009. PLIVA Hrvatska d.o.o., Kemija, Razvoj analitike Kemije, Analitičar

Nagrade i postignuća:

2002.–2007. Stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske

Članstva:

2018.– Hrvatsko kemijsko društvo

Znanstveni radovi u časopisima (1)

1. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan, P. Novak, Rapid identification of unknown impurities in 3-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline by LC-SPE/NMR, *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 543–547.

Priopćenja znanstvenim skupovima (4)

1. M. Harča, Separation/Isolation/Structure elucidation via LC-SPE/NMR, 18th International Chromatography School, Zagreb, Hrvatska, 2018. (predavanje).
2. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan, P. Novak, Structural characterization of impurities in 3-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline by LC-SPE/NMR, 25. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Poreč, Hrvatska, 2017. (poster).

3. Habinovec, Ž. Car, R. Ribić, I. Biljan, K. Pičuljan, M. Harča, T. Jednačak, N. Galić, S. Tomić, P. Novak, E. Meštrović, LC-SPE (cryo)NMR approach to the impurity profiling of 7-ethyltryptophol, Math/Chem/Comp, Dubrovnik, Hrvatska, 2016. (poster).
4. M. Harča, Derivatization approach, Informa Life Sciences' 7th Annual Genotoxic Impurities, Berlin, Germany, 2014. (predavanje).