University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Anamarija Knežević

SYNTHESIS AND EVALUATION OF CHIRAL STATIONARY PHASES CONTAINING *N*-(1-ARYLPROPYL)-3,5-DINITROBENZAMIDE SELECTOR

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anamarija Knežević

SINTEZA I EVALUACIJA KIRALNIH NEPOKRETNIH FAZA TEMELJENIH NA *N*-(1-ARILPROPIL)-3,5-DINITROBENZAMIDNOM SELEKTORU

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Vladimir Vinković

Zagreb, 2013.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Anamarija Knežević

SYNTHESIS AND EVALUATION OF CHIRAL STATIONARY PHASES CONTAINING *N*-(1-ARYLPROPYL)-3,5-DINITROBENZAMIDE SELECTOR

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Vladimir Vinković

Zagreb, 2013.

Veliko hvala mom mentoru dr. sc. Vladimiru Vinkoviću na tome što je uvijek bio dostupan za savjet, na dobrim idejama i najviše na tome što sam uvijek znala u kojem smjeru ići i koji je cilj ovog doktorata.

Svim članovima CATBIO-a – Zdenku, Andreji, Darku, Marinu, Maji, Trpimiru, Ani, Ireni i Mirjani veliko hvala na pomoći i na veseloj atmosferi u labosu. Već je velika pomoć kad znaš da uvijek nekoga možeš pitati za savjet. Veliko hvala Darku na punjenju kolona. Posebno hvala Ani na finim kolačima koji su održavali našu tjelesnu težinu uvijek u plusu, Ireni na odličnim savjetima u labosu i Mirjani na dodatnom paru ruku za kromatografije.

Hvala i mojim privremenim cimerima u labosu, Lidiji i Nikoli, na uvijek dobrom raspoloženju u kutu labosa.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Centra za NMR Instituta Ruđer Bošković na brzom snimanju spektara i odličnoj suradnji.

Mojoj obitelji – mami Kaji, tati Vlatku, sekama Barbi, Toni i Luci te Marinku, koji su mi tijekom cijelog školovanja bili velika podrška, veliko hvala. Hvala na svemu i mojim Kneževićima, a posebno Božani koja je uvijek bila spremna uskočiti kao dadilja.

Na kraju hvala Tihi na podršci, na tome što uvijek zna što reći i što je jednostavno najbolji muž i najbolji tata. Sve je puno lakše kad imaš nekoga tko je uvijek uz tebe. I naravno hvala mojoj Eni koja svojim osmijehom i najgori dan pretvori u radost. I maloj mrvici koja uskoro dolazi družiti se s nama...

Sadržaj

SAŽETAK XIII

ABSTRACT XV

§ 1. UVOD 1

1.1. Definicija problema 1

1.2. Svrha rada 3

§ 2. LITERATURNI PREGLED 5

2.1. Kiralnost 5

2.1.1. Enantiomerna čistoća 7

2.1.2. Metode određivanja enantiomernog viška 8

2.1.3. Osnovni pojmovi u enantioselektivnoj kromatografiji 11

2.2. Kiralna tekućinska kromatografija 15

2.2.1. Podjela kiralnih nepokretnih faza 15

2.2.2. Mehanizam kiralnog prepoznavanja 16

2.2.3. Četkolike kiralne nepokretne faze 19

2.2.4. Usporedba HPLC i UHPLC tehnika u kiralnoj kromatografskoj analizi 23

2.2.5. Kiralna kromatografija danas 24

2.3. Metode priprave enantiomerno čistih spojeva 28

2.3.1. Enzimska kataliza 29

2.3.2. Candida antarctica lipaza B 32

2.3.3. Kinetička rezolucija pomoću CAL-B 36

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 41

3.1. Opće napomene 41

3.2. Priprava kiralnih nepokretnih faza **KNF-1 – KNF-9** 43

*3.2.1. Sinteza etil-(E)-3-arilprop-2-enoata **A1** – **A9*** 43

*3.2.2. Sinteza (E)-3-arilprop-2-en-1-ola **B1** – **B9*** 48

*3.2.3. Sinteza (E)-3-arilalil-2,2,2-trikloracetimidata **C1** – **C9*** 52

*3.2.4. Sinteza N-(1-arilalil)-2,2,2-trikloracetamida **D1** – **D9*** 56

*3.2.5. Sinteza (±)-1-arilprop-2-en-1-amina **E1** – **E9*** 61

*3.2.6. Sinteza (±)-N-(1-arilalil)-2-metoksiacetamida i (±)-N-(1-arilalil)acetamida **F1** – **F9*** 65

*3.2.7. Enzimska rezolucija (±)-1-arilprop-2-en-1-amina **E1** – **E9*** 70

*3.2.8. Sinteza (S)-N-(1-arilpropil)-3,5,-dinitrobenzamidnih selektora **KS-1** – **KS-9*** 72

*3.2.9. Priprava **KNF-1** – **KNF-9*** 80

3.3. Analiti upotrebljeni za testiranje pripravljenih KNF 83

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 85

4.1. Priprava kiralnih nepokretnih faza **KNF-1 – KNF-9** 85

4.1.1. Retrosinteza molekule selektora 85

4.1.2. Priprava (E)-nezasićenih alkohola 86

4.1.3. Priprava (±)-1-arilprop-2-en-1-amina 88

4.1.4. Enzimska rezolucija (±)-1-arilprop-2-en-1-amina 90

*4.1.5. Priprava (S)-N-(1-arilpropil)-3,5,-dinitrobenzamidnih selektora **KS-1** – **KS-9*** 94

*4.1.6. Priprava kiralnih nepokretnih faza **KNF-1** – **KNF-9*** 99

4.2. Evaluacija kiralnih nepokretnih faza **KNF-1 – KNF-9** 101

*4.2.1. Odjeljivanje enantiomera standardnog seta racemičnih analita na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9*** 101

*4.2.2. Odjeljivanje enantiomera nesteroidnih protuupalnih lijekova na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9*** 113

*4.2.3. Odjeljivanje enantiomera 3-hidroksibenzodiazepinskih lijekova na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9*** 117

4.3. Usporedba rezultata odjeljivanja enantiomera na **KNF-1** – **KNF-9** 121

§ 5. ZAKLJUČAK 126

§ 6. POPIS KRATICA 129

§ 7. LITERATURNI IZVORI 130

§ 8. DODATAK XVIII

§ 9. ŽIVOTOPIS XX

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

SINTEZA I EVALUACIJA KIRALNIH NEPOKRETNIH FAZA TEMELJENIH NA *N*-(1-ARILPROPIL)-3,5-DINITROBENZAMIDNOM SELEKTORU

Anamarija Knežević
Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Pripravljena je serija od devet novih kiralnih nepokretnih faza (KNF) četkolikog tipa koje karakterizira maksimalno smanjen broj akiralnih mjesta interakcije. Sintetizirane KNF se razlikuju u aromatskoj skupini vezanoj neposredno na kiralni centar. Kiralni selektor, *N*-(1-arilpropil)-3,5-dinitrobenzamidna jedinica, ima sva svojstva dobrog selektora – rigidan je, te sadrži snažnu π-akceptorsku (3,5-dinitrobenzoilnu) i snažnu π-donorsku aromatsku skupinu.

Ključni međuprodukti u sintezi su enantiomerno čisti alil-aril-amini koji su priređeni enzimskom rezolucijom. Racemični amini su dobiveni Overmanovom pregradnjom iz acikličkih imidata. Alkoholi, koji su polazni spojevi za odgovarajuće imidate, su priređeni iz dostupnih aldehida Knoevenagelovom reakcijom i redukcijom nastalog estera.

Sintetizirani enantiomerno čisti selektori se vežu na silikagel na način koji ne uvodi dodatne polarne skupine u strukturu KNF. Pripremljene KNF su testirane na trideset različitih racemičnih spojeva. Dobiveni rezultati su uspoređeni te su dobiveni podaci o utjecaju aromatske skupine na enantioseparaciju analita. Kromatografska evaluacija je pokazala da nove KNF odjeljuju enantiomere širokog spektra spojeva, a najkvalitetnije rezultate su pokazale one koje sadrže selektor s naftilnim supstituentom.

(135 stranica, 48 slika, 15 shema, 17 tablica, 113 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: aromatske interakcije / četkolike kiralne nepokretne faze / enzimska rezolucija amina / Knoevenagelova reakcija / Overmanova pregradnja

Mentor: Dr. sc. Vladimir Vinković, znan. savj.

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović
Dr. sc. Vladimir Vinković, znan. savj.
Izv. prof. dr. sc. Nives Galić

Rad prihvaćen: 4. prosinca 2013.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND EVALUATION OF CHIRAL STATIONARY PHASES CONTAINING *N*-(1-ARYLPROPYL)-3,5-DINITROBENZAMIDE SELECTOR

Anamarija Knežević
Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

A set of nine new brush-type chiral stationary phases (CSPs) which possess fewer achiral adsorption sites was synthesized. Prepared CSPs differ in aromatic units directly linked to the chiral center. Chiral selector, the *N*-(1-arylpropyl)-3,5-dinitrobenzamide unit, has all the properties of a good selector – it is rigid and contains a strong π-accepting 3,5-dinitrobenzoyl and a strong π-donating aromatic group.

The key intermediates in the synthesis are enantiomericaly pure allyl aryl amines prepared by enzymatic resolution. Racemic amines were obtained by Overman rearrangement of acyclic imidates. Imidates were prepared from the corresponding alcohols which were synthesized from available aldehydes in a Knoevenagel reaction followed by ester reduction.

The method for binding the chiral selector to silica gel was selected in such a manner that additional polar groups were not introduced. Thirty various racemic analytes were used to evaluate the prepared CSPs. The results were compared and the influence of the aromatic unit on enantioseparation of the analytes was demonstrated. Chromatographic evaluation showed that the new CSPs separate enantiomers of a wide range of compounds and the best results demonstrate CSPs that contain a selector with the naphthyl substituent.

(135 pages, 48 figures, 15 schemes, 17 tables, 113 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: aromatic interactions / brush-type chiral stationary phases / enzymatic resolution of amines / Knoevenagel reaction / Overman rearrangement

Supervisor: Dr. Vladimir Vinković, Senior Scientist

Reviewers: Dr. Srđanka Tomić-Pisarović, Professor
Dr. Vladimir Vinković, Senior Scientist
Dr. Nives Galić, Associate Professor
Thesis accepted: 4th December 2013.

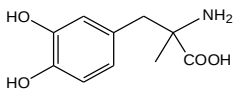
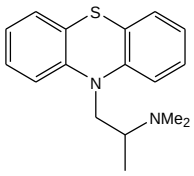
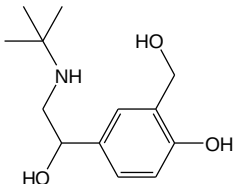
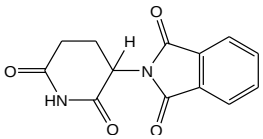
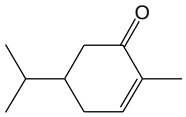
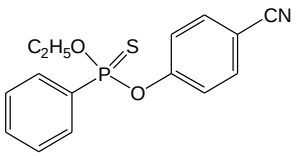
§ 1. UVOD

1.1. Definicija problema

Iako se enantiomeri spoja ne razlikuju po kemijskim i fizikalnim svojstvima u akiralnom mediju, njihova biološka aktivnost često je vrlo različita. Enantiomeri biološki aktivnih sintetskih spojeva, među kojima su najbitniji lijekovi, se razlikuju u farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima, tablica 1, jer su molekule s kojima u organizmu ulaze u interakciju također kiralne.[1] Stoga svakom kiralnom lijeku mora biti poznata enantiomerna čistoća, enantiomeri razdvojeni te ispitana svojstva i utjecaj oba enantiomera.[2,3]

Razvojem farmaceutske, prehrambene, kozmetičke i agrokemijske industrije pojavila se velika potreba za točnim, pouzdanim i prikladnim metodama određivanja enantiomerne čistoće i apsolutne konfiguracije. Postoje brojne metode za određivanje enantiomernog viška te za rezoluciju racemata. Kako bi se odredila optička čistoća spoja, prije svega je potrebno spoj dovesti u kiralno okruženje. Prije sredine 1960-ih enantiomerna čistoća se obično određivala mjerenjem optičkog skretanja koje ima brojna ograničenja. Tada su M. Raban i K. Mislow pokazali da se pripravom derivata s optički čistim reagensom enantiomeri mogu razlikovati pomoću NMR spektroskopije.[4] U reakciji para enantiomera s enantiomerno čistim reagensom nastaju dva dijastereomera koji imaju različite kemijske pomake u NMR spektru. Velika prednost ove metode je bila što nije bilo potrebno poznavati vrijednost kemijskog pomaka za enantiomerno čisti spoj. Važnost ove metode je i u tome što su se iz ovih mehanističkih osnova razvile kromatografske metode. U početku su to bile indirektne metode koje su se temeljile na derivatiziaciji spoja s kiralnim reagensom i analizi nastalog dijastereomernog para na akiralnim nepokretnim fazama. Potom su razvijene i direktne metode u kojima se analiza racemičnog spoja odvija na kiralnim nepokretnim fazama (KNF) pri čemu nije potrebna prethodna derivatizacija.

Tablica 1. Biološka aktivnost enantiomera raznih spojeva u farmaceutskoj, prehrambenoj i agrokemijskoj industriji

Struktura		Biološka aktivnost	
α-Metildopa		*R*	Neaktivan
		S	Djeluje protiv povišenog tlaka
Prometazin		*R*	Antihistaminsko djelovanje
		S	Antihistaminsko djelovanje
Albuterol		*R*	Bronhodilator Aktivni enantiomer
		S	Bronhodilator Manje djelotvoran enantiomer
Talidomid		*R*	Teratogen
		S	Sedativ
Karvon		*R*	Miris metvice
		S	Miris kima
Cijanofenfos		*R*	20 puta jači insekticid Jednaka toksičnost kod miševa
		S	Slabiji insekticid

Kiralna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je danas zasigurno vodeća metoda u analizi kiralnih spojeva. Prva komercijalno dostupna kiralna kolona za HPLC pojavila se 1981. godine.[5] Kao KNF može se upotrijebiti gotovo svaki enantiomerno obogaćen spoj vezan na inertnu podlogu (najčešće silikagel). Međutim, ne može se unaprijed znati hoće li pripravljena KNF odjeljivati enantiomere određenog spoja, a ukoliko do odjeljivanja enatiomera dođe, u većini slučajeva nije moguće pretpostaviti redoslijed izlaženja enantiomera. Razlog tome je vrlo kompliciran mehanizam kiralnog prepoznavanja između KNF i enantiomera analita koji dosad nije u

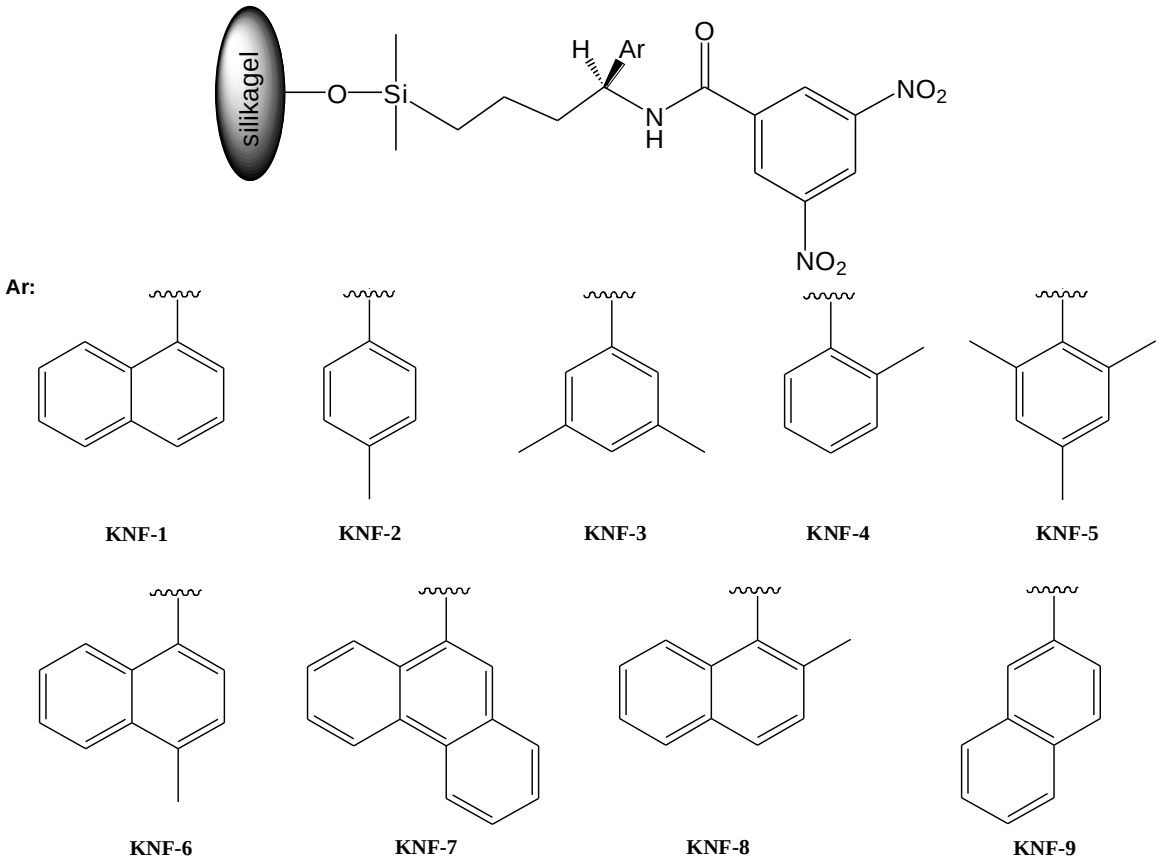
potpunosti razjašnjen. Brojne su prednosti ove metode, poput jednostavnosti, reproducibilnosti i brzine same analize, osjetljivosti metode te široke dostupnosti instrumenta i njegove povoljne cijene. Navedene prednosti razlog su razvoja novih metoda i novih primjena postojećih metoda[6,7] te istraživanja mehanizma kiralnog prepoznavanja s ciljem predviđanja rezultata kromatografske analize.

1.2. Svrha rada

Cilj doktorske disertacije je priprava, karakterizacija i ispitivanje učinkovitosti enantioseparacije novih kiralnih nepokretnih faza koje sadrže, u usporedbi s dosadašnjim KNF, manji broj polarnih skupina u svojoj strukturi. To su polarne skupine na površini silikagela (silanolne) i skupine preko kojih je kiralni selektor vezan na silikagel ili su u samoj strukturi selektora (najčešće amidna veza). Silanolne skupine se deaktiviraju trimetilsililnom skupinom, a smanjenje amidnih veza u strukturi KNF zahtijeva novi sintetski pristup molekuli selektora. Naime, najčešće su KNF koje u strukturi sadrže dvije amidne veze. Razlog tome je jednostavan – retrosintetski pristup ovakvih molekula dovodi do jednostavnih aminokiselina koje su prirodni spojevi te su komercijalno dostupne.[8]

Na temelju osnovnog dizajna W. H. Pirklea i suradnika te dosadašnjih rezultata ostvarenih u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković, na području kiralnog prepoznavanja na nepokretnim fazama ovog tipa,[9,10] predložena je priprava nove klase četkolikih KNF, slika 1.

Kiralni selektor, *N*-(1-arilpropil)-3,5-dinitrobenzamidna jedinica, je rigidan, te sadrži snažnu π-akceptorsku (3,5-dinitrobenzoil, DNB) i snažnu π-donorsku aromatsku (Ar) skupinu te samo jednu amidnu vezu. Pretpostavka je i da se akiralne interakcije analita s površinom silikagela mogu smanjiti uvođenjem dovoljno velikog aromatskog supstituenta u blizini kiralnog središta što bi dodatno poboljšalo enantioseparaciju. Predložena je priprava serije novih KNF koje se razlikuju u aromatskoj skupini na kiralnom centru. Aromatske skupine uključuju 1-natfilnu (**KNF-1**), 4-metilfenilnu (**KNF-2**), 3,5-dimetilfenilnu (**KNF-3**), 2-metilfenilnu (**KNF-4**), 2,4,6-trimetilfenilnu (**KNF-5**), 4-metil-1-naftilnu (**KNF-6**), 9-fenantrilnu (**KNF-7**), 2-metil-1-naftilnu (**KNF-8**) i 2-naftilnu (**KNF-9**) skupinu.



Slika 1. Strukture predloženih novih četkolikih KNF

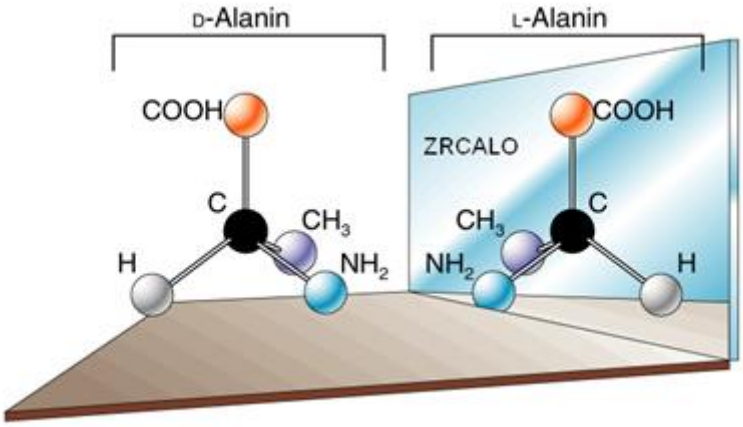
S obzirom da su četkolike KNF u pravilu dobre za odjeljivanje enantiomera samo određenih klasa spojeva, očekujemo da će pripravljene KNF biti pogodne za odjeljivanje enantiomera šireg spektra racemičnih analita. Proučavanjem djelotvornosti odjeljivanja enantiomera raznih vrsta spojeva na pripravljenim KNF, pokušat će se odrediti dodatna svojstva dobrog selektora, pretpostaviti interakcije između analita i KNF te pojasniti mehanizam kiralnog prepoznavanja.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kiralnost

Još je J.-B. Biot početkom 19. stoljeća primijetio kako neki prirodni organski spojevi zakreću ravninu polariziranog svjetla. L. Pasteur je 1848. godine uz pomoć mikroskopa razdvojio dva kristalna oblika amonijevog tartarata, soli vinske kiseline, i zaključio kako se ta dva oblika odnose kao lijeva i desna ruka. Nakon Pasteurovog otkrića, 1874. godine J. H. van't Hoff i J. A. Le Bel, neovisno jedan o drugom, pojavu zakretanja ravnine polariziranog svjetla dovode u vezu s molekulskom strukturom. Optičku aktivnost su objasnili na osnovi trodimenzijskog modela molekule u kojem pretpostavljaju kako molekule imaju asimetriju ukoliko postoji ugljikov atom s 4 različite skupine orijentirane u uglove tetraedra čiji je centar promatrani ugljikov atom.[11]

Kiralnost (grč. *cheir* = ruka) je čisto geometrijsko svojstvo: objekt je kiralan ako se ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom i akiralan kada se objekt i njegova zrcalna slika mogu preklopiti. Molekule koje su u zrcalnom odnosu, tj. odnose se kao predmet i njegova slika, a ne mogu se preklopiti, nazivaju se enantiomerima, slika 2.



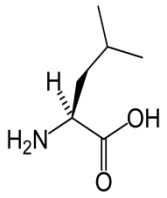
Slika 2. Enantiomeri aminokiseline alanina

Potrebno je definirati razliku između pojmova kiralno i asimetrično. Asimetrične molekule ne posjeduju niti jedan element simetrije osim identiteta. Kiralne molekule nemaju tzv. elemente simetrije višeg reda koji uključuju centar inverzije (*i*), ravninu simetrije (σ) ili rotacijsko-refleksijske osi (S_n), međutim mogu imati jednu ili više osi rotacije (C_n).[11] Stoga možemo reći kako su sve asimetrične molekule kiralne, ali sve kiralne molekule nisu asimetrične, slika 3.

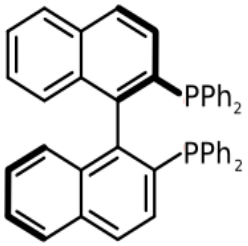
Slika 3. a) kiralni i asimetrični enantiomeri, **b)** enantiomeri koji su kiralni, ali ne i asimetični

Apsolutna konfiguracija podrazumijeva točan prostorni raspored atoma oko kiralnog središta, a opisuje se stereokemijskim deskriptorima (*R*) i (*S*). Određivanje stereoizomera spoja vrši se prema Cahn-Ingold-Prelog (CIP konvencija) pravilima (prema Robert S. Cahnu, Christopher K. Ingoldu i Vladimiru Prelogu)[12] koja definiraju prioritete skupina oko asimetričnog ugljikovog atoma. Emil Fischer je pretpostavio apsolutnu konfiguraciju (+)-gliceraldehida koja bi odgovarala konfiguraciji koja se kasnije obilježava s (*R*).[11] Konfiguracije ostalih kiralnih spojeva su u prvoj polovici 20. stoljeća povezivane s (+)-gliceraldehidom pomoću niza kemijskih reakcija koje nisu utjecale na asimetrični ugljikov atom te su na taj način određene konfiguracije mnogih spojeva. Određivanje apsolutne konfiguracije omogućeno je tek 1951. godine kada je J. M. Bijvoet[13] modificirao normalne tehnike rendgenske difrakcije kako bi dobio dubinu, odnosno treću dimenziju. Na sreću i potpuno slučajno, ispostavilo se kako je E. Fischer točno odredio konfiguraciju (+)-gliceraldehida. Stoga je i svim molekulama asigniranim do tada konfiguracija točno određena.

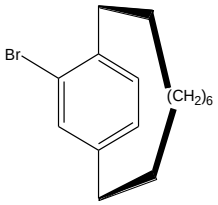
Asimetirčno supstituirani ugljikov atom je najjednostavniji primjer kiralnosti koja se naziva središnja kiralnost. Molekule različitih tipova kiralnosti mogu sadržavati i kiralne osi (osna kiralnost), kiralne ravnine (ravninska kiralnost), kiralne zavojnice (uzvojična kiralnost) ili su dio većeg sustava koji je kiralan (ciklostereoizomeri), slika 4.[14]



a) središnja kiralnost

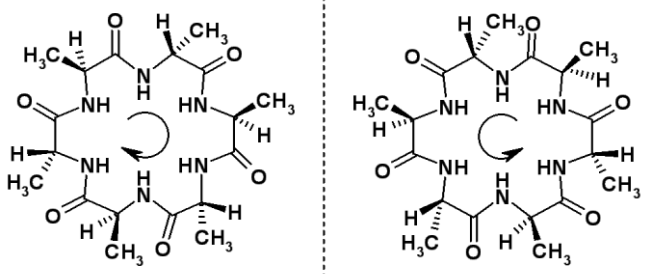


b) osna kiralnost



c) ravninska kiralnost

d) uzvojična kiralnost



e) cikloenantiomeri

Slika 4. Različite vrste kiralnosti

2.1.1. Enantiomerna čistoća

Kiralni spoj koji je smjesa jednakih količina enantiomera naziva se racemat i ne pokazuje optičku aktivnost. Optička aktivnost podrazumijeva zakretanje ravnine polariziranog svjetla za određeni broj stupnjeva. Otopina čistog enantiomera pokazuje maksimalno skretanje (α_{max}). Smjesi enantiomera koja nije racemat može se izmjeriti optičko skretanje (α_{exp}) te ukoliko je poznat podatak α_{max}, moguće je odrediti optičku čistoću (*OP*) spoja prema:[11]

$$OP(\%) = \frac{\alpha_{exp}}{\alpha_{max}} \times 100\,.$$

U idealnom slučaju, doprinos pojedinog enantiomera u optičkom skretanju je direktno proporcionalan molarnom udjelu enantiomera. Mjerenje optičkog skretanja je tradicionalna metoda određivanja sastava neracemične smjese enantiomera. Pokazalo se pak kako eksperimentalno određeno optičko skretanje nije uvijek u linearnoj vezi s optičkom čistoćom. Zato je 1971. godine uveden termin enantiomerni višak (*ev*) koji govori koliko je uzorak enantiomerno čist i računa se prema:[15]

$$ev = |\%R - \%S| = \left|\frac{R-S}{R+S} \times 100\right|$$

Naravno, enantiomerni višak od 100 % označava enantiomerno čist spoj, dok vrijednost od 0 % označava racemat. Enantiomerni višak od 80 % znači da imamo smjesu 90 % jednog enantiomera i 10 % drugoga, odnosno imamo 80 % čistog enantiomera i 20 % racemata koji ne utječe na optičku aktivnost. Određivanje enantiomernog viška zahtijeva zasebno određivanje količine pojedinog enantiomera u smjesi, što je omogućeno razvojem kiralnih kromatografskih metoda i metoda NMR spektroskopije 60-ih i 70-ih godina prošlog stoljeća.

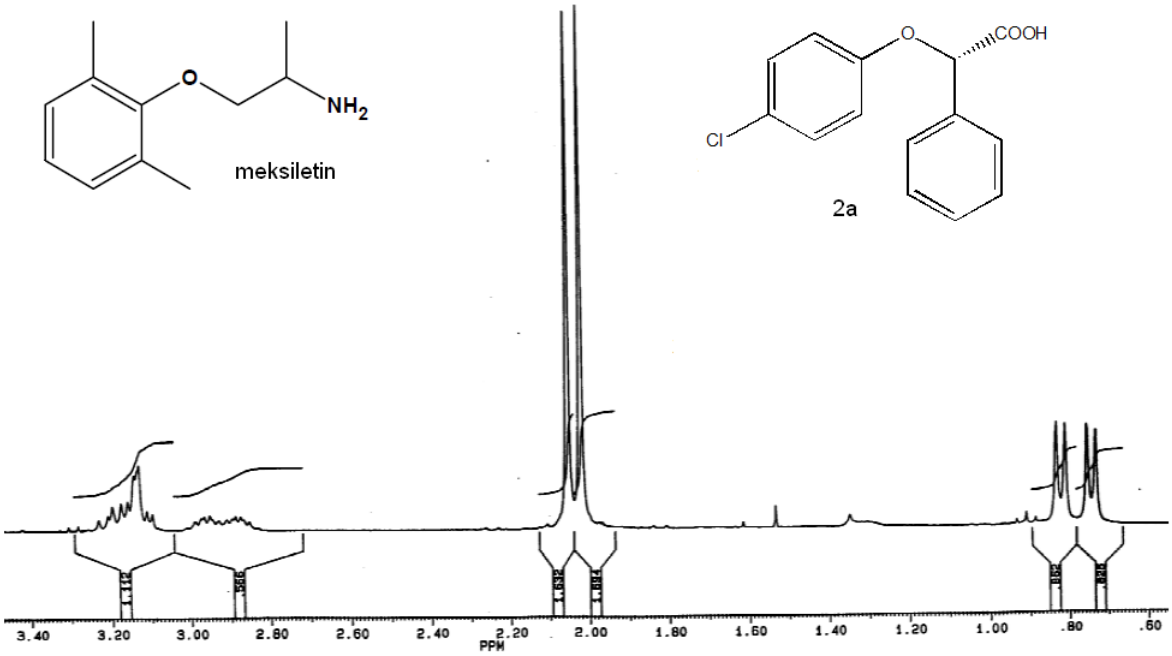
2.1.2. Metode određivanja enantiomernog viška

Tri su glavne metode kojima se određuje enantiomerna čistoća spoja: mjerenje optičkog skretanja, kromatografske tehnike određivanja omjera enantiomera (HPLC ili GC) i metode nuklearne magnetske rezonancije (NMR).[11]

Prije sredine 1960-ih enantiomerna čistoća se obično određivala mjerenjem optičke rotacije (polarimetrija) koja ima brojna ograničenja. Pokazalo se da vrijednost optičkog skretanja za neke spojeve ne ovisi linearno o sastavu enantiomera u smjesi (npr. za 2-metil-2-etiljantarnu kiselinu u raznim nepolarnim otapalima),[16] a postoje primjeri u kojima optička rotacija ne ovisi linearno o koncentraciji. Također, literaturni podaci za vrijednosti optičkog skretanja su netočni za neke spojeve koji su smatrani enantiomerno čistima. Konačno, upotreba optičkog skretanja u određivanju enantiomerne čistoće je podložna nesigurnosti zbog mogućih onečišćenja optički aktivnim nečistoćama.

Iako se enantiomeri ne mogu razlikovati u akiralnom mediju jer su rezonancije enantiotopnih jezgri izokrone, dijastereomeri se mogu razlikovati jer su im rezonancije (određenih dijastereotopnih jezgara) anizokrone. Stoga određivanje enantiomerne čistoće pomoću NMR metoda zahtijeva upotrebu kiralnih pomoćnih sredstava (engl. *chiral auxiliary*) koji smjesu enantiomera prevode u smjesu dijastereomera.[17] Dok je razlika kemijskog pomaka odgovarajućih signala dovoljno velika (rezolucija do bazne linije), integracija daje izravnu mjeru dijastereomernog sastava koja se može direktno povezati s enantiomernim sastavom izvorne smjese enantiomera, slika 5. Tri su vrste kiralnih pomoćnih sredstava koja se koriste: kiralni metalni kompleksi (prvenstveno lantanidni *shift* reagensi), kiralni

solvatirajući agensi (engl. *chiral solvating agent*, CSA), koji sa enantiomerima supstrata stvaraju dijasteromerne komplekse *in situ*, i kiralni derivatizirajući agensi (engl. *chiral derivatizing agent*, CDA), koji zahtijevaju prethodnu pripremu dijasteromera.



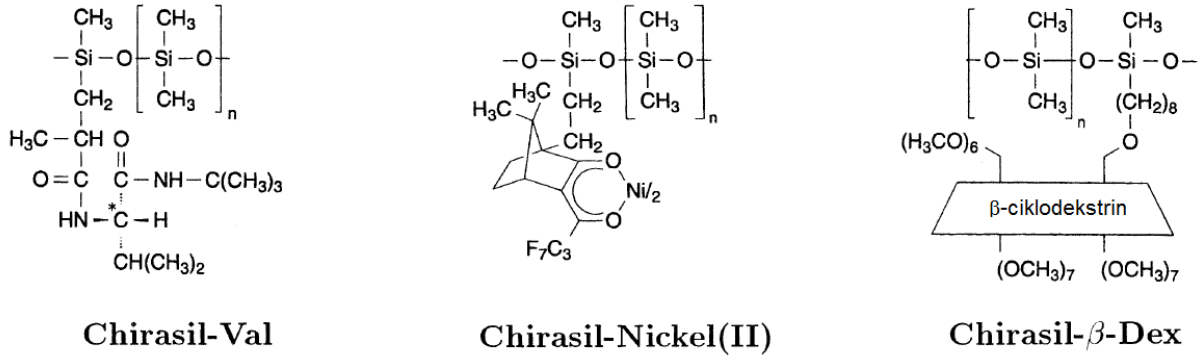
Slika 5. NMR spektar (*R*,*S*)-meksiletina u prisutnosti (*S*)-2a (rt, C_6D_6, 1:2 stehiometrija Bruker FT 300 MHz)[18]

Kromatografske metode određivanja enantiomernog viška (tekućinska i plinska kromatografija) temelje se na istom principu kao i NMR tehnike. Potrebno je dobiti dijastereomerni par koji se može zatim kromatografski razdvojiti i na kromatogramu odrediti količina oba enantiomera u smjesi. Prvo su razvijene kromatografske metode za odjeljivanje enantiomera u kojima je spoj derivatiziran kiralnim reaktantom te je nastala smjesa dijastereomera kromatografirana na akiralnoj nepokretnoj fazi. Potom su korištena kiralna pomoćna sredstva kao dodatak pokretnoj fazi pri čemu su nastajali dijastereomerni kompleksi molekula, zbog čega je adsorpcija i zadržavanje enantiomera različita na akiralnoj nepokretnoj fazi. Danas se koriste metode koje se temelje na odjeljivanju enantiomera na kiralnim nepokretnim fazama (KNF).[11]

Vrlo uobičajena metoda za analizu smjese enantiomera je kiralna plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC). Uz to što je brza, jednostavna i osjetljiva

metoda, za dobru analizu ne smetaju nečistoće u uzorku. Metoda se temelji na principu molekulske asocijacije kiralne nepokretne faze i uzorka, pri čemu dolazi do kiralnog prepoznavanja i odjeljivanja enantiomera. Enantiomeri analita dolaze u brze reverzibilne dijastereomerne interakcije s nepokretnom fazom i stoga se ispiru različitom brzinom.[14] Postoje tri najčešće vrste KNF za GC koje se razlikuju prema načinu interakcije nepokretne faze i analita, slika 6.[19] Prve karakteriziraju vodikove veze između analita i nepokretne faze koja sadrži amidne veze kao vezna mjesta supstrata. Drugi način je kompleksiranje analita pomoću kiralnog metalnog kompleksa u nepokretnoj fazi. Treća vrsta KNF za GC su ciklodekstrinske KNF koje karakterizira inkluzija analita u kiralnu šupljinu ciklodekstrina. Od navedenih KNF, one na bazi modificiranih ciklodekstrina su pokazale najširu primjenu te se u današnje vrijeme najčešće koriste.[19]

Analiza smjese enantiomera pomoću GC-a je dobra metoda za određivanje enantiomernog sastava, međutim, ograničena je na hlapljive i termički stabilne spojeve. Uzorak je moguće analizirati ukoliko ima temperaturu vrelišta nižu od 260 °C. Općenito, što je temperatura na kojoj se spoj ispire niža, to je veća mogućnost za čistu separaciju.



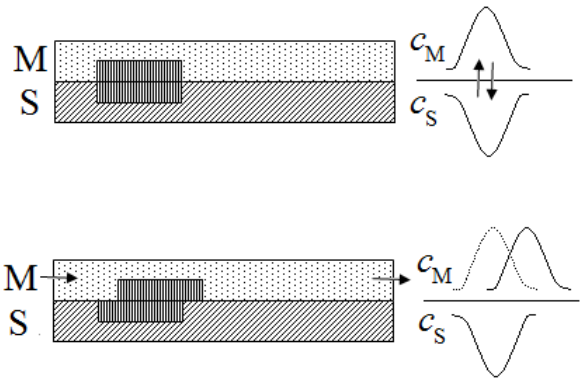
Chirasil-Val **Chirasil-Nickel(II)** **Chirasil-β-Dex**

Slika 6. Komercijalno dostupne različite vrste KNF za GC

2.1.3. Osnovni pojmovi u enantioselektivnoj kromatografiji

Svako kromatografsko odjeljivanje temelji se na uspostavljanju ravnoteže između spoja na nepokretnoj (S) i u pokretnoj fazi (M), slika 7.[20] Odnos koncentracija spoja koji se odjeljuje u pokretnoj (c_M) i nepokretnoj fazi (c_S) određen je za ravnotežno stanje (i određenu temperaturu) konstantnom razdjeljenja koja je različita za različite spojeve u smjesi:

$$K_c = \frac{c_S}{c_M}.$$

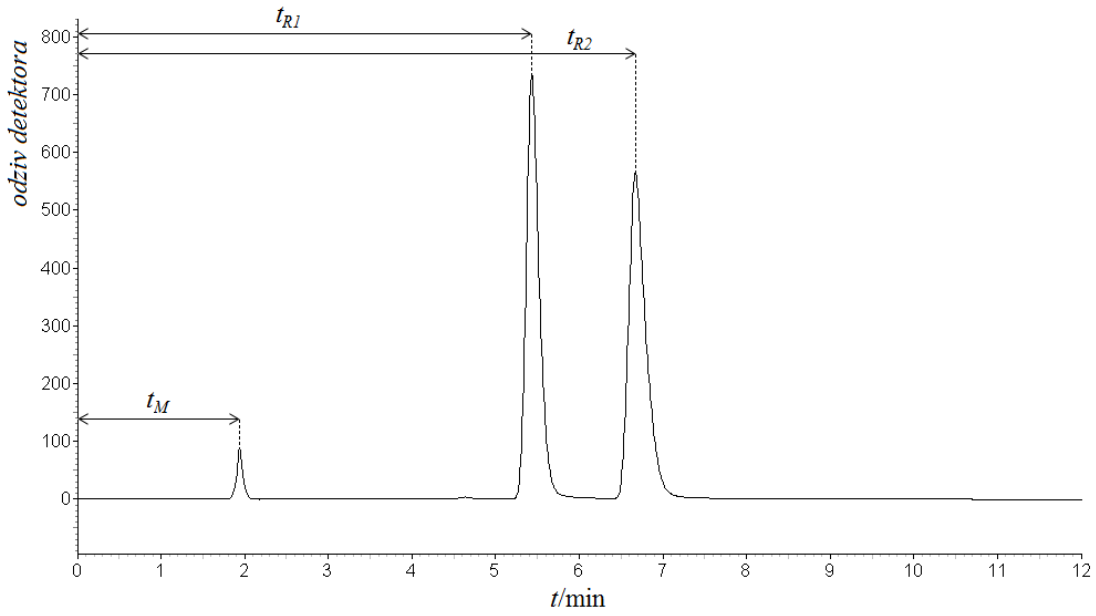


Slika 7. Uspostavljanje ravnoteže prilikom kromatografskog odjeljivanja

Veličina koja pokazuje koliko dulje se analit zadržava u koloni (t_R) u odnosu na vrijeme zadržavanja koje bi imao kada bi se kroz kolonu kretao brzinom pokretne faze (t_M), slika 8, naziva se faktor zadržavanja (k):

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}.$$

Uobičajena vrijednost faktora zadržavanja je 1 do 5. Ukoliko je manja od 1, spoj prebrzo izlazi s kolone, dok faktor veći od 20 znači da se spoj predugo zadržava na koloni.



Slika 8. Kromatogram smjese dva spoja

Kvaliteta odvajanja sastojaka na koloni (djelotvornost kolone) ovisi o učestalosti uspostavljanja ravnoteže u raspodjeli između nepokretne i pokretne faze dok pokretna faza nosi sastojak kroz kolonu i izražava se brojem teorijskih tavana (N).[21] Veličina w_b označava širinu kromatografske krivulje (pika) pri osnovici, odnosno udaljenost između sjecišta osnovne linije s tangentama povučenim u točkama infleksije, dok je w_h širina pika na polovici visine pika, slika 9a:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5{,}545 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 .$$

Selektivnost kromatografske kolone izražava se faktorom odjeljivanja (α). Kolona je selektivnija što su vremena zadržavanja odjeljivanih sastojaka (t_{R1} i t_{R2}) različitija, odnosno što je faktor odjeljivanja veći:

$$\alpha = \frac{K_{c2}}{K_{c1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} .$$

Mjera odjeljivanja dvaju sastojaka smjese koja uključuje i selektivnost i djelotvornost kolone naziva se razlučivanje (R_s):[22]

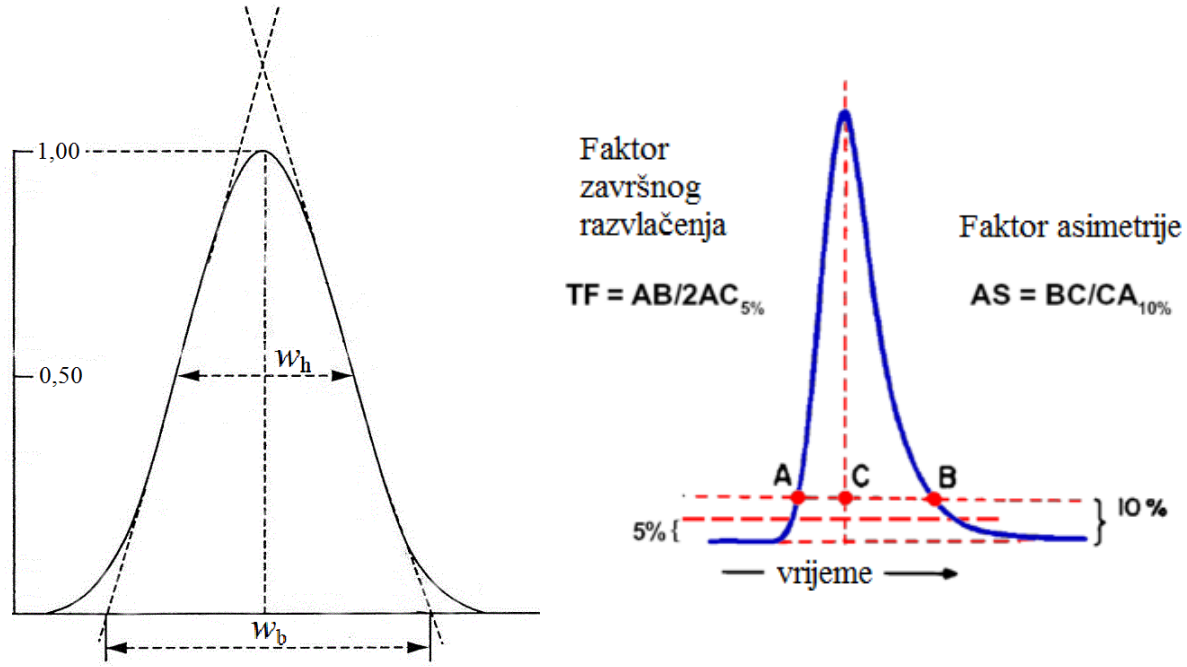
$$R_S = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} = 1{,}18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}.$$

Razlučivanje se može povezati s brojem tavana, faktorom zadržavanja i separacijskim faktorom prema sljedećoj jednadžbi:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{t_{R2}} \times \frac{\sqrt{N}}{4} = \frac{k_2 - k_1}{1 + k_2} \times \frac{\sqrt{N}}{4} = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k_2}{1 + k_2}\right).$$

Smatra se da su 2 pika potpuno razdvojena kada je vrijednost R_s veća od 1,5.

a) b)



Slika 9. a) izgled kromatografske krivulje (pika) u idealnom slučaju; b) izgled pika ukoliko postoji razvlačenje

U svim navedenim jednadžbama pretpostavka je da oblik kromatografske krivulje (pika) odgovara obliku Gaussove krivulje, slika 9a. Međutim, to često nije slučaj. Najčešće dolazi do završnog razvlačenja (povlačenja) pika i tada govorimo o asimetriji pika, slika 9b. Mjera razvlačenja pika naziva se faktor asimetrije (engl. *Asymmetry Factor, AS*) i određuje se na 10 % visine pika prema formuli:[23]

$$AS = BC / AC .$$

U farmaceutskim analizama se koristi faktor završnog razvlačenja pika (engl. *Tailing Factor, TF*) koji se određuje pri 5 % visine pika prema:

$$TF = AB / 2AC .$$

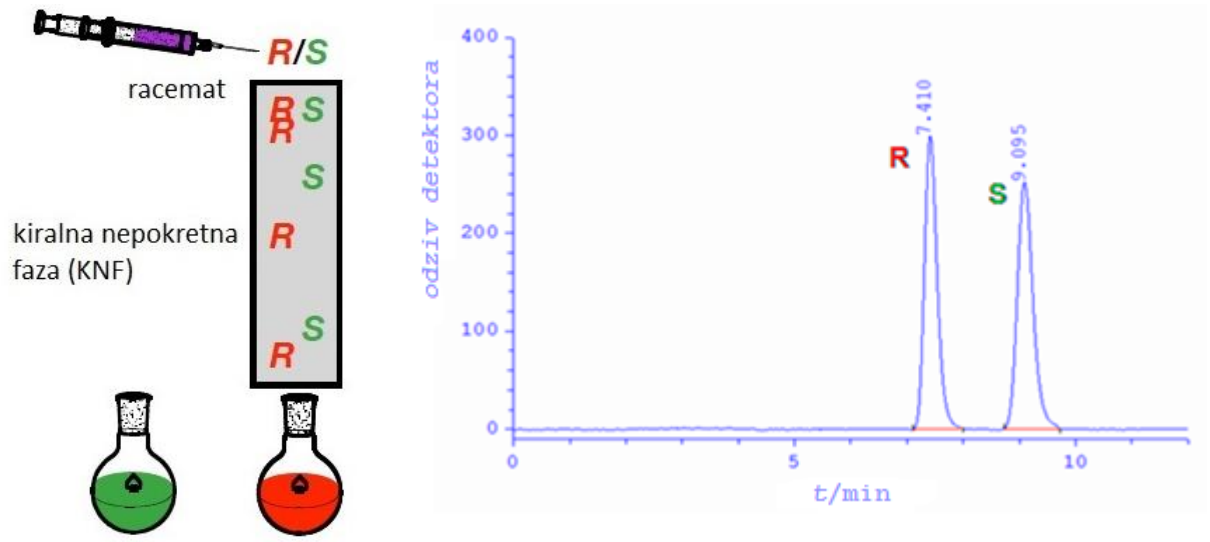
Vrijednost ovih faktora od 1,0 označava potpuno simetričan pik. U većini slučajeva faktor asimetrije i faktor završnog razvlačenja pika će biti slični, iako rijetko potpuno isti. Vrijednosti ovih faktora za nove kolone iznosi 1,0 – 1,5. Faktor završnog razvlačenja pika veći od 2,0 nije prihvatljiv zbog toga što je u tom slučaju teško precizno integrirati površinu pika.[23]

2.2. Kiralna tekućinska kromatografija

Kao KNF se može upotrijebiti gotovo svaki enantiomerno obogaćen spoj (kiralni selektor, KS) vezan na inertnu podlogu (najčešće silikagel). Interakcijom selektora i para enantiomera analita (EA) nastaju dijastereomerni kompleksi različite stabilnosti:[11]

$$(R)\text{-KS} + (S)\text{-EA} \overset{K_S}{\rightleftharpoons} [(R)\text{-KS} \cdots\cdots (S)\text{-EA}]$$
$$(R)\text{-KS} + (R)\text{-EA} \overset{K_R}{\rightleftharpoons} [(R)\text{-KS} \cdots\cdots (R)\text{-EA}].$$

Razlika u energiji između dva dijastereomerna kompleksa zbog različitih konstanti asocijacije K_R i K_S je temeljna fizikalna osnova za stereoselektivno zadržavanje u kromatografskom sustavu. Enantiomer koji pravi stabilniji kompleks dulje se zadržava na koloni, slika 10.



Slika 10. Kiralna tekućinska kromatografija i HPLC kromatogram

2.2.1. Podjela kiralnih nepokretnih faza

Ključ uspjeha za odjeljivanje enantiomera leži u dobrom odabiru odgovarajuće kiralne nepokretne faze. Zbog toga je vrlo bitno poznavanje postojećih i komercijalno dostupnih KNF i njihovih svojstava. Kao potencijalni kiralni selektori su ispitane brojne kiralne molekule, koje su prirodni organski spojevi ili su sintetizirane u stereoselektivnom obliku. Danas je na

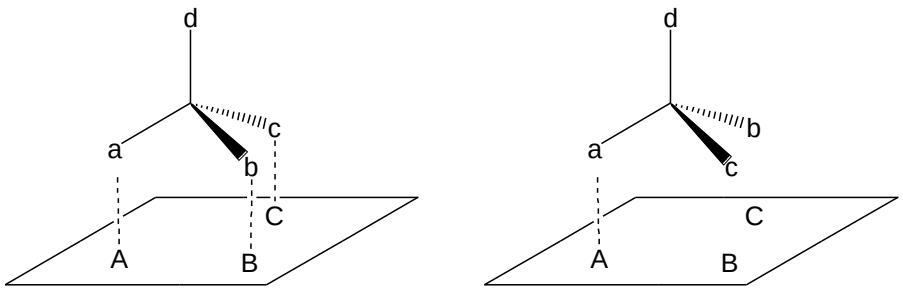
tržištu više od stotinu komercijalno dostupnih KNF, a među njima je 20 – 30 KNF koje se najčešće koriste za odjeljivanje enantiomera.

Prema kiralnom spoju koji je adsorbiran ili kovalentno vezan na inertnu podlogu, razlikujemo više vrsta KNF koje se mogu klasificirati na više načina između kojih je i:[24]

- Makromolekularni selektori
    - Derivati biopolimera (proteina, polisaharida)
    - Sintetički polimeri (politartaramidi, poli(met)akrilamidi)
- Makrociklički selektori
    - Ciklodekstrini
    - Makrociklički antibiotici
    - Kiralni krunasti eteri
- Selektori „niske“ molekulske mase
    - Četkolike (Pirkleove) KNF
    - Kiralni selektori ion-izmjenjivačkog tipa
    - Ligand-izmjenjivački selektori (kelatni agensi)

2.2.2. Mehanizam kiralnog prepoznavanja

L. H. Easson i E. Stedman su 1933. godine postavili prvi model kako bi objasnili stereoselektivno vezanje kiralne molekule na receptor proteina.[25] Ovaj model pretpostavlja kako je za kiralno prepoznavanje potrebno minimum tri točke vezanja između kiralnog supstrata i kiralnog receptora, za kojeg je pretpostavka da se tri točke vezanja nalaze u ravnini, slika 11. Međutim, često se zaboravlja i četvrti uvjet koji nije eksplicitno naveden. Supstrat može prići receptoru samo s površinske strane, a ne iz unutrašnjosti.



Slika 11. Model povezivanja kiralne molekule i receptora

Ovaj model je kasnije A. G. Ogsten primijenio i na enzimske reakcije.[26] Već 1952. godine model je primijenjen i na kromatografsko odjeljivanje enantiomera pomoću tankoslojne kromatografije.[27] Iako su se kasnije pojavili kompliciraniji modeli koji pretpostavljaju četiri točke kontakta, model interakcije između tri točke je najčešće korišten u objašnjavanju kiralnog prepoznavanja.

U kromatografiji je danas suglasnost da ne moraju sve tri interakcije biti privlačne, već su bitne i privlačne i odbojne interakcije. Također, treba imati na umu da postoje skupine koje stvaraju interakcije u više točaka. Dok vodikove veze i *end-to-end* dipolne interakcije stvaraju interakciju samo u jednoj točki, π-π interakcije i dipol-dipol slaganja su interakcije u više točaka i vrijede barem kao dva mjesta interakcije.[28]

U većini slučajeva stabilnost dijastereomernog kompleksa određena je jačinom nekovalentnih interakcija. Zbog toga su i komponente pokretne faze vrlo važan faktor za enantioseparaciju jer definiraju svojstva interakcijske okoline u kojoj se odvija kiralno prepoznavanje. Otapalo tako posreduje na specifičan način sa specifičnim kiralni selektor–analit interakcijama i utječe na jačinu i kvalitetu procesa molekularnog prepoznavanja.

Tablica 2. Vrste interakcija između selektora i analita

Vrsta interakcije	Lipofilnost	Relativna jakost /kJ mol^{-1}
Ionske interakcije (engl. *salt bridge*):	Polarno	
uz pomoć vodikove veze		40
bez vodikove veze		20
Ion–dipol interakcije		4 – 17
Vodikove veze		4 – 17
Van der Waalsove sile:		
dipol–dipol		4 – 17
dipol–inducirani dipol		4 – 17
inducirani dipol–trenutni dipol		2 – 4
π–π interakcije		4 – 17
Hidrofobne interakcije	Hidrofobno	4

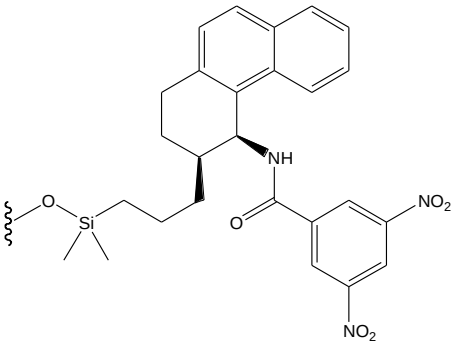
Ionske interakcije su priličko jake i zbog njihovog dugog dosega odgovorne su za uspostavljanje kontakta između selektora i analita. S obzirom na njihovu neusmjerenost, najčešće su nestereoselektivne prirode. Suprotno njima, vodikove veze, π-π interakcije i dipolne interakcije su usmjerene i kratkog dosega te se aktiviraju jedino kada postoji odgovarajuća prilično stroga geometrija vezanja, tablica 2.[24] Zbog toga su upravo te slabije interakcije najčešće odgovorne za kiralno prepoznavanje.

Vezne interakcije se nekada dijele na: „glavne“ (dominantne interakcije), koje su jače i dovode do asocijacije analita i selektora, i „sekundarne“ (pomoćne interakcije). Glavne interakcije su obično najjače nekovalentne interakcije i određuju vrijeme zadržavanja para enantiomera na KNF, dok sekundarne (kratkog dosega) utječu na enantioprepoznavanje. S obzirom da glavne interakcije većinom nisu stereoselektivne, treba ih dobro uravnotežiti kako bi sekundarne stereoselektivne interakcije imale utjecaja. Učinkovito vezanje enantiomera analita i selektora je moguće ako postoje:[24]

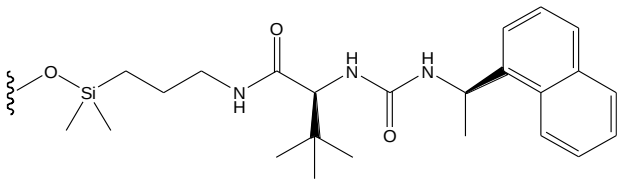
- sterička podudarnost (npr. komplementarna veličina i oblik) enantiomera analita i veznog mjesta selektora koje je često organizirano kao vezni džep ili rascijep;
- elektrostatska podudarnost (npr. povoljna geometrijska i prostorna orijentacija komplementarnih funkcionalnih skupina koje su odgovorne za elektrostatske interakcije poput ionskih interakcija, vodikovih veza, dipol-dipol interakcija, π-π interakcija, ion-π interakcija, itd.);
- hidrofobna podudarnost (npr. prostorno slaganje hidrofobnih regija oba partnera u kompleksu);
- dinamička podudarnost i inducirana podudarnost (kako bi se maksimalno pojačala interakcija vezanja pomoću dinamičkih i konformacijskih podešavanja tijekom formiranja kompleksa);
- međusobna zasićenost površine molekula analita i selektora.

2.2.3. Četkolike kiralne nepokretne faze

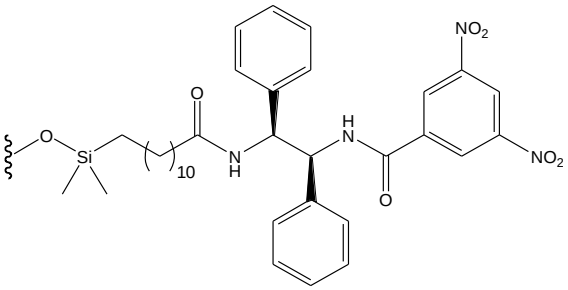
Prve uspješne kiralne separacije izvedene su na laktozi kao nepokretnoj fazi.[29] Tek je krajem 70-ih godina prošlog stoljeća uveden novi koncept u dizajnu KNF – mala kiralna organska molekula vezana preko razmaknice na silikagel.[30,31] Ovakve KNF su zbog svog oblika često nazivane četkolikima (engl. *brush-type*). Pirkle i suradnici su priredili čitav niz KNF četkolikog tipa zbog čega se ovakve KNF često nazivaju i Pirkleove. Do sada je pripremljeno preko tisuću KNF ovog tipa među kojima je nekolicina i komercijalno dostupnih, slika 12.



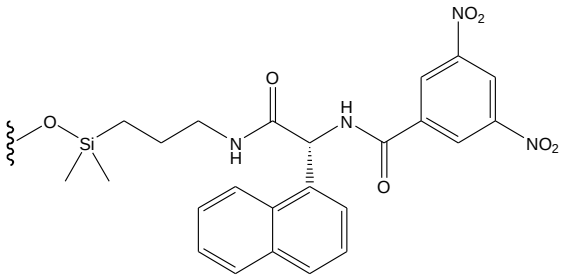
Whelk-O1



Chirex 3020



ULMO



Chirex 3005

Slika 12. Neke komercijalno dostupne kiralne nepokretne faze četkolikog tipa

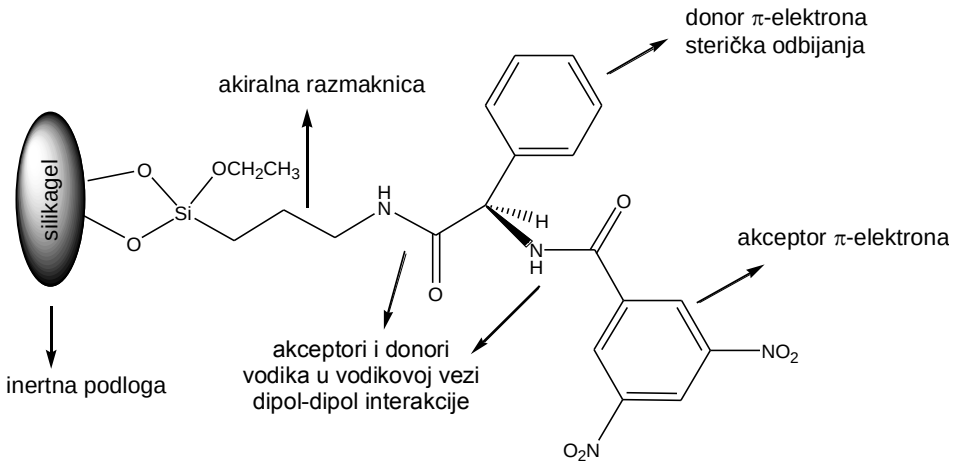
U odnosu na ostale KNF, četkolike imaju nekoliko prednosti poput kemijske i termičke inertnosti, kompatibilnosti s različitim pokretnim fazama te primjene na širok spektar analita.[32] Gotovo uvijek rade u normalnoj fazi, a razvoj metode je jednostavan i obično počinje smjesom alkana i 2-propanola kao polarne komponente (1 – 10 %) uz dodatak 0,1 % dietilamina ili trifluoroctene kiseline kao aditiva za bazične i kisele analite, te se optimizira promjenom postotka alkohola. Ovakve KNF su dostupne u obje enantiomerne

forme sa suprotnom konfiguracijom koje pokazuju obrnut redoslijed ispiranja. U odnosu na većinu ostalih KNF, posjeduju povećan kapacitet količine uzorka koja se može nanijeti na kolonu što olakšava primjenu u preparativne svrhe. Također, kod KNF ovog tipa se vrlo često koristi tzv. recipročni princip. Ukoliko je potrebna kiralna kolona za odjeljivanje određenog spoja, moguće je prirediti kiralnu kolonu vezanjem analita koji želimo razdvajati. Na tako pripremljenoj koloni se zatim analiziraju spojevi koji bi bili potencijalni selektori. Nakon što je pronađen odgovarajući spoj, priredi se kiralna kolona s tim selektorom i dobivena je dobra kiralna kolona za analizu određenog analita.

Ovakve male kiralne molekule vezane na silikagel su relativno jednoliko raspoređene na površini te su lako dostupne molekulama analita. Pretpostavlja se da su ove KNF karakterizirane monomolekularnim organskim slojem na površini silikagela kao rezultat vezanja jedne kiralne molekule na silanolnu skupinu. Kao takve ne mogu tvoriti supramolekularne strukture što olakšava identifikaciju mjesta kiralnog prepoznavanja. Također, molekulu selektora je jednostavno sintetski prirediti i moguće je izvesti promjenu u strukturi molekule na jednostavan način.[32] Zbog svega navedenog, četkolike KNF su izvrstan model za proučavanje složenog mehanizma kiralnog prepoznavanja.

Zbog složenosti procesa kiralnog prepoznavanja nemoguće je predvidjeti konačni rezultat enantioselekcije. Unatoč tome, rastom broja pripravljenih četkolikih KNF, Pirkle i suradnici su definirali neka svojstva dobrog selektora:[33]

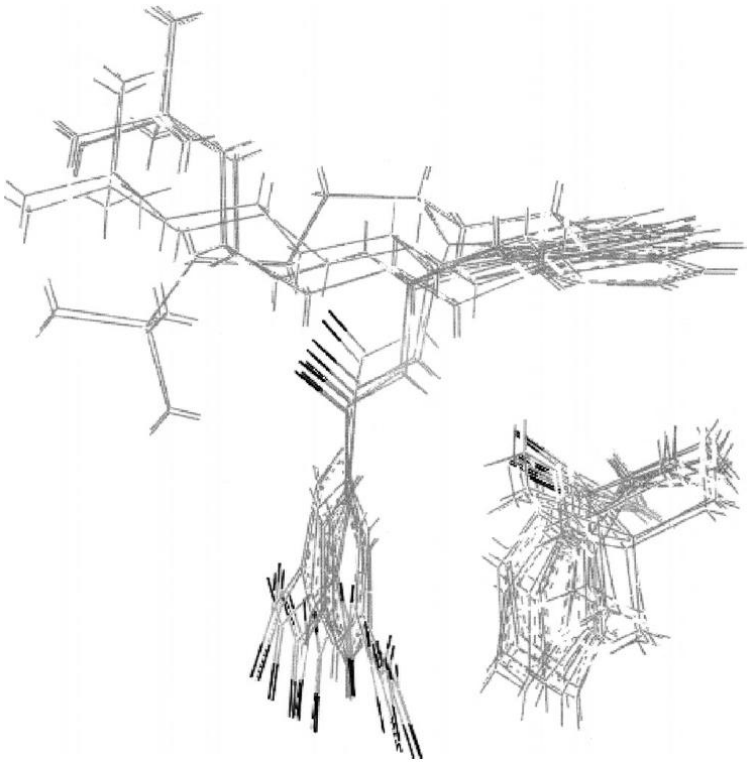
- Kiralni selektor bi trebao sadržavati aromatske skupine siromašne elektronima (npr. 3,5-dinitrobenzoilna skupina) i/ili bogate elektronima (npr. fenilna skupina) koje s komplementarnim skupinama u molekuli analita stupaju u π-π interakcije.
- Amidne skupine u molekuli selektora stvaraju dipol-dipol interakcije i vodikove veze s molekulama analita čiji doseg ovisi o polarnosti pokretne faze.
- Molekula selektora također mora biti vezana preko inertne akiralne razmaknice na površinu silikagela, te bi trebala biti dosta rigidna kako bi se samo jedan enantiomer molekule analita mogao dovoljno približiti skupinama selektora i stvarati povoljnu interakciju s KNF, slika 13.



Slika 13. Moguća mjesta interakcije analita s četkolikom KNF

Također, pokazalo se kako je za optimalnu enantioseparaciju interakcije između analita i silanolnih skupina potrebno svesti na najmanju moguću mjeru.[34] Za deaktivaciju silanolnih skupina (tzv. *end-capping*) se zbog blagih reakcijskih uvjeta i selektivnosti koristi trimetilsililna skupina (TMS). Kao donori TMS skupine najčešće se koriste heksametildisilazan (HDMS)[35], trimetilklorsilan (TMCS)[36] i 1-(trimetilsilil)imidazol (TMSI).[37] Utjecaj *end-cappinga* na mehanizam kiralnog prepoznavanja nije u potpunosti razjašnjen. U većini slučajeva dolazi do bolje enantioseparacije nakon deaktivacije silanolnih skupina zbog većeg faktora zadržavanja drugoizlazećeg spoja. Može se pretpostaviti kako je smanjen broj mogućih interakcija između analita i površine silikagela i sada se većina interakcija ostvaruje između analita i kiralnog selektora. Međutim, u nekim slučajevima se pokazalo i kako *end-capping* može pogoršati enantioseparaciju.[38] To zapravo pokazuje kako i silanolne skupine sudjeluju u procesu stvaranja dijastereomernih kompleksa, vjerojatno zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza.

Od brojnih KNF četkolikog tipa koje su pripravljene dosad, Whelk-O1 se pokazao kao nepokretna faza s najširom primjenom kako u laboratorijima, tako i u industriji. Ovu KNF su dizajnirali Pirkle i Welch metodom imobiliziranja naproksena (koristeći princip recipročnosti) kao KNF specifičnu za odjeljivanje enantiomera naproksena. Mehanizam kiralnog prepoznavanja je detaljno izučavan pomoću kromatografskih, termodinamičkih, NMR, računalnih metoda kao i rendgenskom strukturnom analizom.



Slika 14. Interakcije selektora Whelk-O1 i enantiomera koji stvara stabilniji kompleks

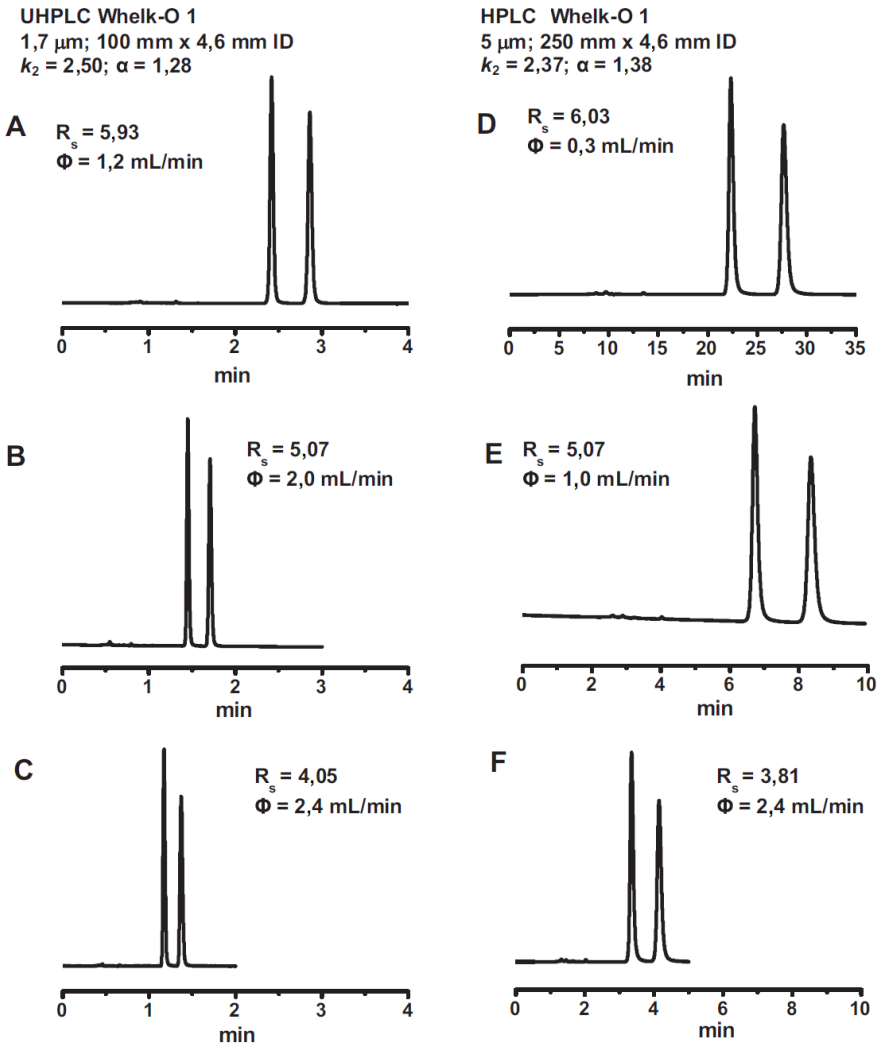
Selektor sadrži π-elektron-donorsku (tetrahidrofenantrensku) skupinu i π-elektron-akceptorsku (3,5-dinitrobenzoilnu) skupinu uz amidnu skupinu koja je donor-akceptor vodikove veze u prilično rigidnoj strukturi. Ravnine π-donora i π-akceptora su okomito orijentirane, što rezultira strukturom koja sadrži pukotinu u čijem središtu se nalazi amidna skupina koja može interagirati s analitom stvarajući vodikove veze. Prilikom interakcije u ovoj pukotini istovremeno su moguće π-π interakcije u tzv. sendvič konfiguraciji (engl. *face-to-face*), T-oblik konfiguraciji (engl. *face-to-edge*) i paralelno pomaknutoj konfiguraciji, slika 14.[39] ^{1}H-NMR studije su pokazale kako se enantiomer koji stvara jači dijastereomerni kompleks veže unutar pukotine, dok enantiomer koji stvara slabiji kompleks interagira s vanjske strane.[40]

2.2.4. Usporedba HPLC i UHPLC tehnika u kiralnoj kromatografskoj analizi

U posljednjem desetljeću se brzo razvija tzv. tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UPLC ili UHPLC).[41] Ova metoda se temelji na korištenju malih poroznih čestica punila (manje od 2 μm, najčešće 1,7 μm) za razliku od standardnih HPLC kolona koje koriste čestice punila od 5 μm. Posljedica toga su vrlo brze analize bez gubitka efikasnosti ili veća efikasnost bez značajne uštede u brzini. S obzirom na značajna povećanja brzine analize, smanjena je i količina otapala što je i ekonomski i ekološki povoljnije.

Još su 1975. godine I. Halász i suradnici pokazali kako se najbrže separacije mogu dobiti pomoću manjih čestica punila (npr. čestica promjera 1 μm), a vrijeme analize je ograničeno tlakom koji sam instrument može podnijeti.[42] Naime, prilikom korištenja čestica manjih od 2 μm dolazi do smanjenja propusnosti kolone zbog smanjenja veličine čestica. To dovodi do povećanja tlaka kolone koji je obrnuto proporcionalan s kvadratom promjera čestica. Zbog toga nije moguće koristiti uobičajene HPLC instrumente čija je gornja granica tlaka ograničena na 400 bar. Kako bi se prevladala ova prepreka, izrađeni su novi instrumenti (UHPLC instrumenti) i kolone koji mogu podnositi vrlo visoke tlakove (do 7100 bara).[43]

Dok je sam razvoj UHPLC-a bio vrlo brz, primjena u kiralnoj kromatografiji je išla puno sporije. Danas se i dalje većinom koriste 5 μm i 3 μm čestice punila na standardnim HPLC instrumentima.[44,45] Jedan od razloga je taj što su na tržištu tek odnedavno dostupne čestice punila malih pora i velike površine koja je potrebna kako bi se postigla enantioselektivnost slična onoj u HPLC metodi. Tako je 2010. godine objavljeno istraživanje o prelasku kiralnih nepokretnih faza četkolikog tipa (DACH-DNB) s HPLC na UHPLC metodu čime se pokazalo kako se male porozne čestice mogu funkcionalizirati i uspješno koristiti za vrlo brza odjeljivanja.[44] Nakon toga je uspješno pripravljena i kiralna Whelk-O1 UHPLC kolona kovalentnim vezanjem dobro poznatog selektora na 1,7 μm porozne sferične čestice silikagela.[45] Analiza sposobnosti odjeljivanja enantiomera 21 analita, koji uključuju alkohole, epokside, sulfokside, fosfinske okside, benzodiazepine i 2-ariloksipropionske estere koji se koriste kao herbicidi, pokazala je značajna poboljšanja efikasnosti i vremena analize, slika 15.

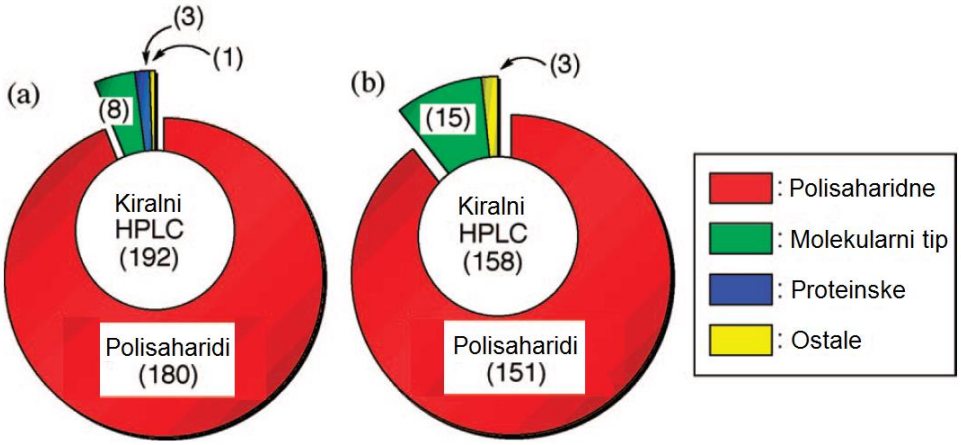


Slika 15. Kromatogrami acenaftenola 25 °C, 280 nm, pokretna faza: (A – C) *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 8 : 2; (D – F) *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 7 : 3

2.2.5. Kiralna kromatografija danas

Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća došlo je do snažnog razvoja direktnih kiralnih metoda za odjeljivanje enantiomera pomoću kiralnih nepokretnih faza za HPLC. Tako je kiralni HPLC postao najpopularnija i najpouzdanija metoda za analizu sastava enantiomera kao i za pripremu čistih enantiomera.[46] Kao što je već navedeno, tri su glavne metode koje se u današnje vrijeme koriste za određivanje enantiomernog viška – NMR, GC i HPLC metode. Od navedenih, HPLC metoda je daleko najpopularnija i koristi se u više od 50 % slučajeva.[47]

Popularnost ove metode dovela je do razvoja velikog broja KNF koje su dobivene vezanjem raznih prirodnih i sintetiziranih kiralnih spojeva na inertnu podlogu. Iako je broj pripravljenih KNF vrlo velik, a broj komercijalno dostupnih KNF prelazi 100, pokazalo se da se u 90 % slučajeva određivanje enantiomernog viška izvodi pomoću KNF na bazi polisaharida, slika 16.[47] Od komercijalno dostupnih polisaharidnih KNF, prema statistikama su najpopularnije 3,5-dimetilfenilkarbamati celuloze (Chiralcel OD) i amiloze (Chiralpak AD).[46]



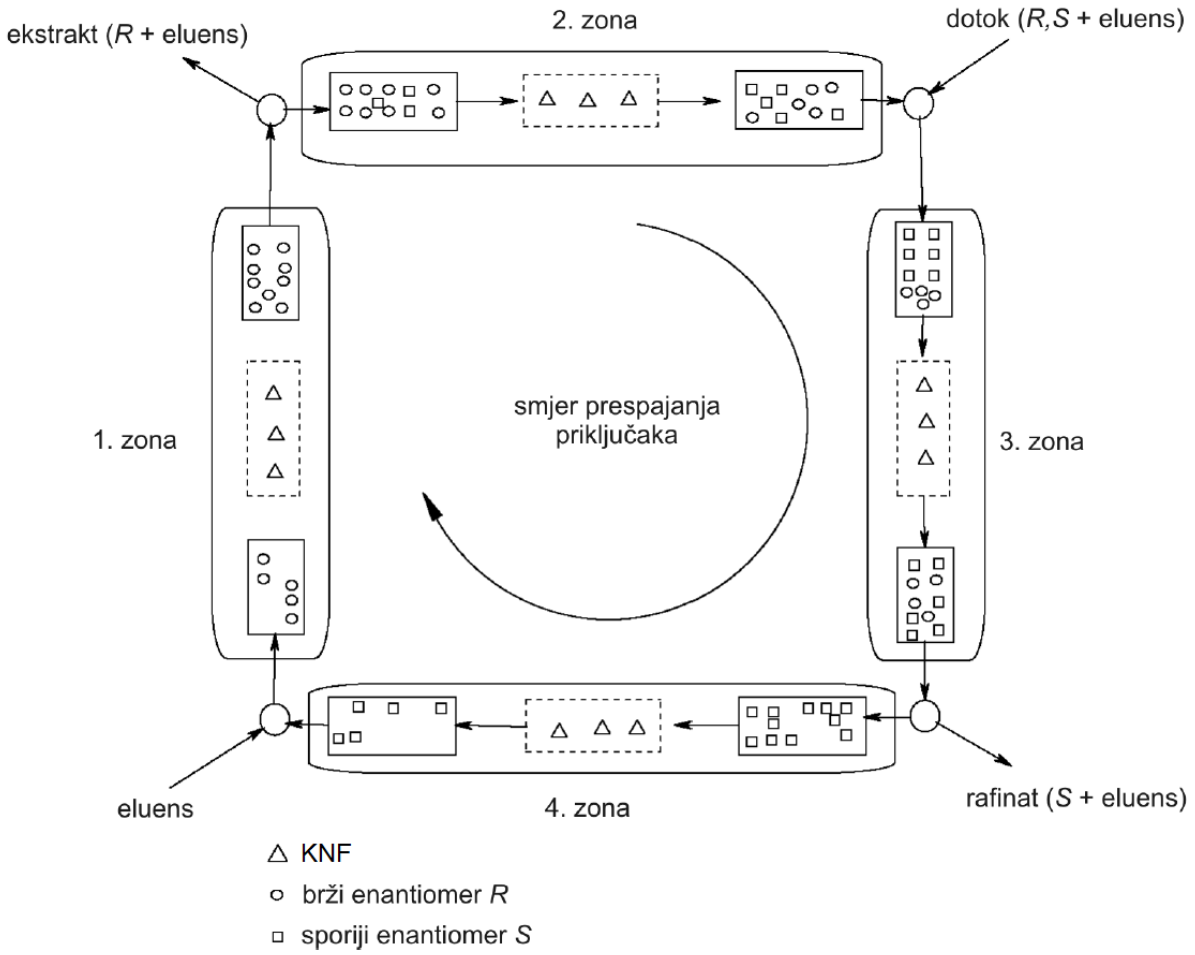
Slika 16. Raspodjela KNF za HPLC korištenih za određivanje *ev* obajvljenih u *Journal of the American Chemical Society* u a) 2005. godini i b) 2007. godini; Vrijednosti u zagradama označavaju broj članaka, molekularni tip KNF označava sve KNF koje ne tvore supramolekularne strukture (jedna molekula vezana na podlogu)

Polisaharidne KNF su najraširenije KNF za analitičke i preparativne svrhe i iz uporabe su praktično istisnule sve ostale KNF. Komercijalno su dostupne od 1980-ih godina i koriste se za odjeljivanje velikog broja kiralnih spojeva koji posjeduju različite vrste kiralnosti. Kod polisaharidnih KNF selektor je adsorbiran na silikagel i ispire se s polarnim otapalima te ovakve KNF nisu kompatibilne s raznim otapalima u pokretnoj fazi. Ovaj problem je riješen kovalentnom imobilizacijom polimera na silikagel,[48] međutim takva imobilizacija često umanjuje odjeljivanje enantiomera.[49] Imobilizacija je omogućila upotrebu raznih otapala u pokretnoj fazi što je vrlo bitno u preparativnoj kromatografiji gdje se javlja i problem topljivosti spojeva. Ovako imobilizirane polisaharidne KNF su komercijalno dostupne od 2004. godine.

Za razliku od polisaharidnih, upotreba četkolikih KNF nije toliko raširena i razvoj novih kolona komercijalno nije toliko isplativ. Međutim, četkolike KNF su vrlo značajne sa znanstvenog stajališta. Interakcije enantiomera analita i KNF najjednostavnije je promatrati kod četkolikih KNF.[24] Zbog toga su ove KNF vrlo bitne u objašnjavanju mehanizma kiralnog prepoznavanja, što pomaže i u istraživanju interakcija molekula u živim organizmima.

Kao što je već naglašeno, kiralna kromatografija je ključna metoda za analizu racemičnih i enantiomerno obogaćenih smjesa enantiomera te za određivanje enantiomernog viška. Međutim, kiralna kromatografija je također vrlo jeftina metoda na preparativnom nivou. U ranim fazama razvoja novog lijeka, kromatografija je brza i ekonomski prihvatljiva metoda za izolaciju pojedinačnih enantiomera koji se koriste u kliničkim i toksikološkim ispitivanjima. Prednost kromatografije je što omogućava dobivanje oba enantiomera u enantiomerno čistom obliku.[50] Stoga se veliki napredak u području kiralne kromatografije u zadnjih nekoliko godina događa na industrijskoj skali.

U prošlosti je farmacetuska industrija preparativnu kromatografiju smatrala dugotrajnom i skupom metodom. Međutim, danas ova metoda omogućava brze i jeftine separacije pomoću automatizirane opreme i tehnologije kontinuirane kromatografije. Kontinuiranu kromatografiu moguće je ostvariti na nekoliko načina. Najučinkovitija separacija dobiva se korištenjem tzv. operacije suprotnog kretanja, koja zahtijeva da se pokretna i nepokretna faza gibaju u suprotnim smjerovima. Međutim, gibanje nepokretne faze, koja se sastoji od poroznih čestica mikrometarske veličine, je u praksi nemoguće.[51] Zbog toga je trebalo razviti druga tehnička rješenja. Značajan napredak ostvaren je sustavom prividnog gibanja čestica (engl. *Simulated Moving Bed*, SMB) koji je razvijen za petrokemijsku industriju 1960-ih godina.[52] Nepokretna faza je pakirana u odvojene kolone koje su povezane u krug (najčešće 4 – 24 kolone). Umjesto gibanja samih kolona, položaji ulaska uzorka i izlaska analita se kontinuirano pomiču što stvara dojam gibanja nepokretne faze, slika 17. Kontinuirano gibanje je najbolje simulirano kada se četiri SMB bloka sastoje od velikog broja fiksiranih kolona, a prespajanje priključka se odvija na visokoj frekvenciji.

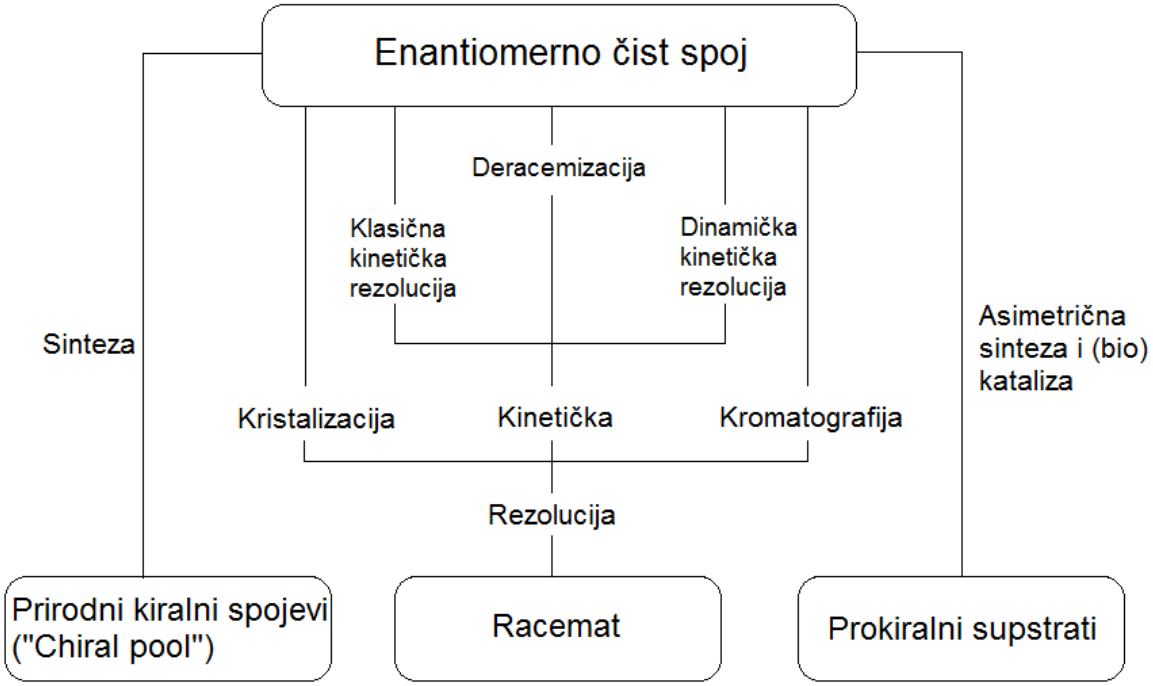


Slika 17. Princip SMB procesa s 12 kolona[53]

Tek kad su proizvedeni SMB sustavi s visokim tlakovima, farmaceutska industrija je mogla koristiti ovu tehnologiju u razvoju lijekova. Zahvaljujući primjerima uspješne uporabe SMB metode na nekoliko lijekova, kromatografija se počela više koristiti kao industrijska metoda dobivanja čistih enantiomera. Danas je kromatografija korisna metoda koja omogućuje farmaceutskoj industriji stavljanje enantiomerno čistih spojeva na tržište.[50]

2.3. Metode priprave enantiomerno čistih spojeva

Prilikom priprave kiralne nepokretne faze, potrebno je prirediti enantiomerno čist spoj (selektor) koji se potom veže na inertnu podlogu nekom od dostupnih metoda. Postoje brojne metode priprave enantiomerno čistih spojeva među kojima su sinteza iz optički aktivnih prirodnih spojeva (engl. *chiral pool*), asimetrična sinteza prokiralnih supstrata i rezolucija racemične smjese, slika 18.[54]



Slika 18. Metode priprave enantiomerno čistih spojeva

Najjednostavniji slučaj je kad postoji jednostavan prirodni enantiomerno čist organski spoj iz kojega je moguće klasičnim metodama organske sinteze prirediti potrebni enantiomerno čist spoj. Međutim, često to nije slučaj ili prirodni spoj ne postoji u odgovarajućoj konfiguraciji. Tada je potrebno pribjeći drugim metodama priprave enantiomerno čistih spojeva.

Asimetričnom sintezom iz prokiralnog spoja nastaje samo jedan enantiomer spoja. U tu svrhu se koriste razni kiralni metalni katalizatori, organokatalizatori, kiralna pomoćna sredstva (engl. *chiral auxiliaries*), enzimi, itd. Prednost ovog pristupa je u tome što je

teoretski moguće dobiti iskorištenje od 100 % uz enantiomerni višak 100 %. Međutim, potrebno je pronaći odgovarajući katalizator, a ta potraga je često dugotrajna i ne rezultira uvijek pronalaskom odgovarajućeg katalizatora.

U slučaju kada nije moguće provesti asimetričnu sintezu ili su potrebna oba enantiomera spoja, produkt je moguće dobiti „akiralnom“ sintezom te zatim razdvojiti enantiomere metodama poput kristalizacije dijastereomernih soli, kiralnom kromatografijom, enzimski, itd.

2.3.1. Enzimska kataliza

Biokataliza je dobro uhodan izbor metode za kemo- i regioselektivne modifikacije akiralnih spojeva, rezoluciju racemata te desimetrizaciju prokiralnih supstrata.[55]

Uzrok jedinstvene funkcije enzima je njihova kompleksna trodimenzionalna struktura i aktivno mjesto integrirano u nju. To omogućava visoko specifično prepoznavanje određenih supstrata što ima za posljedicu odlične selektivnosti. Osim kemoselektivnosti, stereoselektivnost (regioselektivnost, dijastereoselektivnost i enantioselektivnost) enzima je također u većini slučajeva vrlo dobra ili izvrsna. Jedinstveno svojstvo enzima da prepoznaje supstrate stereoselektivno je prvi primijetio Fischer krajem 19. stoljeća.[56] Na temelju svojih otkrića, postavio je teoriju „ključa i brave“ prema kojoj supstrat mora pristati u aktivno mjesto enzima kao ključ u bravu.

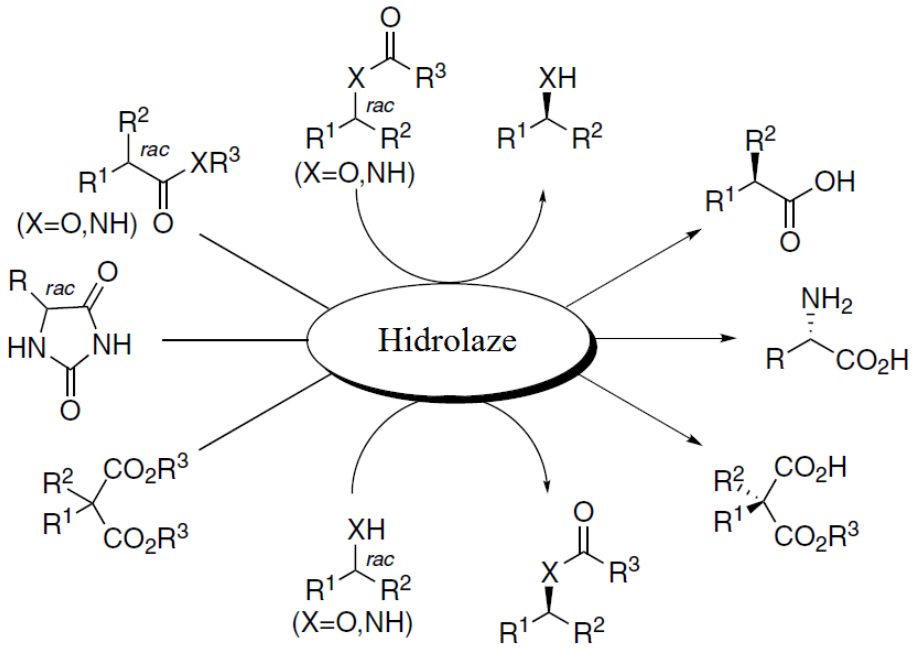
Enzimi se obično klasificiraju prema tipovima reakcija koje kataliziraju te se dijele u šest glavnih skupina prema klasifikaciji enzimske nomenklature, tablica 3.[57]

Tablica 3. Klasifikacija enzima prema tipovima reakcija koje kataliziraju

EC	Skupina	Reakcije koje kataliziraju	Broj	
			klasificiranih	komercijanih
1	Oksidoreduktaze	redukcija C=O i C=C veza, reduktivna aminacija C=O veze, oksidacija C–H C=C, C–N i C–O; oksidacija/redukcija kofaktora	650	90
2	Transferaze	transfer grupa (aldehidne, ketonske, acilne, amino, nitro, glikozilne, fosforilne, metilne)	720	90
3	Hidrolaze	hidroliza i sinteza estera, amida, laktona, laktama, epoksida, nitrila, anhidrida, glikozida	636	125
4	Liaze	adicija – eliminacija malih molekula na C=C, C=N, C=O veze	255	35
5	Izomeraze	izomerizacije (racemizacije, epimerizacije, reakcije pregradnje)	120	6
6	Ligaze	stvaranje – cijepanje C-O, C-S, C-N, C-C veza uz istovremeno cijepanje ATP-a	80	5

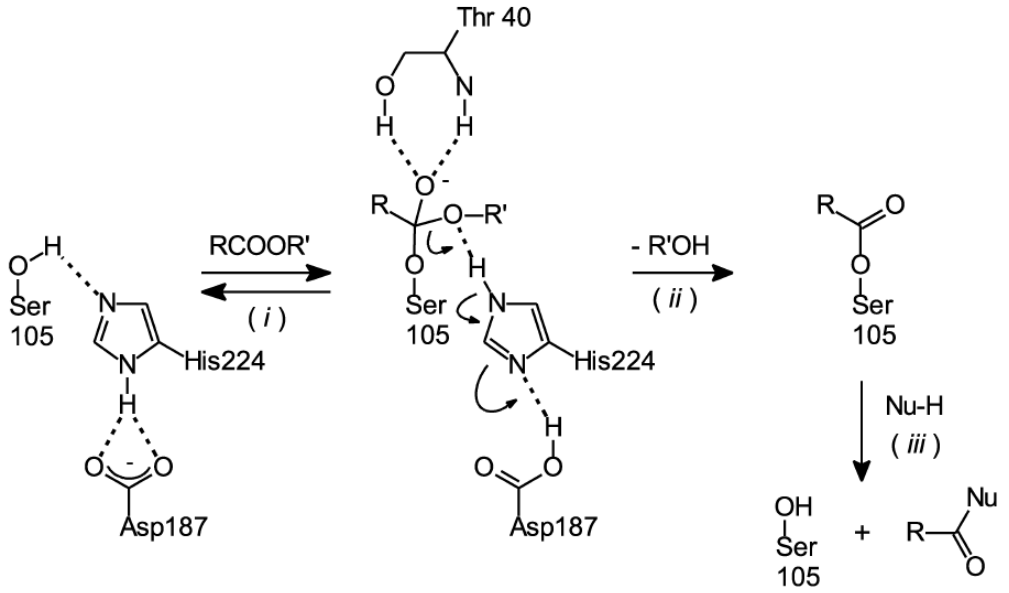
Hidrolitički enzimi su najčešći izbor biokatalizatora, najprije zbog jednostavnosti njihove upotrebe i ekološke prihvatljivosti. Velika prednost je i komercijalna dostupnost velikog broja enzima, njihova relativno niska cijena, visoka stereoselektivnost u kombinaciji sa širokom tolerancijom na velik broj supstrata, brojne primjene u sintezi kroz modifikacije karboksilne skupine, te činjenica da ne zahtijevaju kofaktore.[58]

Reprezentativni primjeri hidrolaza koje se koriste u organskoj sintezi su proteaze, lipaze i esteraze. Tipične transformacije koje ovi enzimi kataliziraju uključuju hidrolizu estera i amida te njihove inverzne reakcije – esterifikacije i amidacije, slika 19.[58] Često se koriste u rezoluciji zbog toga što su mnoge kiseline i njihovi derivati jednostavno dostupni u racemičnom obliku klasičnim kemijskim metodama. Međutim, koriste se i u reakcijama desimetrizacije na primjer prokiralnih ili *mezo* diestera, kao i kemoselektivnim reakcijama uklanjanja određenih kiselih bočnih lanaca u blagim hidrolitičkim uvjetima. Danas se hidrolaze koriste u mnogim industrijskim procesima.



Slika 19. Reakcije koje kataliziraju hidrolaze

Među hidrolitičkim enzimima najpopularnije su lipaze koje spadaju u skupinu serinskih hidrolaza. Karakteristika ove brojne skupine enzima je prisutnost nukleofilnog serina koji sudjeluje u hidrolizi supstrata u aktivnom mjestu enzima. Reakcija uključuje nastanak tetraedarskog acil-enzim međuprodukta pomoću navedenog serina, nakon čega slijedi hidroliza intermedijera uz regeneraciju enzima, slika 20.[59] Serin u aktivnom mjestu ovih hidrolaza je aktiviran prijenosom protona koji uključuje kiseli ogranak (aspartat ili glutamat) i bazični ogranak (obično histidin). Ove tri aminokiseline u aktivnom mjestu enzima čine tzv. katalitičku trijadu.



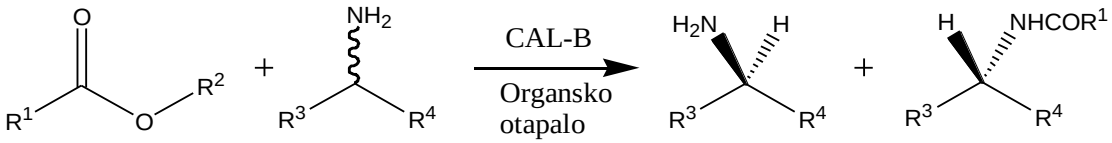
Slika 20. Mehanizam katalize serinskih hidrolaza

Uz sve prednosti koje posjeduju kao hidrolitički enzimi, lipaze su vrlo kompatibilne s organskim otapalima zbog čega su čest izbor organskih kemičara. Imaju široku primjenu u kemo-, regio- i stereoselektivnim reakcijama, desimetrizaciji prokiralnih i mezo spojeva te u nekim procesima neobičajenim za enzime poput aldolnih reakcija ili Michaelovih adicija. Upotreba lipaza u organskoj sintezi se drastično povećala u posljednjem desetljeću zbog primjene u proizvodnji lijekova, agrokemikalija i enantiomerno čistih kemikalija.[59]

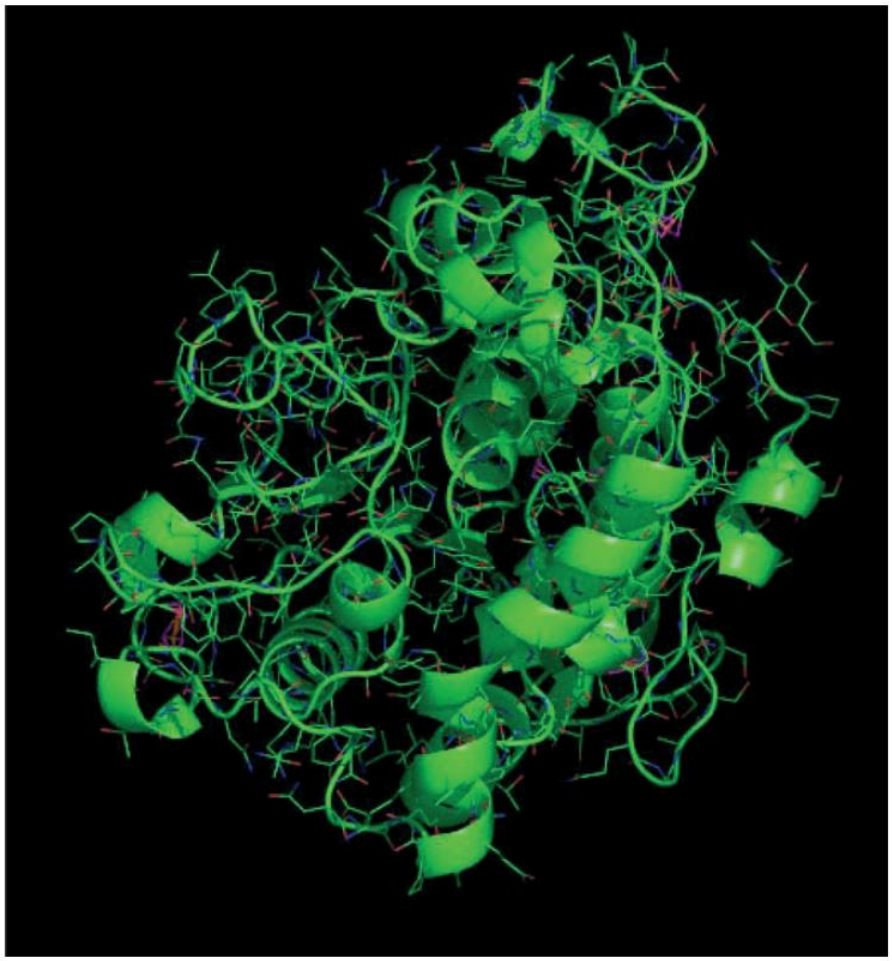
2.3.2. Candida antarctica lipaza B

Candida antarctica lipaza B (CAL-B) je jedan od najučinkovitijih katalizatora za rezoluciju alkohola i amina čime omogućava pripremu bitnih optički aktivnih spojeva s hidroksi i amino skupinom.[60] Zbog visoke stereoselektivnosti najpogodniji je katalizator za rezoluciju primarnih amina s amino skupinom na stereocentru, shema 1, koji su predviđeni međuprodukti u pripravi kiralnih selektora u okviru ovog doktorskog rada.

Shema 1



CAL-B se sastoji od 317 aminokiselina i ima molekulsku masu od 33 kDa, slika 21.[60] Prvi put je izolirana iz soja *Candide antarctice*. Rendgenska strukturna analiza CAL-B je razjašnjena 1994. godine.[61]

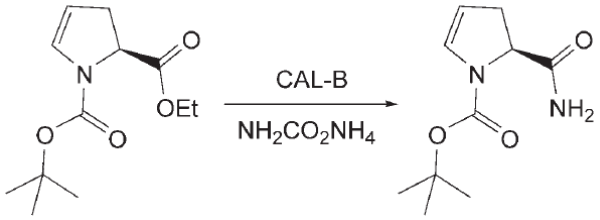


Slika 21. Struktura *Candida antarctica* lipaze B

Katalitička trijada enzima sastoji se od Asp187-His224-Ser105 aminokiselina. Promatrajući aktivno mjesto enzima iz trijade orijentirane Asp-His-Ser s lijeva na desno, iznad trijade se nalazi velika hidrofobna šupljina, a ispod je srednje velika šupljina. Prilikom katalitičkog puta acilni dio supstrata leži u velikom džepu, dok odlazeća skupina/nukleofilni dio leži u srednjem džepu, ali se može proširiti u otapalo ili veliki džep jer srednji džep nema dovoljno mjesta za supstituente veće od propila.

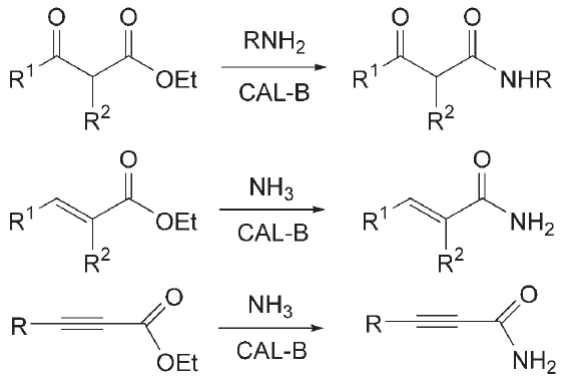
U pripravi akiralnih amida uz pomoć lipaza najčešće se koriste aminoliza estera karboksilnih kiselina i kondenzacija karboksilnih kiselina i amina. Direktna enzimska amidacija različitih karboksilnih kiselina s amonijakom ili amonijevim solima proučavana je na CAL-B u različitim organskim otapalima. Također su upotrebljeni i drugi dušikovi nukleofili poput hidroksilamina, hidrazina i njihovih derivata u reakcijama s karboksilnim kiselinama ili esterima. Kao izvor amonijaka je moguće koristiti i amonijev karbamat, shema 2.[62]

Shema 2



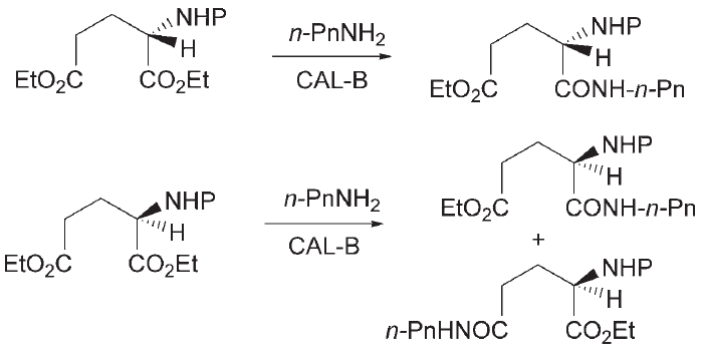
Selektivna modifikacija određene funkcionalne skupine u polifunkcionalnoj molekuli, uz izbjegavanje sporednih reakcija i brojnih koraka protekcije i deprotekcije, jedan je od najtežih zadataka u organskoj sintezi. Upotrebom uobičajenih reaktanata navedeni zadatak je i potpuno nemoguć kada je ciljna molekula nestabilna u drastičnim uvjetima temperature, tlaka i slično. Upotreba biokatalizatora nameće se kao ugodna alternativa za ovakve kemoselektivne transformacije. Bez prisustva enzima aminolizom i amonolizom *β*-keto estera nastaju enamino esteri. Uz enzim u navedenoj reakciji dobiveni su *β*-keto amidi u visokim iskorištenjima, shema 3.[63]

Shema 3



Ponekad je ista funkcionalna skupina prisutna u polifunkcionalnoj molekuli na više mjesta. Tada je selektivna transformacija samo jedne od ovih skupina vrlo težak zadatak. Regioselektivna amidacija pomoću CAL-B je zanimljivo rješenje ovog problema. Tako se pokazalo kako produkt reakcije *N*-zaštićenog diestera glutaminske kiseline s *n*-pentilaminom ovisi o apsolutnoj konfiguraciji na stereocentru i o zaštitnoj skupini amina. Derivati L-glutaminske kiseline daju isključivo α-regioizomere, dok supstrati obrnute konfiguracije reagiraju puno sporije i u reakciji većinom nastaju γ-regioizomeri, shema 4.[64]

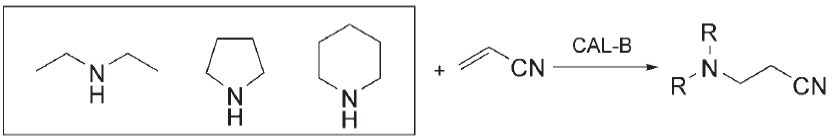
Shema 4



Općenito, enzimi divljeg tipa ili mutanti dobiveni metodama usmjerene evolucije mogu katalizirati više od jedne specifične reakcije. Cilj mnogih istraživačkih grupa je upotreba mehanističkih istraživanja kako bi se otkrile nove aplikacije enzima te korištenje metoda usmjerene evolucije kako bi se poboljšala reaktivnost i selektivnost enzima. Među lipazama, CAL-B je pokazao najviše raznovrsnosti u aplikacijama. Tako, na primjer, reakcija

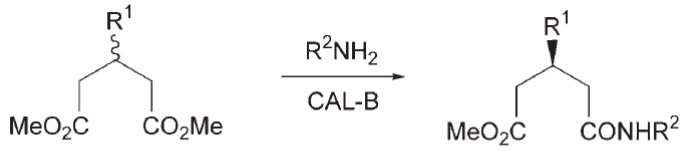
acetonitrila s različitim sekundarnim aminima u prisutstvu CAL-B dovodi do nastanka odgovarajućih Michaelovih adukata brže nego u odsutnosti biokatalizatora, shema 5.[65]

Shema 5



Ne postoji tako puno primjera enantioselektivne enzimske desimetrizacije (EED) prokiralnih spojeva pomoću CAL-B. Najčešći primjeri su desimetrizacije prokiralnih glutarata, shema 6.[66]

Shema 6

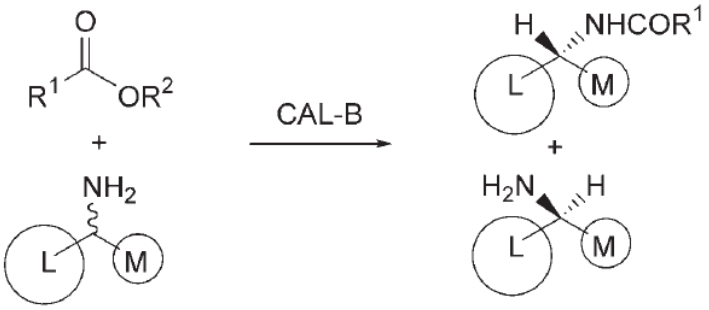


R^1= OAc, OMe, NHBn, Me, Ph, *p*-F-C_6H_4

2.3.3. Kinetička rezolucija pomoću CAL-B

Iako se CAL-B pokazala vrlo korisna u navedenim kemoselektivnim i regioselektivnim reakcijama, ipak se najviše koristi za kinetičku rezoluciju.[59] Ograničeno aktivno mjesto CAL-B objašnjava odličan enantioprioritet prema nukleofilima poput sekundarnih alkohola i primarnih amina. U rezoluciji primarnih amina CAL-B je najčešće korišten biokatalizator.[60]

Racemični amini i neaktivirani esteri u prisustvu CAL-B reagiraju na isti način kao alkoholi prilikom transesterifikacije, prema Kazlauskasovom pravilu, slika 22. Kao posljedica ovog pravila i raznih molekulskih modela postavljen je empirijski model aktivnog mjesta enzima.[67]



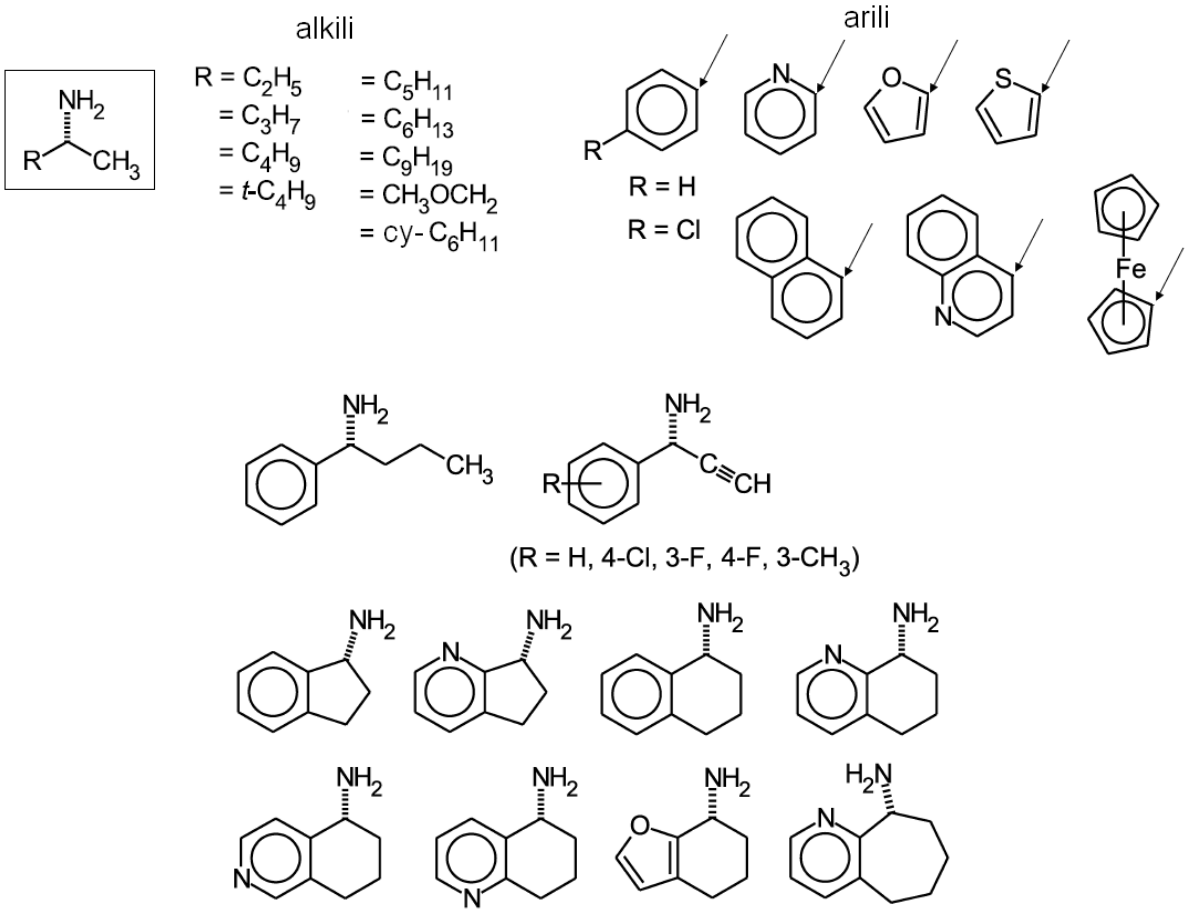
Slika 22. Prikaz Kazlauskasovog pravila

U ovakvim reakcijama rezolucije, najčešće se kao otapalo i acilni donor koristi etil-acetat, međutim vrlo dobrim acilnim donorima su se pokazali i alkil-metoksiacetati.[59] Vinilni esteri, koji su najbolji reagensi za rezoluciju alkohola, su neprikladni za rezoluciju amina zbog svoje velike reaktivnosti te reagiraju s aminima i bez prisutstva enzima.

Treba naglasiti kako voda, koja je prirodni medij enzima, nije dobro otapalo za reakcije aminolize jer tada dominira hidroliza acilnog donora. Zato se isključivo koriste organska bezvodna otapala. Čak i tragovi vode u organskom otapalu dovode do neželjene hidrolize acilnog donora što rezultira sniženim prinosom reakcije, a dobivena kiselina može utjecati i na deaktivaciju enzima. Lipaze su posebno otporni enzimi koji prilično dobro toleriraju bezvodna organska otapala.[59] Posebno je često korištena lipaza CAL-B, koja zapravo i preferira bezvodne uvjete. Postoje brojni primjeri u kojima je acilni donor ujedno i otapalo pa organsko otapalo nije potrebno. To je posebno korisno u industrijskim procesima. Također su brojni primjeri uporabe ionskih tekućina kao otapala za enzimske reakcije.[68]

Učinkovita uporaba enzima u bezvodnim uvjetima zahtijeva imobilizaciju enzima na odgovarajući nosač. Razlog tome je što disperzija slobodnog proteina čini većinu molekula enzima nedostupnima reakcijskom mediju.

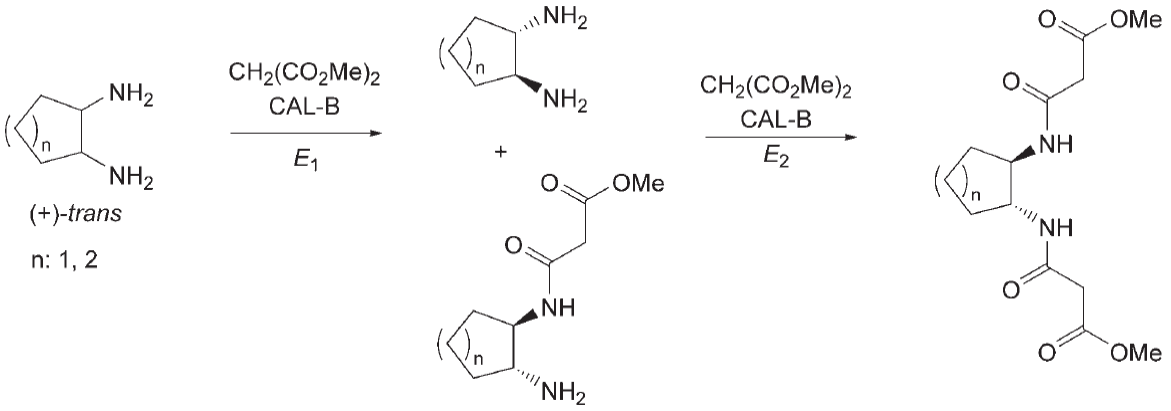
U zadnjih nekoliko godina objavljeno je mnogo primjera kinetičke rezolucije primarnih amina.[60] Neki od primjera su alkilamini, arilalkilamini, 1-(heteroaril)-etilamini, biciklički 1-heteroaril primarni amini, monociklički i biciklički β-aminoesteri, hidroksialkilamini, diamini, 1-aril-2-propinilamini, 1-aril-2-propenilamini, itd., slika 23.[59]



Slika 23. Strukture nekih primarnih amina na kojima je uspješno izvedena kinetička rezolucija uz pomoć CAL-B

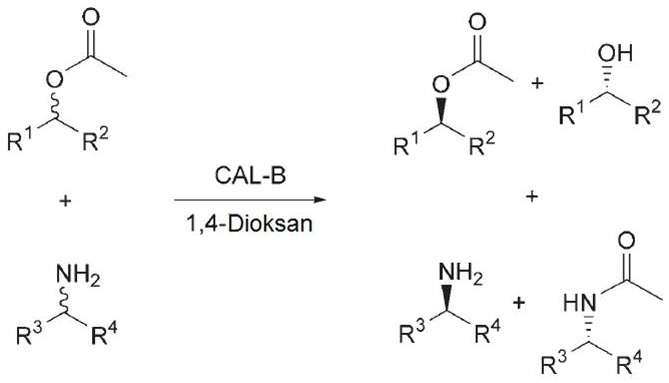
U nekim slučajevima od velike je pomoći sekvencijska biokatalitička rezolucija pomoću *one-pot* dvostruke enzimske reakcije jer je moguće postići visoki enantiomerni višak i supstrata i produkta unatoč umjerenoj enantioselektivnosti oba procesa. Dobar primjer je rezolucija *trans*-cikloheksan-1,2-diamina i *trans*-ciklopentan-1,2-diamina pomoću dimetilmalonata i CAL-B kao biokatalizatora, shema 7. Sinteza (*R*,*R*)-bisamido estera uključuje 2 biokatalitička koraka, a enzim pokazuje istu stereokemijsku sklonost prema (*R*,*R*)-enantiomeru supstrata u obje reakcije.[69]

Shema 7

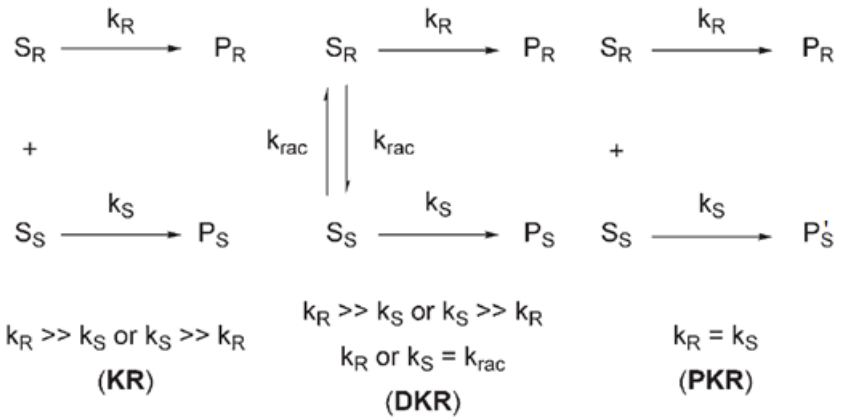


Iako se rijeđe koristi od rezolucije amina, enzimska rezolucija estera pomoću aminolize ili amonolize predstavlja djelotvornu alternativu rezoluciji supstrata transesterifikacijom ili hidrolizom. Elegantna i učinkovita procedura koja se temelji na *one-pot* rezoluciji racemičnih sekundarnih alkoholnih estera s racemičnim aminima katalizirana enzimom CAL-B omogućava pripravu 4 produkta (ester, amin, alkohol i amid) s odličnim enantiomernim viškom, shema 8.[70]

Shema 8



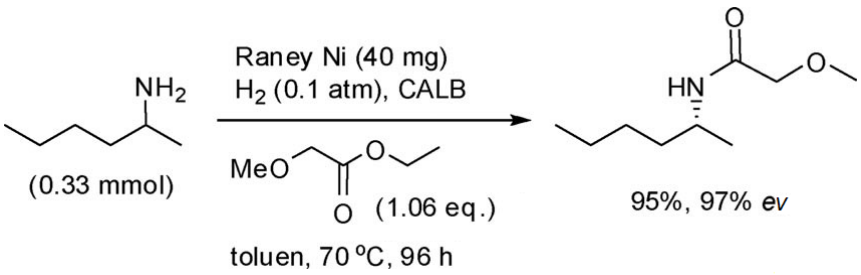
Maksimalno iskorištenje od 50 % glavni je nedostatak kinetičke rezolucije (KR). Pomoću dinamičke kinetičke rezolucije (DKR) moguće je dobiti odgovarajući enantiomerno čisti spoj u iskorištenju blizu 100 %, slika 24.[58]



Slika 24. Tipovi kinetičke rezolucije

DKR obuhvaća kombinaciju enantioselektivne transformacije s *in situ* procesom racemizacije. Najčešći uvjeti uključuju lipazu kao biokatalizator i organometalni kompleks[71] odgovoran za racemizaciju supstrata. U slučaju enzima CAL-B za racemizaciju je moguće koristiti i organske katalizatore, a često se koriste i heterogeni katalizatori, shema 9.[72] Međutim, pronalaženje uvjeta za DKR nije lako i nisu svi supstrati dobri kandidati za DKR. Zbog toga ne postoji puno primjera DKR kod CAL-B, za razliku od KR. Tako KR zapravo i dalje ostaje najčešće korištena metoda priprave enantiomerno čistih spojeva pomoću enzima.

Shema 9



§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Diklormetan je destiliran prije upotrebe. Sve ostale kemikalije i otapala su kupljene i korištene bez pročišćavanja.

Candida antarctica lipaza B (CAL-B) je proizvod tvrtke Sigma Aldricha (*Candida antarctica* lipaza B imobilizirana na akrilnom nosaču, ekspresirana u *Aspergillus oryzae*).

Spektri nuklearne magnetske rezonancije (^{1}H and ^{13}C) su snimljeni na Bruker AV 300 spektrometru. Kemijski pomaci (δ_H i δ_C) su navedeni u ppm u odnosu na unutrašnji standard tetrametilsilan (TMS). Signali su označeni kao s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet, dd = dublet dubleta, bs = široki signal.

Optička skretanja određena su na polarimetru Optical Activity AA-10 na sobnoj temperaturi. Temperature tališta su određene na Electrothermal 9100 MP instrumentu u otvorenim kapilarama i nisu korigirane. IR spektri su snimljeni na Bruker ABB Bowen FT-IR instrumentu tehnikom KBr pastile. Elementne analize rađene su na uređaju Perkin-Elmer 2400 CHNS Analizator.

Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvosnosti (kromatografijom obrnutih faza i kromatografijom normalnih faza na kiralnim kolonama u slučaju enzimske rezolucije).

Tankoslojna kromatografija je izvedena na aluminijskim pločicama silikagela (60 F_{254}, Merck) ili aluminijskim pločicama aluminijevog oksida (neutralni 60 F_{254}, Merck). Korištena je UV detekcija (254 nm) ili fosfomolibdatni reagens.

Kromatografija obrnutih faza izvođena je na Shimadzu 10A VP HPLC sustavu (pumpa LC-10AD VP, degazer DGU-14A, grijač kolone CTO-10AC VP, gradijentni sklop za miješanje FCV-10AL VP, upravljački sklop SCL-10A VP, UV detektor SPD-M10A VP) uz gradijentno ispiranje prema metodi navedenoj u tablici 4.

Tablica 4. HPLC gradijentna metoda za praćenje tijeka reakcije

Kolona	Nucleosil 100-5 C18; 250 mm x 4,6 mm		
Eluens A	$\Psi(H_2O, MeOH, H_3PO_4$ (85 %)) = 90 : 10 : 0,5		
Eluens B	MeOH		
Gradijent 50-100	*t*/min	φ(A)/%	φ(B)/%
	0,00	50	50
	20,00	0	100
	25,00	0	100
	27,00	50	50
Injektirani volumen	20 μL		
Protok	1 mL/min		
Detekcija	200 – 400 nm		

HPLC analize u kromatografiji normalnih faza izvedene su na Shimadzu Prominence HPLC sustavu (pumpa LC-20AT, degazer DGU-20A5, UV detektor SPD-20A) ili Knauer sustavu (pumpa Knauer 64, degazer 4-Port Knauer Degasser, sučelje Interface Knauer, UV detektor Knauer Variable Wavelength Monitor i CD detektor Jasco CD-2095).

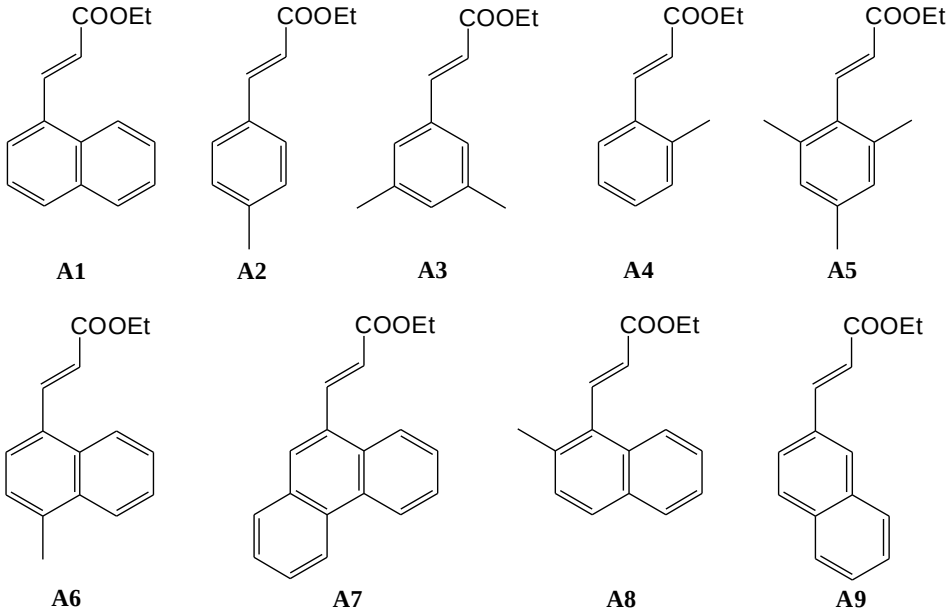
Za kiralne HPLC analize enantiomerno čistih amina upotrebljena je Daicel Chiralcel OD-H kolona, 250 mm x 4,6 mm. Za HPLC analize pripravljenih selektora korištena je analitička kolona (250 mm x 4,6 mm) napunjena četkolikom kiralnom nepokretnom fazom **KNF-A**, koja je opisana u Ranogajec et al. (**CSP 7**).[73] Za preparativnu HPLC kromatografiju korištena je semi-preparativna **KNF-A** kolona, 300 mm x 8 mm.

Za kolonsku kromatografiju korišten je silikagel (Silica gel 60, 70-230 mesh, Fluka) ili aluminijev oksid (Merck Aluminiumoxide 90 active, neutralni, aktivnost I).

Za vezanje kiralnih selektora korišten je silikagel Separon SGX tvrtke Tessek, veličine čestica 5 μm i veličine pora 80 Å. Punjenje kromatografskih kolona kiralnim nepokretnim fazama izvedeno je u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu pomoću instrumenta Knauer Pneumatic HPLC Pump. Nepokretna faza je suspendirana u otapalu Ψ(2-PrOH, heksan) = 80 : 10 i potisnuta u čeličnu kolonu tvrtke Knauer, veličine 150 mm x 4,6 mm uz pomoć heksana pod tlakom od 450 bara, a zatim 600 bara.

3.2. Priprava kiralnih nepokretnih faza KNF-1 – KNF-9

*3.2.1. Sinteza etil-(E)-3-arilprop-2-enoata **A1** – **A9***



Opća procedura za sintezu akrilnih estera A1 – A9

U otopinu odgovarajućeg aldehida (1 ekv) i 4-dimetilaminopiridina, DMAP (0,2 ekv) u DMF-u (2 mL po 1 mmol aldehida) dodan je kalijev etil-malonat (1,5 ekv). Nastala suspenzija je ohlađena na 0 °C te je dokapana octena kiselina (1,5 ekv) a potom piperidin (0,2 ekv). Reakcijska smjesa je miješana na 60 °C do nestanka reaktanta koji je praćen HPLC-om. Potom je dodana voda i smjesa ekstrahirana 2 puta s dietil-eterom. Spojeni organski slojevi su isprani zasićenom vodenom otopinom amonijeva klorida, vodom i zasićenom vodenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata. Organski sloj je sušen nad Na_2SO_4, profiltriran i otapalo upareno pod sniženim tlakom. Dobiveni produkti nisu dodatno pročišćavani ukoliko nije drugačije naznačeno.

Etil-(*E*)-3-(1-naftil)prop-2-enoat (A1)

Žuto ulje (6,9 g; 95 %; *E*:*Z* > 99:1) iz 1-naftaldehida (4,3 mL).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,50 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; CH); 8,19 (1H; d; *J* = 8,1 Hz; *Ar*); 7,87 (2H; m; *Ar*); 7,74 (1H; d; *J* = 7,5 Hz; *Ar*); 7,3 – 7,6 (3H; m; *Ar*); 6,52 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; CH); 4,31 (2H; q; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH_3); 1,37 (3H; t; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 166,91; 141,63; 133,68; 131,85; 131,43; 130,47; 128,73; 126,85; 126,22; 125,47; 125,01; 123,43; 120,96; 60,62; 14,40.

Etil-(*E*)-3-(4-metilfenil)prop-2-enoat (A2)

Žuto ulje (6,1 g; 99 %; *E*:*Z* > 99:1) iz 4-metilbenzaldehida (3,8 mL).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,66 (1H; d; *J* = 16,0 Hz; C*H*); 7,41 (2H; d; *J* = 8,1 Hz; *Ar*); 7,18 (2H; d; *J* = 8,1 Hz; *Ar*); 6,39 (1H; d; *J* = 16,0 Hz; C*H*); 4,25 (2H; q; *J* = 6,9 Hz; CH_2CH$_3$); 2,36 (3H; s; ArCH_3); 1,33 (3H; t; *J* = 6,9 Hz; CH$_2$CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 167,19; 144,58; 140,61; 131,75; 129,61; 128,04; 117,19; 60,40; 21,45; 14,35.

Etil-(*E*)-3-(3,5-dimetilfenil)prop-2-enoat (A3)

Žuto ulje (3,7 g; 98 %, *E*:*Z* > 99:1) iz 3,5-dimetilbenzaldehida (2,5 g).

ν_{max}/cm^{-1} 1716, 1638, 1180, 1165, 1040, 982, 845, 677.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 7,63 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 7,14 (2H; s; *Ar*); 7,02 (1H; s; *Ar*); 6,41 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 4,26 (2H; q; *J* = 7,3 Hz; CH_2CH$_3$); 2,33 (6H; s; ArCH_3); 1,34 (3H; t; *J* = 7,3 Hz; CH$_2$CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 167,05; 144,85; 138,32; 134,39; 131,94; 125,89; 117,83; 60,32; 21,11; 14,28.

Etil-(*E*)-3-(2-metilfenil)prop-2-enoat (A4)

Žuto ulje (3,2 g, 97 %, *E*:*Z* > 99:1) iz 2-metilbenzaldehida (2,0 mL).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,97 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 7,54 (1H; m; *Ar*); 7,29 – 7,16 (3H; m; *Ar*); 6,35 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 4,27 (2H; q; *J* = 7,0 Hz; CH_2CH_3); 2,44 (3H; s; $ArCH_3$); 1,34 (3H; t; *J* = 7,0 Hz; CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 167,05; 142,26; 137,60; 133,42; 130,75; 129,92; 126,38; 126,29; 119,30; 60,46; 19,77; 14,31.

Etil-(*E*)-3-(2,4,6-trimetilfenil)prop-2-enoat (A5)

Bijela krutina (0,53 g; 53 %. *E*:*Z* > 99:1) iz 2,4,6-trimetilbenzaldehida (0,68 g).

S obzirom kako nije bilo moguće naći uvjete za kromatografsko razdvajanje reaktanta i produkta, produkt je izoliran kako slijedi.

Smjesa reaktanta i produkta (0,73 g) dobivena nakon gore navedene obrade, je otopljena u DMF-u (30 mL) te je dodano oksidacijsko sredstvo Oxone ($KHSO_5$ • ½ $KHSO_4$ • ½ K_2SO_4) (0,68 g). Reakcijska smjesa je miješana na 40 °C 20 sati. Potom je smjesa razrijeđena vodom (25 mL) i ekstrahirana s EtOAc (4 x 20 mL). Spojeni organski slojevi su isprani zasićenom otopinom NaCl, sušeni nad Na_2SO_4, profiltrirani i otapalo upareno pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela, *Ψ*(DCM, heksan) = 1 : 1; R_f = 0,33.

t.t. 38,8 – 39,6 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,84 (1H; d; *J* = 16,6 Hz; C*H*); 6,89 (2H; s; *Ar*); 6,05 (1H; d; *J* = 16,6 Hz; C*H*); 4,27 (2H; q; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH_3); 2,33 (6H; s; $ArCH_3$); 2,28 (3H; s; $ArCH_3$); 1,34 (3H; t; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 167,01; 143,16; 138,24; 136,80; 130,96; 129,11; 123,19; 60,44; 21,06; 21,01; 14,31.

Etil-(*E*)-3-(4-metil-1-naftil)prop-2-enoat (A6)

Bijela krutina (1,6 g; 95 %; *E*:*Z* > 99:1) iz 4-metil-1-naftaldehida (1,2 g).

t.t. 76,9 – 77,9 °C

ν_{max}/cm^{-1} 1703, 1632, 1306, 1183, 977, 830, 822, 759.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,53 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 8,25 – 8,21 (1H; m; *Ar*); 8,06–8,02 (1H; m; *Ar*); 7,66 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 7,60 – 7,56 (2H; m; *Ar*); 7,33 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 6,50 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 4,33 (2H; q; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH$_3$); 2,72 (3H; s; ArCH_3); 1,39 (3H; t; *J* = 7,1 Hz; CH$_2$CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 167,03; 141,81; 137,23; 132,69; 131,41; 130,15; 126,43; 126,43; 126,02; 124,75; 123,92; 120,04; 60,51; 19,80; 14,37.

Etil-(*E*)-3-(fenantren-9-il)prop-2-enoat (A7)

Bijela krutina (1,92 g; 95 %; *E*:*Z* > 99:1) iz 9-fenantrilaldehida (1,51 g).

t.t. 124,3 – 125,5 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,74 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 8,67 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 8,52 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 8,21 (1H; d; *J* = 6,9 Hz; *Ar*); 7,98 (1H; s; *Ar*); 7,91 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 7,75 – 7,57 (4H; m; *Ar*); 6,61 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 4,35 (2H; q; *J* = 7,4 Hz; CH_2CH$_3$); 1,40 (3H; t; *J* = 7,4 Hz; CH$_2$CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 166,80; 142,36; 131,16; 131,06; 130,98; 130,40; 130,05; 129,17; 127,60; 127,07; 127,01; 126,92; 126,49; 124,37; 123,17; 122,59; 121,54; 60,63; 14,37.

Etil-(*E*)-3-(2-metil-1-naftil)prop-2-enoat (A8)

Bezbojno ulje (1,20 g; 68 %; *E*:*Z* > 99:1) iz 2-metil-1-naftaldehida (1,25 g).

Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela, *Ψ*(DCM, MeOH) = 100 : 1; R_f = 0,77.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,20 (1H; d; *J* = 16,4 Hz; C*H*); 8,05 (1H; d; *J* = 7,7 Hz; *Ar*); 7,82 (1H; d; *J* = 7,3 Hz; *Ar*); 7,74 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 7,53 – 7,42 (2H; m; *Ar*); 7,35 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 6,24 (1H; d; *J* = 16,4 Hz; C*H*); 4,34 (2H; q; *J* = 7,3 Hz; CH_2CH$_3$); 2,53 (3H; s; ArCH_3); 1,39 (3H; t; *J* = 7,3 Hz; CH$_2$CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 166,61; 142,51; 134,03; 132,08; 131,45; 130,79; 128,86; 128,54; 128,27; 126,51; 125,60; 125,18; 124,59; 60,64; 20,96; 14,33.

Etil-(*E*)-3-(2-naftil)prop-2-enoat (A9)

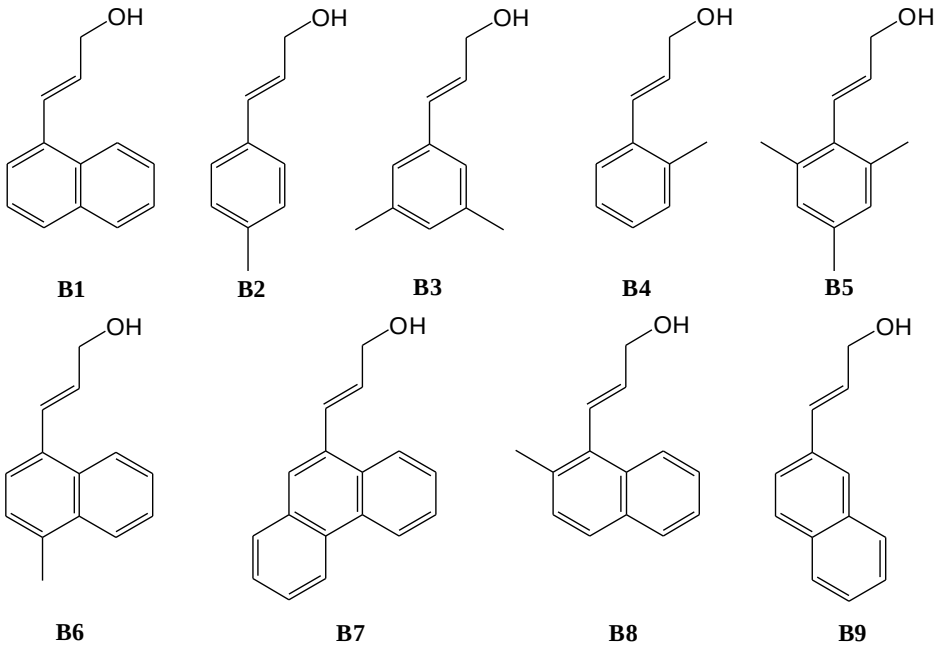
Bijela krutina (3,82 g; 99 %; *E*:*Z* > 99:1) iz 2-naftaldehida (2,66 g).

t.t. 70,2 – 70,9 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,91 (2H; d; *J* = 16,3 Hz; C*H*, *Ar*); 7,86 – 7,81 (3H; m; *Ar*); 7,67 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,54 – 7,49 (2H; m; *Ar*); 6,55 (1H; d; *J* = 16,3 Hz; C*H*); 4,30 (2H; q; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH_3); 1,36 (3H; t; *J* = 7,1 Hz; CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 167,03; 144,60; 134,22; 133,32; 132,02; 129,81; 128,67; 128,54; 127,77; 127,18; 126,69; 123,54; 118,50; 60,50; 14,34.

*3.2.2. Sinteza (E)-3-arilprop-2-en-1-ola **B1** – **B9***



Opća procedura za sintezu alkohola B1 – B9

Otopina odgovarajućeg akrilnog estera (1 ekv) u suhom DCM-u (5 mL po 1 mmol estera) ohlađena je u atmosferi argona na -30 °C te je polako dokapan diizobutilaluminijev hidrid, DIBAL-H (1,0 mol L^{-1} otopina u toluenu, 2 ekv). Reakcijska smjesa je miješana 3 sata na -30 °C. Potom je dodan EtOH (2 mL po 1 mmol estera) i zasićena vodena otopina kalijevog natrijevog tartrata, Rochelleova sol (3 mL po 1 mmol estera). Slojevi su odvojeni te je vodeni ispran 3 puta s DCM-om. Spojeni organski slojevi su sušeni nad Na_2SO_4, profiltrirani i otapalo upareno pod sniženim tlakom.

(2*E*)-3-(1-Naftil)prop-2-en-1-ol (B1)

Žuto ulje (5,3 g; 99 %) iz **A1** (6,5 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,11 (1H; m; *Ar*); 7,84 (1H; m; *Ar*); 7,76 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,57 (1H; d; *J* = 7,0 Hz; *Ar*); 7,51 – 7,40 (3H; m; Ar); 7,37 (1H; d; *J* = 15,7 Hz; C*H*); 6,36 (1H; dt; *J* = 5,5; 15,7 Hz; C*H*CH_2); 4,40 (2H; d; *J* = 5,5 Hz, CHC*H*$_2$); 1,84 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 134,48; 133,63; 131,82; 131,18; 128,57; 128,16; 128,05; 126,09; 125,82; 125,65; 123,94; 123,77; 63,92.

(2*E*)-3-(4-Metilfenil)prop-2-en-1-ol (B2)

Bijela krutina (4,0 g; 99 %) **A2** (5,1 g).

t.t. 46,9 – 47,7 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,28 (2H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 7,14 (2H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 6,59 (1H; d; *J* = 15,7 Hz; C*H*); 6,33 (1H; dt; *J* = 5,8; 15,7 Hz; C*H*CH_2); 4,31 (2H; d; *J* = 5,8 Hz, CHCH_2); 2,36 (3H; s; ArCH_3); 1,90 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 137,54; 133,92; 131,14; 129,31; 127,50; 126,41; 63,76; 21,22.

(2*E*)-3-(3,5-Dimetilfenil)prop-2-en-1-ol (B3)

Žuto ulje (0,79 g; 98 %) iz **A3** (1,0 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3410, 1698, 1682, 1603, 968, 852, 690.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,02 (2H; s; *Ar*); 6,90 (1H; s; *Ar*); 6,56 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 6,34 (1H; dt; *J* = 5,7; 16,1 Hz; C*H*CH_2); 4,31 (2H; d; *J* = 5,7 Hz; CHCH_2); 2,31 (6H; s; ArCH_3); 1,54 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 138,04; 136,60; 131,42; 129,45; 128,13; 124,39; 63,82; 21,23.

(2*E*)-3-(2-Metilfenil)prop-2-en-1-ol (B4)

Žuto ulje (0,75 g; 96 %) iz **A4** (1,01 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3330, 1486, 1459, 1110, 1086, 967, 746.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,48 – 7,44 (1H; m; *Ar*); 7,20 – 7,15 (3H; m; *Ar*); 6,85 (1H; d; *J* = 15,8 Hz; C*H*); 6,26 (1H; dt; *J* = 5,7; 15,8 Hz; C*H*CH_2); 4,35 (2H; d; *J* = 5,7 Hz; CHCH_2); 2,37 (3H; s; ArCH_3); 1,96 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 135,75; 135,42; 130,23; 129,83; 128,86; 127,50; 126,04; 125,69; 63,80; 19,69.

(2*E*)-3-(2,4,6-Trimetilfenil)prop-2-en-1-ol (B5)

Bijela krutina (0,50 g; 99 %) iz **A5** (0,63 g).

t.t. 57,2 – 58,0 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 6,88 (2H; s; *Ar*); 6,58 (1H; d; *J* = 16,2 Hz; C*H*); 5,88 (1H; dt; *J* = 5,4; 16,2 Hz; C*H*CH_2); 4,35 (2H; d; *J* = 5,4 Hz; CHC*H*$_2$); 2,29 (6H; s; ArC*H*$_3$); 2,27 (3H; s; ArC*H*$_3$); 1,52 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 136,24; 135,83; 133,42; 133,35; 128,84; 128,57; 64,09; 20,88; 20,84.

(2*E*)-3-(4-Metil-1-naftil)prop-2-en-1-ol (B6)

Bijela krutina (1,72 g; 99 %) iz **A6** (2,12 g).

t.t. 100,2 – 101,1 °C

ν_{max}/cm^{-1} 3340, 1412, 1015, 966, 840, 752.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,16 – 8,13 (1H; m; *Ar*); 8,04 – 8,01 (1H; m; *Ar*); 7,57 - 7,49 (3H; m; *Ar*); 7,37 (1H; d; *J* = 15,7 Hz; C*H*); 7,30 (1H; d; *J* = 7,3 Hz; *Ar*); 6,36 (1H; dt; *J* = 5,7; 15,7 Hz; C*H*CH_2); 4,43 (2H; d; *J* = 5,7 Hz; CHC*H*$_2$); 2,70 (3H; s; ArC*H*$_3$); 1,61 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 134,36; 132,83; 132,63; 131,23; 131,08; 128,56; 126,50; 125,71; 125,65; 124,65; 124,31; 123,71; 64,04; 19,60.

(2*E*)-3-(Fenantren-9-il)prop-2-en-1-ol (B7)

Svijetla krutina (2,89 g; 92 %) iz **A7** (3,71 g).

t.t. 141,7 – 142,9 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,73 (1H; d; *J* = 7,6 Hz; *Ar*); 8,66 (1H; d; *J* = 8,1 Hz;

Ar); 8,16 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 7,88 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 7,82 (1H; s; *Ar*); 7,71 - 7,56 (4H; m; *Ar*); 7,38 (1H; d; *J* = 15,6 Hz; C*H*); 6,48 (1H; dt; *J* = 5,5; 15,6 Hz; C*H*CH_2); 4,48 (2H; d; *J* = 5,5 Hz; CHCH_2); 1,65 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 133,44; 132,19; 131,73; 130,55; 130,32; 130,18; 128,71; 128,61; 126,75; 126,61; 126,53; 126,50; 124,87; 124,60; 123,06; 122,49; 63,86.

(2*E*)-3-(2-Metil-1-naftil)prop-2-en-1-ol (B8)

Bezbojno ulje (0,91 g; 99 %) iz **A8** (1,11 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,09 (1H; d; *J* = 8,0 Hz; *Ar*); 7,81 (1H; d; *J* = 7,1 Hz; *Ar*); 7,69 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,49 – 7,39 (2H; m; *Ar*); 7,34 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 6,95 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 6,05 (1H; dt; *J* = 5,4; 16,1 Hz; C*H*CH_2); 4,48 (2H; d; *J* = 5,4 Hz; CHCH_2); 2,49 (3H; s; ArCH_3); 1,73 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 135,42; 133,09; 132,95; 132,17; 131,99; 128,86; 128,13; 127,64; 127,00; 125,89; 125,07; 124,82; 63,94; 20,91.

(2*E*)-3-(2-Naftil)prop-2-en-1-ol (B9)

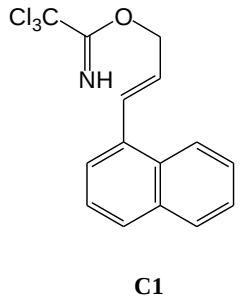
Bijela krutina (3,82 g; 99 %) iz **A9** (2,66 g).

t.t. 110,1 – 111,2 °C

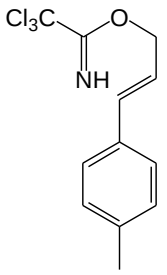
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,84 – 7,75 (3H; m; *Ar*); 7,73 (1H, s, *Ar*); 7,60 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,50 – 7,42 (2H; m; *Ar*) 6,78 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 6,49 (1H; dt; *J* = 5,7; 15,9 Hz; C*H*CH_2); 4,38 (2H; d; *J* = 5,7 Hz; CHCH_2); 1,73 (1H; bs; O*H*).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 134,13; 133,56; 133,02; 131,18; 128,89; 128,21; 127,95; 127,63; 126,41; 126,24; 125,88; 123,55; 63,73.

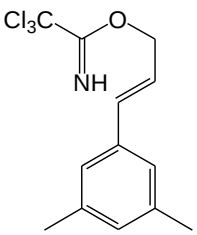
*3.2.3. Sinteza (E)-3-arilalil-2,2,2-trikloracetimidata **C1** – **C9***



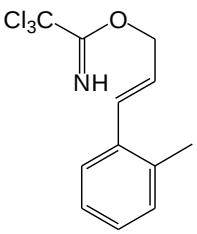
C1



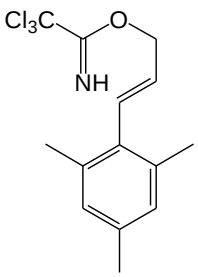
C2



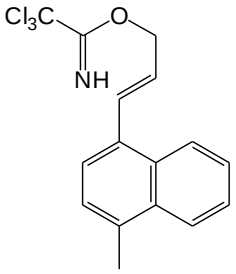
C3



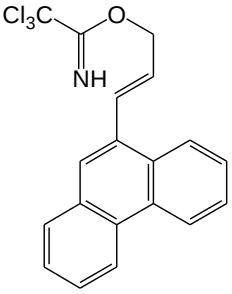
C4



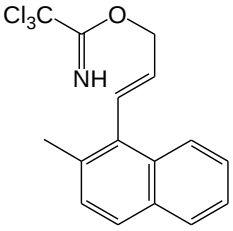
C5



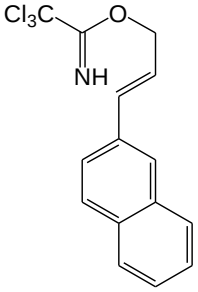
C6



C7



C8



C9

Opća procedura za sintezu trikloracetimidata C1 – C9

U otopinu odgovarajućeg alkohola (1 ekv) u suhom DCM-u (6 mL po 1 mmol alkohola) dodan je DBU (0,2 ekv). Otopina je ohlađena na 0 °C te je dokapan trikloracetonitril (1,1 ekv). Reakcija je gotova nakon 15 min. Otapalo je upareno i dobiveni tamni ostatak profiltriran preko kratkog stupca neutralnog aluminijevog oksida, *Ψ*(EtOAc, heksan) = 1 : 9. Uparavanjem otapala pod sniženim tlakom dobiven je produkt.

(*E*)-3-(1-Naftil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C1)

Žuto ulje (9,0 g; 95 %) iz **B1** (5,3 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3340, 1667, 1306, 1079, 970, 795.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,42 (1H; bs; N*H*); 8,11 (1H; d; *J* = 8,0 Hz; *Ar*); 7,87 - 7,79 (2H; m; *Ar*); 7,64 (1H; d; *J* = 7,1 Hz; *Ar*); 7,56 – 7,43 (4H; m; *Ar*, C*H*); 6,43 (1H; dt; *J* = 6,0; 15,6 Hz; C*H*CH_2); 5,10 (2H; d; *J* = 5,9 Hz; CHCH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,57; 133,96; 133,61; 131,51; 131,16; 128,58; 128,47; 126,25; 125,88; 125,58; 125,53; 124,15; 123,66; 69,71.

(*E*)-3-(4-Metilfenil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C2)

Žuto ulje (3,97 g; 89 %) iz **B2** (2,27 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3344, 1716, 1664, 1308, 1289, 1078, 968, 798.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,35 (1H; bs; N*H*); 7,32 (2H; d; *J* = 8,0 Hz; *Ar*); 7,14 (2H; d; *J* = 8,0 Hz; *Ar*); 6,73 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 6,35 (1H; dt; *J* = 6,3; 15,9 Hz; C*H*CH_2); 4,96 (2H; dd; *J* = 1,2; 6,3 Hz; CHCH_2); 2,35 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,58; 138,07; 134,59; 133,36; 129,30; 126,62; 121,24; 69,93; 21,22.

(*E*)-3-(3,5-Dimetilfenil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C3)

Žuto ulje (1,34 g; 93 %) iz **B3** (0,77 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3376, 1696, 1608, 1381, 1110, 968, 837.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,35 (1H; bs; N*H*); 7,05 (2H; s; *Ar*); 6,92 (1H; s; *Ar*); 6,70 (1H; d; *J* = 15,8 Hz; C*H*); 6,37 (1H; dt; *J* = 6,3; 15,8 Hz; C*H*CH_2); 4,96 (2H; dd; *J* = 1,2; 6,3 Hz; CHCH_2); 2,32 (6H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,60; 138,08; 136,09; 134,81; 129,88; 124,60; 121,93; 69,88; 21,21.

(*E*)-3-(2-Metilfenil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C4)

Žuto ulje (1,3 g; 94 %) iz **B4** (0,70 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3343, 1668, 1308, 1285, 1078, 968, 798, 745.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,37 (1H; bs; N*H*); 7,49 – 7,45 (1H; m; *Ar*); 7,20 – 7,15 (3H; m; *Ar*); 6,99 (1H; d; *J* = 15,9 Hz; C*H*); 6,28 (1H; dt; *J* = 6,1; 15,9 Hz; C*H*CH_2); 5,00 (2H; dd; *J* = 1,4; 6,1 Hz; CHCH_2); 2,36 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,54; 135,73; 135,34; 132,22; 130,34; 127,99; 126,14; 125,84; 123,60; 69,78; 19,72.

(*E*)-3-(2,4,6-Trimetilfenil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C5)

Bezbojno ulje (0,87 g; 95 %) iz **B5** (0,5 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3346, 1667, 1302, 1078, 979, 794.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,36 (1H; bs; N*H*); 6,87 (2H; s; *Ar*); 6,75 (1H; d; *J* = 16,3 Hz; C*H*); 5,90 (1H; dt; *J* = 6,1; 16,3 Hz; C*H*CH_2); 5,00 (2H; dd; *J* = 1,2; 6,1 Hz; CHC*H*$_2$); 2,27 (9H; s; ArC*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,47; 136,56; 135,89; 132,99; 132,79; 128,59; 127,24; 69,70; 20,91; 20,76.

(*E*)-3-(4-Metil-1-naftil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C6)

Žuto ulje (2,86 g; 96 %) iz **B6** (1,72 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3375, 1695, 1385, 1112, 968, 835, 753.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,41 (1H; bs; N*H*); 8,14 – 8,12 (1H; m; *Ar*); 8,04 – 8,02 (1H; m; *Ar*); 7,55 – 7,51 (4H; m; *Ar*, C*H*); 7,31 (1H; d; *J* = 7,4 Hz; *Ar*); 6,39 (1H; dt; *J* = 6,0; 15,6 Hz; C*H*CH_2); 5,09 (2H; dd; *J* = 1,3; 6,0 Hz; CHC*H*$_2$); 2,70 (3H; s; ArC*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,60; 134,84; 132,65; 132,35; 131,89; 131,24; 126,49; 125,89; 125,73; 124,79; 124,70; 124,24; 123,94; 69,88; 19,67.

(*E*)-3-(Fenantren-9-il)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C7)

Žuto ulje (3,61 g; 97 %) iz **B7** (2,29).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,73 (1H; d; *J* = 7,5 Hz; *Ar*); 8,67 (1H; d; *J* = 7,7 Hz; *Ar*); 8,45 (1H; bs; N*H*); 8,15 (1H; d; *J* = 7,5 Hz; *Ar*); 7,89 (1H; d; *J* = 7,5 Hz; *Ar*); 7,86 (1H, s, *Ar*); 7,72 – 7,57 (4H, m, *Ar*); 7,53 (1H; d; *J* = 15,5 Hz; C*H*); 6,51 (1H; dt; *J* = 5,9; 15,5 Hz; C*H*CH_2); 5,13 (2H; dd; *J* = 1,3; 5,9 Hz; CHC*H*$_2$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,58; 132,95; 131,97; 131,62; 130,42; 130,34; 128,70; 126,80; 126,72; 126,57; 125,96; 125,16; 124,53; 123,09; 122,51; 69,61.

(*E*)-3-(2-Metil-1-naftil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C8)

Bezbojno ulje (1,17 g; 97 %) iz **B8** (0,69 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,44 (1H; bs; N*H*); 8,08 (1H; d; *J* = 7,9 Hz; *Ar*); 7,81 (1H; d; *J* = 6,7 Hz; *Ar*); 7,70 (1H; d; *J* = 8,3 Hz; *Ar*); 7,49 – 7,39 (2H; m; *Ar*); 7,34 (1H; d; *J* = 8,3 Hz; *Ar*); 7,12 (1H; d; *J* = 16,3 Hz; C*H*); 6,08 (1H; dt; *J* = 5,9; 16,3 Hz; C*H*CH_2); 5,14 (2H; dd; *J* = 1,4; 5,9 Hz; CHCH_2); 2,49 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,48; 133,06; 132,64; 132,10; 131,86; 131,47; 129,26; 128,78; 128,09; 127,24; 125,98; 124,97; 124,84; 69,41; 20,79.

(*E*)-3-(2-Naftil)alil-2,2,2-trikloracetimidat (C9)

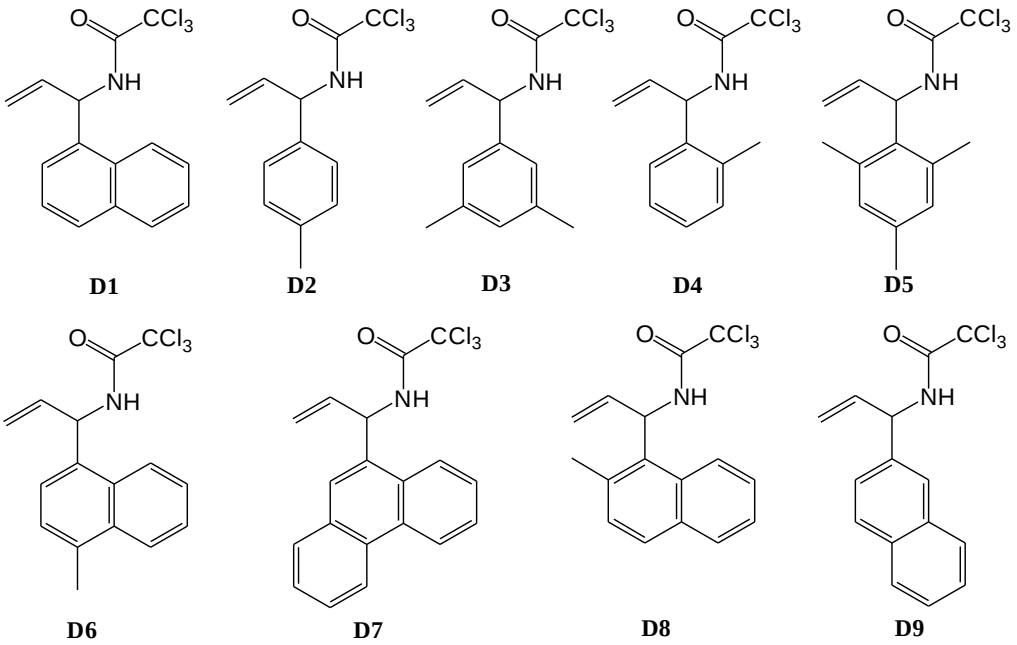
Bijela krutina (4,11 g; 92 %) iz **B9** (2,50 g).

t.t. 67,5 – 68,7 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,39 (1H; bs; N*H*); 7,83 – 7,79 (3H; m; *Ar*); 7,78 (1H; s; *Ar*); 7,63 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,49 – 7,44 (2H; m; *Ar*); 6,92 (1H; d; *J* = 16,1 Hz; C*H*); 6,53 (1H; dt; *J* = 6,2; 16,1 Hz; C*H*CH_2); 5,04 (2H; dd; *J* = 1,0; 6,2 Hz; CHCH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 162,62; 134,56; 133,66; 133,53; 133,26; 128,30; 128,07; 127,68; 126,95; 126,36; 126,14; 123,56; 122,75; 69,81.

*3.2.4. Sinteza N-(1-arilalil)-2,2,2-trikloracetamida **D1** – **D9***



D1 **D2** **D3** **D4** **D5**

D6 **D7** **D8** **D9**

Opća procedura za sintezu trikloracetamida D1 – D9

U otopinu odgovarajućeg trikloracetimidata (1 ekv) u ksilenu (6 mL po 1 mmol trikloracetimidata) dodan je K_2CO_3 (2 mg/mL) i otopina je miješana na temperaturi povrata preko noći. Reakcijska smjesa je potom ohlađena na sobnu temperaturu, otapalo upareno pod sniženim tlakom i ostatak profiltriran preko kratke kolone silikagela, Ψ(DCM, heksan) = 1 : 1. Uparavanjem filtrata dobiven je produkt.

***N*-[1-(1-Naftil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D1)**

Bijela krutina (7,75 g; 96 %) iz **C1** (8,08 g).

t.t. 109,3 – 110,2 °C

CHN analiza: C 55,28 %; H 3,52 %; N 4,00 %; očekivano za $C_{15}H_{12}Cl_3NO$: C 54,82 %; H 3,68 %; N 4,26 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3284, 1685, 1526, 838, 823, 804.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,03 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 7,89 (2H; t; *J* = 9,2 Hz; *Ar*); 7,61 – 7,45 (4H; m; *Ar*); 6,89 (1H; bs; N*H*); 6,38 – 6,32 (1H; m; C*H*NH); 6,25 (1H; ddd; *J* = 4,4; 10,3; 17,3 Hz; C*H*CH_2); 5,46 (1H; d; *J* = 10,3; C*H*$_2$CH); 5,41 (1H; d; *J* = 17,3; C*H*$_2$CH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: δ 161,02; 135,36; 134,27; 134,09; 131,13; 129,48; 129,00; 127,09; 126,26; 125, 25; 125,20; 123,03; 116,74; 53,29.

N-[1-(4-Metilfenil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D2)

Bijela krutina (3,56 g; 95 %) iz **C2** (3,74 g).

t.t. 78,5 – 79,1 °C

ν_{max}/cm^{-1} 3297, 1695, 1523, 837, 819, 805.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,20 (4H; s; *Ar*); 6,89 (1H; bs; N*H*); 6,04 (1H; ddd; *J* = 5,3; 10,3; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,56 – 5,49 (1H; m; C*H*NH); 5,33 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; C*H*$_2$CH); 5,30 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; C*H*$_2$CH); 2,35 (3H; s; ArC*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 160,88; 138,18; 135,81; 135,74; 129,73; 127,07; 116,83; 56,85; 21,14.

N-[1-(3,5-Dimetilfenil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D3)

Bijela krutina (2,84 g; 95 %) iz **C3** (2,98 g).

t.t. 85,8 – 86,8 °C

ν_{max}/cm^{-1} 3294, 1698, 1529, 831, 822.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 6,97 (1H; s; *Ar*); 6,93 (2H; s; *Ar*); 6,86 (1H; bs; N*H*); 6,04 (1H; ddd; *J* = 5,3; 10,1; 17,4 Hz; C*H*CH_2); 5,52 – 5,46 (1H; m; C*H*NH); 5,33 (1H; d; *J* = 10,1 Hz; C*H*$_2$CH); 5,32 (1H; d; *J* = 17,4 Hz; C*H*$_2$CH); 2,33 (6H; s; ArC*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 160,84; 138,73; 138,69; 135,82; 129,98; 124,89; 116,58; 57,07; 21,30.

***N*-[1-(2-Metilfenil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D4)**

Bijela krutina (1,69 g; 96 %) iz **C4** (1,75 g).

t.t. 69,2 – 69,9 °C

ν_{max}/cm^{-1} 3300, 1690, 1516, 836, 823, 758, 726.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,24 (4H; s; *Ar*); 6,79 (1H; bs; N*H*); 6,06 (1H; ddd; *J* = 4,6; 10,4; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,77 – 5,72 (1H; m; C*H*NH); 5,35 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,26 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; CH_2CH); 2,39 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 160,83; 136,71; 136,64; 135,44; 131,09; 128,34; 126,55; 126,49; 116,60; 53,88; 19,08.

***N*-[1-(2,4,6-Trimetilfenil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D5)**

Bezbojno ulje (0,86 g; 95 %) iz **C5** (0,91 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3445, 1716, 1508, 837, 820, 737, 680.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,23 (1H; bs; N*H*); 6,87 (2H; s; *Ar*); 6,11 – 5,96 (2H; m; C*H*CH_2, C*H*NH); 5,27 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,12 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 2,40 (6H; s; ArCH_3); 2,27 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 160,95; 137,61; 136,30; 135,74; 131,81; 130,25; 116,19; 53,02; 20,79; 20,60.

***N*-[1-(4-Metil-1-naftil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D6)**

Bijela krutina (2,92 g; 95 %) iz **C6** (3,08 g).

t.t. 116,4 – 117,2 °C

ν_{max}/cm^{-1} 3316, 1687, 1507, 826, 760.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,09–8,03 (2H; m; *Ar*); 7,60 – 7,57 (2H; m; *Ar*); 7,41 (1H; d; *J* = 7,1 Hz; *Ar*); 7,32 (1H; d; *J* = 7,1 Hz; *Ar*); 6,86 (1H; bs; N*H*); 6,36 – 6,28 (1H; m; C*H*NH); 6,27 – 6,18 (1H; m; C*H*CH_2); 5,46 (1H; d; *J* = 9,7 Hz; CH_2CH); 5,41 (1H; d; *J* = 16,0 Hz; CH_2CH); 2,72 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 160,98; 135,85; 135,48; 133,23; 132,43; 131,16; 126,72; 126,10; 125,96; 125,08; 123,54; 116,53; 53,26; 19,66.

N-[1-(Fenantren-9-il)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D7)

Bijela krutina (3,16 g; 89 %) iz **C7** (3,56 g).

t.t. 146,6 – 147,3 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,77 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 8,69 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 8,07 (1H; d; *J* = 8,0 Hz; *Ar*); 7,89 (1H; d; *J* = 7,7 Hz; *Ar*); 7,79 (1H; s; *Ar*); 7,73 - 7,66 (3H; m; *Ar*); 7,63 (1H; t; *J* = 7,3 Hz; *Ar*); 6,90 (1H; bs; N*H*); 6,39 – 6,36 (1H; m; C*H*NH); 6,33 (1H; ddd; *J* = 4,2; 10,2; 16,8 Hz; C*H*CH_2); 5,54 (1H; d; *J* = 10,2 Hz; CH_2CH); 5,50 (1H; d; *J* = 16,8 Hz; CH_2CH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,09; 135,13; 132,60; 131,03; 130,87; 130,58; 129,76; 128,85; 127,51; 127,38; 127,03; 126,98; 126,83; 123,76; 123,40; 122,57; 117,01; 53,34.

N-[1-(2-Metil-1-naftil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D8)

Žuto ulje (1,25 g; 83 %) iz **C8** (1,51 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,03 (1H; d; *J* = 8,6 Hz; *Ar*); 7,87 (1H; d; *J* = 8,1 Hz; *Ar*); 7,77 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,56 – 7,42 (3H; m; *Ar*; N*H*); 7,36 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 6,46 – 6,40 (1H; m; C*H*NH); 6,27 (1H; ddd; *J* = 3,5; 10,5; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,35 (1H; dd; *J* = 2,6; 10,5 Hz; CH_2CH); 5,26 (1H; dd; *J* = 2,3; 17,2 Hz; CH_2CH); 2,67 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,39; 136,51; 135,05; 133,36; 130,91; 130,88; 129,64; 129,46; 128,92; 126,59; 124,93; 123,43; 116,42; 52,93; 20,99.

N-[1-(2-Naftil)alil]-2,2,2-trikloracetamid (D9)

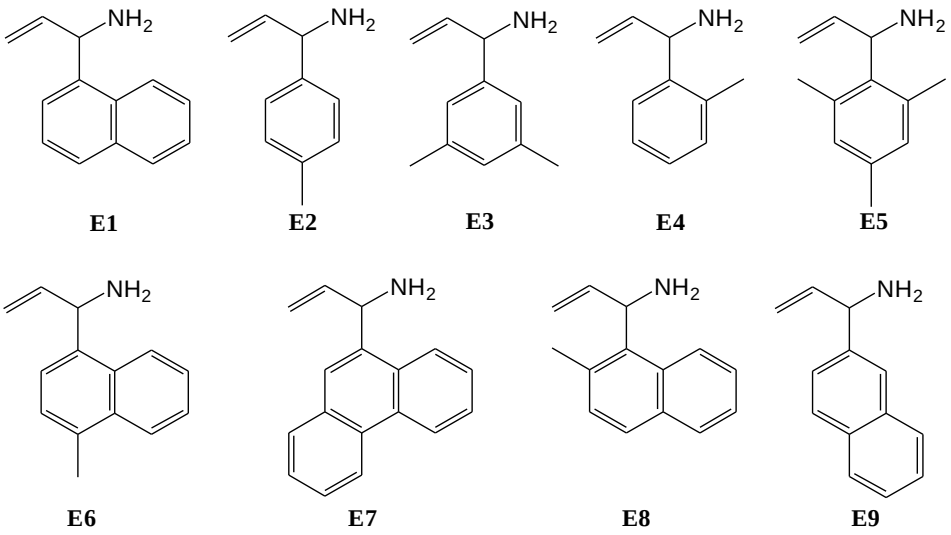
Bijela krutina (3,09 g; 94 %) iz **C9** (3,29 g).

t.t. 76,7 – 77,6 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,89 – 7,79 (4H; m; *Ar*); 7,55 – 7,48 (2H; m; *Ar*); 7,42 (1H, dd, *J* = 1,8; 8,5 Hz; *Ar*); 6,97 (1H; bs; N*H*); 6,17 (1H; ddd; *J* = 5,2; 10,4; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,78 – 5,73 (1H; m; C*H*NH); 5,42 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,38 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; CH_2CH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 160,96; 136,07; 135,54; 133,31; 133,10; 129,06; 128,03; 127,72; 126,60; 126,51; 126,19; 124,87; 117,34; 57,17.

*3.2.5. Sinteza (±)-1-arilprop-2-en-1-amina **E1** – **E9***



Opća procedura za sintezu racemičnih alil-aril-amina E1 – E9

U otopinu odgovarajućeg amida (1 ekv) u apsolutnom etanolu (5 mL po 1 mmol amida), dodana je 5 mol L^{-1} vodena otopina NaOH (30 ekv) te je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcijska smjesa je koncentrirana do vodenog ostatka koji je zakiseljen 5 mol L^{-1} vodenom otopinom HCl do *p*H ~ 1 te ispran s DCM-om (3 puta). Potom je u vodeni sloj dodan kruti Na_2CO_3 do *p*H ~ 8 i ekstrahirano s dietil-eterom (3 puta). Spojeni organski slojevi su sušeni nad Na_2SO_4, profiltrirani i otapalo upareno pod sniženim tlakom.

1-(1-Naftil)prop-2-en-1-amin (E1)

Žuto ulje (3,82 g; 88 %) iz **D1** (7,75 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3300, 1669, 1638, 1594, 1393, 802, 779.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,19 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 7,91 – 7,85 (1H; m; *Ar*); 7,81 – 7,75 (1H; m; *Ar*); 7,62 – 7,43 (4H; m; *Ar*); 6,23 (1H; ddd; *J* = 5,2; 10,4; 17,5 Hz; C*H*CH_2); 5,40 – 5,31 (2H; m; CH_2CH; C*H*NH_2); 5,23 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 2,29 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 141,24; 139,60; 133,95; 130,92; 128,88; 127,84; 126,05; 125,53; 123,52; 123,32; 114,55; 53,84.

1-(4-Metilfenil)prop-2-en-1-amin (E2)

Žuto ulje (1,34 g; 79 %) iz **D2** (3,36 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3375, 3300, 1638, 1511, 917, 818, 761.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,24 (2H; d; *J* = 7,9 Hz ; *Ar*); 7,15 (2H; d; *J* = 7,9 Hz ; *Ar*); 6,02 (1H; ddd; *J* = 6,1; 10,2; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,23 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; CH_2CH); 5,10 (1H; d; *J* = 10,2 Hz; CH_2CH); 4,50 (1H; d; *J* = 6,1 Hz; C*H*NH_2); 2,34 (3H; s; ArCH_3); 1,66 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 142,37; 141,46; 136,70; 129,19; 126,49; 113,47; 58,06; 21,02.

1-(3,5-Dimeilfenil)prop-2-en-1-amin (E3)

Žuto ulje (0,80 g; 76 %) iz **D3** (2,00 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3375, 1638, 1607, 1466, 995, 918, 848, 734.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 6,96 (2H; s; *Ar*); 6,90 (1H; s; *Ar*); 6,02 (1H; ddd; *J* = 6,1; 10,2; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,25 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; CH_2CH); 5,11 (1H; d; *J* = 10,2 Hz; CH_2CH); 4,46 (1H; d; *J* = 6,1 Hz; C*H*NH_2); 2,32 (6H; s; ArCH_3); 1,63 (2H; br. s; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 144,38; 142,35; 138,06; 128,71; 124,37; 113,41; 58,31; 21,25.

1-(2-Metilfenil)prop-2-en-1-amin (E4)

Žuto ulje (0,30 g; 77 %) iz **D4** (0,77 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,39 (1H; d; *J* = 7,2 Hz; *Ar*); 7,25 – 7,13 (3H; m; *Ar*); 6,02 (1H; ddd; *J* = 5,7; 10,2; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,20 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; CH_2CH); 5,12 (1H; d; *J* = 10,2 Hz; CH_2CH); 4,76 (1H; d; *J* = 5,7 Hz; C*H*NH_2); 2,38 (3H; s; ArCH_3); 1,90 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 142,06; 141,34; 135,34; 130,48; 126,92; 126,33; 125,72; 113,85; 54,19; 19,17.

1-(2,4,6-Trimetilfenil)prop-2-en-1-amin (E5)

Žuto ulje (0,38 g; 87 %) dobiveno nakon kolonske kromatografije organskog DCM sloja (*Ψ*(DCM, MeOH) = 9 : 1; R_f = 0,44) iz **D5** (0,80 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3400, 1669, 1662, 1611, 1383, 1266, 917, 852, 737.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 6,83 (2H; s; *Ar*); 6,14 (1H; ddd; *J* = 4,1; 10,3; 17,0 Hz; C*H*CH_2); 5,17 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 5,12 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; CH_2CH); 5,02 – 4,97 (1H; m; C*H*NH_2); 2,37 (6H; s; ArCH_3); 2,25 (3H; s; ArCH_3); 1,60 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 140,77; 136,75; 136,36; 136,24; 130,11; 113,31; 53,23; 20,81; 20,69.

1-(4-Metil-1-naftil)prop-2-en-1-amin (E6)

Žuto ulje (0,48 g; 91 %) dobiveno nakon kolonske kromatografije organskog DCM sloja (*Ψ*(DCM, MeOH) = 9 : 1; R_f = 0,54) iz **D6** (0,91 g).

ν_{max}/cm^{-1} 3375, 1637, 1598, 1391, 1264, 920, 836, 755.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,26 – 8,20 (1H; m; *Ar*); 8,08 – 8,02 (1H; m; *Ar*); 7,58 - 7,52 (2H; m; *Ar*); 7,47 (1H; d; *J* = 7,2 Hz; *Ar*); 7,32 (1H; d; *J* = 7,2 Hz; *Ar*); 6,22 (1H; ddd; *J* = 5,7; 10,3; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,39 – 5,29 (2H; m; CH_2CH, C*H*NH_2); 5,22 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; CH_2CH); 2,69 (3H; s; ArCH_3); 1,78 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 141,70; 138,08; 133,35; 133,07; 131,05; 126,35; 125,72; 125,43; 124,97; 123,92; 123,28; 114,28; 53,85; 19,59.

1-(Fenantren-9-il)prop-2-en-1-amin (E7)

Bezbojno ulje (1,28 g; 91 %) dobiveno nakon kolonske kromatografije organskog DCM sloja (*Ψ*(DCM, MeOH) = 9 : 1; R_f = 0,48) iz **D7** (2,28 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,77 – 8,73 (1H; m; *Ar*); 8,67 (1H; d; *J* = 7,7 Hz; *Ar*); 8,28 – 8,24 (1H; m; *Ar*); 7,91 – 7,87 (1H; m; *Ar*); 7,86 (1H; s; *Ar*); 7,70 – 7,56 (4H; m; *Ar*); 6,29 (1H; ddd; *J* = 5,5; 10,3; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,40 (1H; dt; *J* = 1,5; 17,2 Hz; CH_2CH); 5,34 (1H; d; *J* = 5,5 Hz; C*H*NH_2); 5,28 (1H; dt; *J* = 1,5; 10,3 Hz; CH_2CH); 1,92 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 141,50; 138,10; 131,55; 130,86; 130,19; 129,95; 128,63; 126,60; 126,55; 126,52; 126,23; 124,31; 124,20; 123,27; 122,38; 114,74; 54,02.

1-(2-Metil-1-naftil)prop-2-en-1-amin (E8)

Žuto ulje (0,41 g; 86 %) dobiveno nakon kolonske kromatografije organskog DCM sloja (*Ψ*(DCM, MeOH) = 25 : 1; R_f = 0,27) iz **D8** (0,83 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,40 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,81 (1H; d; *J* = 7,6 Hz; *Ar*); 7,67 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,48 – 7,35 (2H; m; *Ar*); 7,29 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 6,36 (1H; ddd; *J* = 3,9; 10,4; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,44 – 5,40 (1H; m; C*H*NH_2); 5,32 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; CH_2CH); 5,21 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 2,58 (3H; s; ArCH_3); 1,82 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 141,99; 136,67; 133,45; 133,22; 131,33; 129,64; 128,76; 127,60; 125,42; 125,36; 124,53; 113,54; 53,23; 21,04.

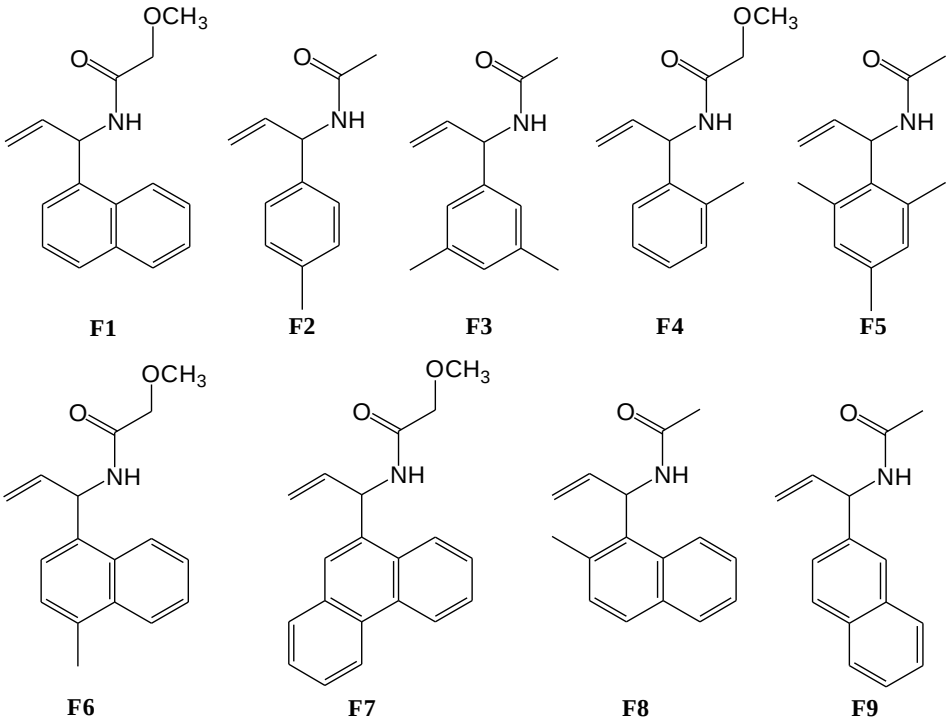
1-(2-Naftil)prop-2-en-1-amin (E9)

Žuto ulje (1,49 g; 87 %) dobiveno nakon kolonske kromatografije organskog DCM sloja (*Ψ*(DCM, MeOH) = 9 : 1; R_f = 0,46) iz **D9** (3,06 g).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,84 – 7,77 (4H; m; *Ar*); 7,50 – 7,42 (3H; m; *Ar*); 6,09 (1H; ddd; *J* = 6,2; 10,4; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,30 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; CH_2CH); 5,17 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 4,75 – 4,69 (1H; m; C*H*NH_2); 3,25 (2H; bs; NH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 140,48; 140,11; 133,38; 132,80; 128,36; 127,91; 127,60; 126,12; 125,86; 125,29; 125,14; 115,07; 58,25.

*3.2.6. Sinteza (±)-N-(1-arilalil)-2-metoksiacetamida i (±)-N-(1-arilalil)acetamida **F1** – **F9***



Opća procedura sintezu amida F1 – F9

Racemični amin (0,30 mmol) je otopljen u inertnoj atmosferi u DCM-u (5 mL) te je u otopinu dokapan trietilamin (0,40 mmol) i potom acetil-klorid ili metoksiacetil-klorid (0,35 mmol). Reakcija je gotova nakon 10 minuta. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom te dobiveni ostatak profiltriran preko kratkog stupca silikagela (Ψ(DCM, MeOH) = 50 : 1). Uparavanjem filtrata dobiven je produkt.

***N*-[1-(1-Naftil)alil]-2-metoksiacetamid (F1)**

Svijetlo ulje (69 mg; 90 %) iz **E1** (55 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,13 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 7,91 – 7,81 (2H; m; *Ar*); 7,59 – 7,42 (4H; m; *Ar*); 6,84 (1H; bs; NH); 6,52 – 6,45 (1H; m; C*H*NH); 6,22 (1H; ddd; *J* =

4,3; 10,4; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,37 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,32 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; CH_2CH); 3,96 (2H; q; *J* = 15,2 Hz; CH_2OCH_3); 3,34 (3H; s; OCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 168,56; 136,84; 135,91; 133,97; 131,18; 128,77; 128,75; 126,67; 125,93; 125,18; 125,02; 123,50; 115,69; 71,84; 59,10; 50,30.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 300 nm; $t_{R(R)}$ = 7,7 min; $t_{R(S)}$ = 9,8 min.

N-[1-(4-Metilfenil)alil]acetamid (F2)

Bijela krutina (55 mg; 98 %) iz **E2** (44 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,16 (4H; m; *Ar*); 5,99 (1H; ddd; *J* = 5,2; 10,4; 17,0 Hz; C*H*CH_2); 5,90 (1H; bs; N*H*); 5,59 (1H; m; C*H*NH); 5,23 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,19 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 2,33 (3H; s; ArCH_3); 2,00 (3H; s; C(O)CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 168,95; 137,62; 137,44; 137,36; 129,37; 127,14; 115,42; 54,83; 23,29; 21,00.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 6,3 min; $t_{R(S)}$ = 6,9 min.

N-[1-(3,5-Dimetilfenil]alil)acetamid (F3)

Bijela krutina (60 mg; 98 %) iz **E3** (48 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 6,92 (1H; s; *Ar*); 6,89 (2H; s; *Ar*); 5,99 (1H; ddd; *J* = 5,2; 10,6; 17,0 Hz; C*H*CH_2); 5,77 (1H; bs; N*H*); 5,59 – 5,53 (1H; m; C*H*NH); 5,23 (1H; d; *J* = 10,6 Hz; CH_2CH); 5,21 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 2,30 (6H; s; ArCH_3); 2,02 (3H; s; C(O)CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 168,94; 140,49; 138,28; 137,49; 129,26; 124,98; 115,21; 55,06; 23,28; 21,20.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 5,6 min; $t_{R(S)}$ = 9,3 min.

N-[1-(2-Metilfenil)alil]-2-metoksiacetamid (F4)

Bezbojno ulje (63 mg; 95 %) iz **E4** (45 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,23 – 7,18 (4H; m; *Ar*); 6,76 (1H; bs; N*H*); 6,03 (1H; ddd; *J* = 4,6; 10,3; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,89 – 5,84 (1H; m; C*H*NH); 5,26 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; C*H*$_2$CH); 5,16 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; C*H*$_2$CH); 3,94 (2H; q; *J* = 15,0 Hz; C*H*$_2$OCH_3); 3,41 (3H; s; OC*H*$_3$); 2,38 (3H; s; ArC*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 168,43; 138,24; 136,95; 136,39; 130,79; 127,70; 126,68; 126,23; 115,47; 71,93; 59,16; 51,00; 19,22.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 6,0 min; $t_{R(S)}$ = 6,6 min.

N-[1-(2,4,6-Timetilfenil)alil]acetamid (F5)

Bezbojno ulje (63 mg; 98 %) iz **E5** (52 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 6,84 (2H; s; *Ar*); 6,13 – 5,93 (3H; m; C*H*CH_2; N*H*; C*H*NH); 5,16 (1H; d; *J* = 10,5 Hz; C*H*$_2$CH); 5,03 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; C*H*$_2$CH); 2,37 (6H; s; ArC*H*$_3$); 2,25 (3H; s; ArC*H*$_3$); 2,00 (3H; s; C(O)C*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 169,04; 137,72; 137,02; 136,42; 133,65; 129,99; 114,62; 50,96; 23,23; 20,79; 20,71.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 5,4 min; $t_{R(S)}$ = 5,4 min.

N-[1-(4-Metil-1-naftil)alil]-2-metoksiacetamid (F6)

Bezbojno ulje (78 mg; 95 %) iz **E6** (60 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,17 – 8,12 (1H; m; *Ar*); 8,07 – 8,02 (1H; m; *Ar*); 7,59 - 7,53 (2H; m; *Ar*); 7,37 (1H; d; *J* = 7,3 Hz; *Ar*); 7,29 (1H; d; *J* = 7,3 Hz; *Ar*); 6,81 (1H; bs; N*H*); 6,49 – 6,42 (1H; m; C*H*NH); 6,21 (1H; ddd; *J* = 4,4; 10,4; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,36 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; C*H*$_2$CH); 5,32 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; C*H*$_2$CH); 3,95 (2H; q; *J* = 15,0 Hz; C*H*$_2$OCH_3); 3,33 (3H; s; OC*H*$_3$); 2,70 (3H; s; ArC*H*$_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 168,48; 136,98; 134,92; 134,09; 133,06; 131,18; 126,26; 125,90; 125,74; 124,79; 124,78; 123,98; 115,46; 71,84; 59,04; 50,28; 19,49.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 95 : 5 : 0,1; 1 mL/min; 300 nm; $t_{R(R)}$ = 10,4 min; $t_{R(S)}$ = 10,4 min.

N-[1-(Fenantren-9-il)alil]-2-metoskiacetamid (F7)

Svijetla krutina (85 mg; 93 %) iz **E7** (70 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,77 – 8,73 (1H; m; *Ar*); 8,67 (1H; d; *J* = 8,2 Hz; *Ar*); 8,21 – 8,16 (1H; m; *Ar*); 7,88 (1H; d; *J* = 7,5 Hz; *Ar*); 7,75 (1H; s; *Ar*); 7,70 – 7,57 (4H; m; *Ar*); 6,87 (1H; bs; N*H*); 6,54 – 6,48 (1H; m; C*H*NH); 6,31 (1H; ddd; *J* = 4,2; 10,5; 17,2 Hz; C*H*CH_2); 5,45 (1H; d; *J* = 10,5 Hz; CH_2CH); 5,40 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; CH_2CH); 3,98 (2H; q; *J* = 15,1 Hz; C$H_2$$OCH_3$); 3,33 (3H; s; OC$H_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 168,68; 136,67; 134,26; 131,10; 130,91; 130,37; 130,06; 128,67; 127,11; 127,06; 126,81; 126,65; 126,35; 124,24; 123,21; 122,48; 116,01; 71,88; 59,09; 50,44.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 50 : 50 : 0,1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(R)}$ = 4,5 min; $t_{R(S)}$ = 4,5 min.

N-[1-(2-Metil-1-naftil)alil]acetamid (F8)

Bijela krutina (67 mg; 94 %) iz **E8** (59 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 8,05 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,84 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,72 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,49 – 7,45 (1H; m; *Ar*); 7,44 – 7,41 (1H; m; *Ar*); 7,33 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 6,54 – 6,51 (1H; m; C*H*NH); 6,27 – 6,20 (2H; m; C*H*CH_2; N*H*); 5,24 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,17 (1H; d; *J* = 17,3 Hz; CH_2CH); 2,64 (3H; s; ArCH_3); 2,00 (3H; s; C(O)CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 169,40; 138,58; 134,74; 133,29; 132,80; 131,12; 129,60; 129,19; 128,24; 126,05; 124,63; 124,25; 114,84; 50,77; 23,26; 21,05.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm;

$t_{R(R)}$ = 6,7 min; $t_{R(S)}$ = 11,6 min.

N-[1-(2-Naftil)alil]acetamid (F9)

Bijela krutina (58 mg; 86 %) iz **E9** (55 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 7,83 – 7,79 (3H; m; *Ar*); 7,74 (1H; s; *Ar*); 7,49 - 7,46 (2H; m; *Ar*); 7,39 (1H; d; J = 8,5 Hz; *Ar*); 6,09 (1H; ddd; *J* = 5,2; 10,4; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 6,05 (1H; bs; N*H*); 5,81 (1H; m; C*H*NH); 5,30 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,26 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; CH_2CH); 2,04 (3H; s; OCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 169,15; 137,88; 137,17; 133,28; 132,79; 128,53; 127,86; 127,60; 126,27; 126,06; 125,90; 125,36; 116,04; 55,15; 23,31.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(R)}$ = 11,2 min; $t_{R(S)}$ = 16,5 min.

*3.2.7. Enzimska rezolucija (±)-1-arilprop-2-en-1-amina **E1** – **E9***

Opća procedura za enzimsku rezoluciju racemičnih amina

Racemični amin (1 ekv) je otopljen u smjesi acilnog donora i organskog otapala (12 mL MTBE po 1 mmol amina i 2,5 ekv etil-metoksiacetata, odnosno 10 mL smjese *Ψ*(heksan, izopropil-acetat) = 1 : 1 po 1 mmol amina) te je dodana imobilizirana *Candida antarctica* lipaza B (0,3 g po 1 mmol amina). Reakcijska smjesa je miješana na 30 °C. Tijek reakcije je praćen pomoću kiralnog HPLC-a, Chiralcel OD-H kolona, 1 mL/min uz pokretnu fazu navedenu uz pojedini amin, UV detekcija. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana i filtrat koncentriran pod sniženim tlakom. Dodana je 1 mol L^{-1} HCl (3,5 mL po 1 mmol početnog amina) te je dobivena smjesa isprana DCM-om (3 puta). U vodeni sloj je dodan kruti Na_2CO_3 do *p*H ~ 8. Dobivena otopina je ekstrahirana s dietil-eterom (3 puta). Spojeni eterski slojevi su sušeni nad Na_2SO_4, profiltrirani te je otapalo upareno pod sniženim tlakom.

(*S*)-1-(1-Naftil)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E1)

45 %; *ev* > 99 %; etil-metoksiacetat u MTBE.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 300 nm; $t_{R(S)}$ = 9,0 min; $t_{R(R)}$ = 10,1 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -46,0 (*c* 0,9; $CHCl_3$).

(*S*)-1-(4-Metilfenil)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E2)

39 %; *ev* 99 %; izopropil-acetat u heksanu.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 5,7 min; $t_{R(S)}$ = 6,4 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -9,7 (*c* 1,1; DCM).

(*S*)-1-(3,5-Dimetilfenil)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E3)

43 %; *ev* 81 %; izopropil-acetat u heksanu.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm;

$t_{R(R)}$ = 5,0 min; $t_{R(S)}$ = 5,3 min.

(*S*)-1-(2-Metilfenil)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E4)

Nije izoliran; *ev* 63 %; etil-metoksiacetat u MTBE.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 6,4 min; $t_{R(S)}$ = 6,9 min.

1-(2,4,6-Trimetilfenil)prop-2-en-1-amin (E5)

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; t_{R1} = 5,06 min; t_{R2} = 5,59 min.

(*S*)-1-(4-Metil-1-naftil)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E6)

48 %; *ev* > 99 %; etil-metoksiacetat u MTBE.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 95 : 5 : 0,1; 1 mL/min; 300 nm; $t_{R(S)}$ = 11,7 min; $t_{R(R)}$ = 13,3 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -40,2 (*c* 3,2; DCM).

(*S*)-1-(Fenantren-9-il)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E7)

42 %; *ev* 99 %; etil-metoksiacetat u MTBE.

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, EtOH, dietilamin) = 50 : 50 : 0,1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 10,6 min; $t_{R(R)}$ =17,7 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -19,2 (*c* 1,0; DCM).

1-(2-Metil-1-naftil)prop-2-en-1-amin (E8)

Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 268 nm; $t_{R(R)}$ = 7,3 min; $t_{R(S)}$ = 10,9 min.

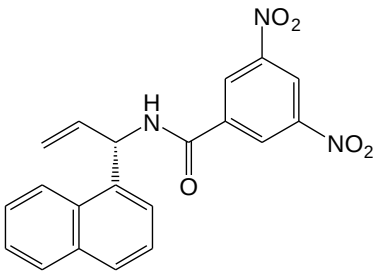
(*S*)-1-(2-Naftil)prop-2-en-1-amin ((*S*)-E9)

49 %; *ev* 98 %; izopropil-acetat u heksanu.

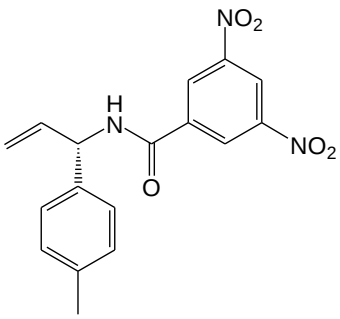
Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(R)}$ = 9,6 min; $t_{R(S)}$ = 11,9 min.

$[\alpha]_D^{25}$ 5,5 (*c* 1,3; DCM).

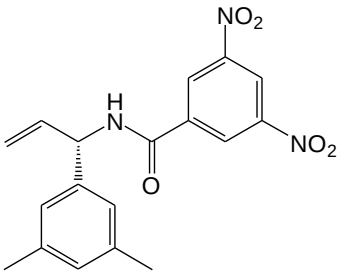
*3.2.8. Sinteza (S)-N-(1-arilpropil)-3,5,-dinitrobenzamidnih selektora **KS-1** – **KS-9***



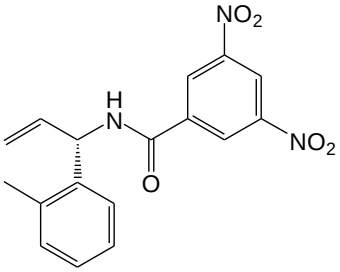
KS-1



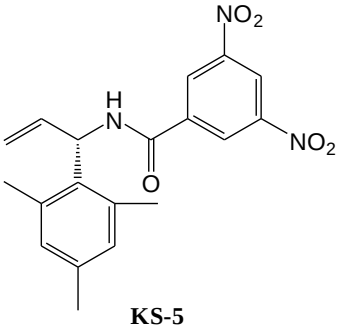
KS-2



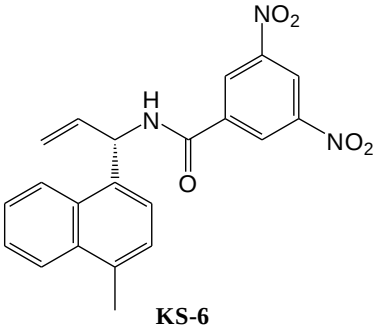
KS-3



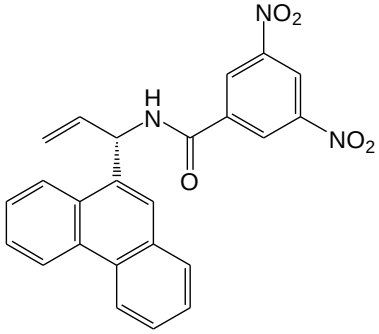
KS-4



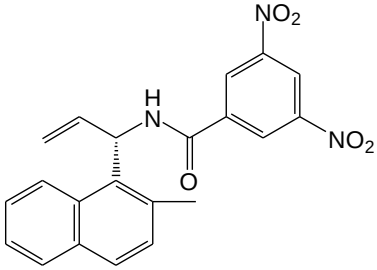
KS-5



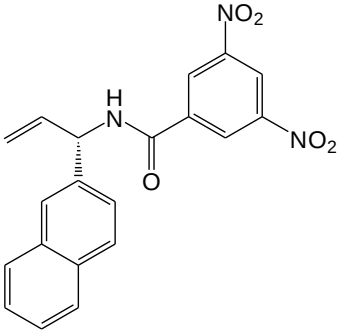
KS-6



KS-7



KS-8



KS-9

Opća procedura za sintezu DNB-amida

U otopinu odgovarajućeg amina (1 ekv) u suhom THF-u (7 mL po 1 mmol amina) u inertnoj atmoferi dodan je 3,5-dinitrobenzoil-klorid (1,1 ekv). Dobivena otopina je ohlađena na 0 °C te je dokapan propilen-oksid (1 mL po 1 mmol amina). Reakcijska smjesa je miješana 1 sat na 0 °C te još 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je koncentrirana pod sniženim tlakom. Sirovi produkt je pročišćen kristalizacijom ili kromatografski.

(*S*)-*N*-[1-(1-Naftil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (KS-1)

Bijela krutina (1,21 g, 90 %) iz **F1** (0,65 g).

Pročišćen kristalizacijom iz metanola uz 1 % acetona.

t.t. 210,1 – 211,7 °C

CHN analiza: C 63,40 %; H 3,98 %; N 10,85 %; očekivano za $C_{20}H_{15}N_3O_5$: C 63,66 %; H 4,01 %; N 11,14 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3280, 1644, 1545, 1344, 1074, 922, 805, 782, 731, 717.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 9,09 (1H; t; *J* = 2,2 Hz; *DNBAr*); 8,91 (2H; d; *J* = 2,2 Hz; *DNBAr*); 8,01 (1H; m; *Ar*); 7,83 – 7,88 (2H; m; *Ar*); 7,43 – 7,56 (4H; m; *Ar*); 6,92 (1H; bs; N*H*); 6,55 (1H; m; C*H*NH); 6,26 (1H; ddd; *J* = 4,6; 10,5; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,45 (1H; d; *J* = 10,5; CH_2CH); 5,34 (1H; d; *J* = 17,1; CH_2CH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,28; 147,97; 136,68; 135,38; 134,39; 133,47; 130,51; 128,78; 128,46; 126,68; 126,61; 125,79; 124,75; 124,70; 122,48; 120,64; 116,35; 51,77.

ev > 99 %; **KNF-A**; MeOH; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 3,7 min; $t_{R(R)}$ = 4,5 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -14,3 (*c* 1,0; DCM).

(*S*)-*N*-[1-(4-Metilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (KS-2)

Bijela krutina (1,19 g; 92 %) iz **F2** (0,56 g).

Prošišćen kristalizacijom iz metanola.

t.t. 191,9 – 192,8 °C

CHN analiza: C 59,44 %; H 4,49 %; N 12,28 %; očekivano za $C_{17}H_{15}N_3O_5$: C 59,82 %; H 4,43 %; N 12,31 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3317, 1639, 1543, 1342, 1077, 921, 730, 722.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 9,14 (1H; t; *J* = 2,0 Hz; *DNBAr*); 8,97 (2H; d; *J* = 2,0 Hz; *DNBAr*); 7,25 (2H; d; *J* = 8,1 Hz; *Ar*); 7,17 (2H; d; *J* = 8,1 Hz; *Ar*); 6,95 (1H; bs; N*H*); 6,14 (1H; ddd; *J* = 5,5; 10,4; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,79 (1H; m; C*H*NH); 5,37 (1H; d; *J* = 10,4; CH_2CH); 5,31 (1H; d; *J* = 17,1; CH_2CH); 2,34 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,76; 148,66; 138,21; 137,75; 136,36; 136,27; 129,74; 127,30; 127,20; 121,17; 116,95; 56,29; 21,11.

ev > 99 %; **KNF-A**; *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 1 : 1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 6,7 min; $t_{R(R)}$ = 8,7 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -24,2 (*c* 1,0; DCM).

***N*-[1-(3,5-Dimetilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid**

Bijela krutina (0,20 g; 86 %) iz **E3** (0,10 g).

Pročišćen kristalizacijom iz metanola.

t.t. 202,7 – 204,2 °C

CHN analiza: C 61,14 %; H 5,08 %; N 11,53 %; očekivano za $C_{18}H_{17}N_3O_5$: C 60,84 %; H 4,82 %; N 11,83 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3313, 1649, 1543, 1345, 1080, 917, 849, 729, 698.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 9,16 (1H; t; *J* = 2,1 Hz; *DNBAr*); 8,95 (2H; d; *J* = 2,1 Hz; *DNBAr*); 6,98 (3H; s; *Ar*); 6,56 (1H; br s; N*H*); 6,12 (1H; ddd; *J* = 5,5; 10,3; 17,0 Hz; C*H*CH_2); 5,77 (1H; m; C*H*NH); 5,36 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; CH_2CH); 5,31 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 2,33 (6H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,68; 148,70; 139,27; 138,82; 137,82; 136,36; 130,02; 127,17; 125,15; 121,13; 116,70; 56,52; 21,30.

(*S*)-*N*-[1-(3,5-Dimetilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (**KS-3**) je pripravljen odjeljivanjem enantiomera racemičnog spoja na semi-preparativnoj kiralnoj HPLC koloni; **KNF-A** kolona dimenzija 300 mm x 8 mm; *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 50 : 100 : 1; 5 mL/min; 254 nm.

Racemični amid (100 mg) je otopljen u *Ψ*(DCM, heksan) = 4 : 1 (20 mL) i 0,8 – 0,9 mL je injektirano na kolonu. Za odjeljivanje enantiomera 100 mg amida potrebna su otprilike 23 slijeda.

t.t. 175,0 – 175,6 °C

ev > 99 %; **KNF-A**; *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 50 : 100 : 1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 8,6 min; $t_{R(R)}$ = 11,3 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -33,7 (*c* 0,9; DCM).

_N_-[1-(2-Metilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid

Bijela krutina (0,70 g; 97 %) iz **E4** (0,31 g).

Pročišćen kolonskom kromatografijom (*Ψ*(DCM, MeOH) = 100 : 1; R_f = 0,63).

t.t. 160,2 – 161,5 °C

CHN analiza: C 59,63 %; H 4,29 %; N 11,99 %; očekivano za $C_{17}H_{15}N_3O_5$: C 59,82 %; H 4,43 %; N 12,31 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3289, 1641, 1540, 1344, 1078, 920, 731, 720.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 9,15 (1H; t; *J* = 2,0 Hz; *DNBAr*); 8,95 (2H; d; *J* = 2,0 Hz; *DNBAr*); 7,33 – 7,28 (1H; m; *Ar*); 7,25 – 7,20 (3H; m; *Ar*); 6,68 (1H; bs; N*H*); 6,14 (1H; ddd; *J* = 4,9; 10,2; 16,9 Hz; C*H*CH_2); 6,03 (1H; m; C*H*NH); 5,37 (1H; d; *J* = 10,2 Hz; CH_2CH); 5,25 (1H; d; *J* = 16,9 Hz; CH_2CH); 2,41 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,71; 148,68; 137,55; 137,27; 136,53; 136,02; 131,08; 128,31; 127,17; 126,65; 126,53; 121,20; 116,74; 53,09; 19,23.

(*S*)-*N*-[1-(2-Metilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (**KS-4**) je pripravljen odjeljivanjem enantiomera racemičnog spoja na semi-preparativnoj kiralnoj HPLC koloni; **KNF-A** kolona dimenzija 300 mm x 8 mm; *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 40 : 60 : 1; 5 mL/min; 254 nm.

Racemični amid (100 mg) je otopljen u *Ψ*(DCM, heksan) = 4 : 1 (15 mL) i 0,7 mL je injektirano na kolonu. Za odjeljivanje enantiomera 100 mg amida potreban je otprilike 21 slijed.

t.t. 202,3 – 203,2 °C

ev > 99 %, **KNF-A**; *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 40 : 60 : 1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 6,3 min; $t_{R(R)}$ = 7,8 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -23,5 (*c* 1,0; DCM).

***N*-[1-(2,4,6-Trimetilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid**

Bijela krutina (0,66 g; 91 %) iz **E5** (0,34 g).

Pročišćen kolonskom kromatografijom (DCM, R_f = 0,42).

t.t. 186,3 – 187,8 °C

CHN analiza: C 61,39 %; H, 5,48 %; N, 10,91 %; očekivano za $C_{19}H_{19}N_3O_5$: C 61,78 %; H 5,18 %; N 11,38 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3362, 1643, 1541, 1346, 1076, 919, 731, 719.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 9,15 (1H; t; *J* = 1,9 Hz; *DNBAr*); 8,92 (2H; d; *J* = 1,9 Hz; *DNBAr*); 6,88 (2H; s; Ar); 6,82 (1H; bs; N*H*); 6,30 – 6,24 (1H; m; C*H*NH); 6,16 (1H; ddd; *J* = 3,8; 10,4; 17,2; C*H*CH_2); 5,30 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,13 (1H; d; *J* = 17,2 Hz; CH_2CH); 2,45 (6H; s; ArCH_3); 2,26 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ/ppm: 161,88; 148,70; 137,84; 137,69; 136,34; 136,31; 132,43; 130,32; 127,03; 121,09; 116,34; 52,49; 20,93; 20,76.

(*S*)-*N*-[1-(2,4,6-Trimetilfenil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (**KS-5**) je pripravljen odjeljivanjem enantiomera racemičnog spoja na semi-preparativnoj kiralnoj HPLC koloni; **KNF-A** kolona dimenzija 300 mm x 8 mm; *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 65 : 35 : 1,5; 5 mL/min; 254 nm.

Racemični amid (100 mg) je otopljen u *Ψ*(heksan, DCM) = 3 : 2 (12 mL) i 0,3 – 0,4 mL je injektirano na kolonu. Za odjeljivanje enantiomera 100 mg amida potrebna su otprilike 34 slijeda.

t.t. 66,2 – 67,5 °C

ev > 99 %; **KNF-A**; *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 65 : 35 : 1,5; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 7,4 min; $t_{R(R)}$ = 8,3 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -78,4 (*c* 1,2; DCM).

(*S*)-*N*-[1-(4-Metil-1-naftil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (KS-6)

Svijetložuta krutina (0,34 g; 78 %) iz **F6** (0,22 g).

Pročišćen kristalizacijom iz metanola s 1 % DCM.

t.t. 186,0 – 186,7 °C

CHN analiza: C 63,67 %; H 4,65 %; N 10,54 %; očekivano za $C_{21}H_{17}N_3O_5$: C 64,45 %; H 4,38 %; N 10,74 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3340, 1642, 1543, 1524, 1343, 921, 766, 732, 721.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ/ppm: 9,77 (1H; d; *J* = 7,9 Hz; N*H*); 9,14 (2H; d; *J* = 1,9 Hz; *DNBAr*); 8,93 (1H; t; *J* = 1,9 Hz; *DNBAr*); 8,17 – 8,13 (1H; m; *Ar*); 8,09 – 8,04 (1H; m; *Ar*); 7,61 – 7,55 (2H; m; *Ar*); 7,50 (1H; d; *J* = 7,2 Hz; *Ar*); 7,40 (1H; d; *J* = 7,2 Hz; *Ar*); 6,52 (1H; m; C*H*NH); 6,31 (1H; ddd; *J* = 5,4; 10,4; 17,0 Hz; C*H*CH_2); 5,34 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,31 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 2,65 (3H; s; ArCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), δ/ppm: 161,34; 148,15; 137,25; 136,42; 134,33; 134,09; 132,41; 130,87; 127,79; 126,19; 125,97; 125,72; 124,86; 124,77; 123,65; 120,96; 116,24; 51,71; 19,13.

ev > 99 %, **KNF-A**; MeOH; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 4,2 min; $t_{R(R)}$ = 5,5 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -21,8 (*c* 1,2; DCM).

(*S*)-*N*-[1-(Fenantren-9-il)alil]-3,5-dinitrobenzamid (KS-7)

Žuta krutina (0,19 g; 79 %) iz **F7** (0,13 g).

Pročišćen kristalizacijom iz metanola.

t.t. 252,4 – 253,6 °C

CHN analiza: C 66,95 %; H 4,27 %; N 9,32 %; očekivano za $C_{24}H_{17}N_3O_5$: C 67,44 %; H 4,01 %; N 9,83 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3423, 1622, 1532, 1347, 731, 725, 717.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ/ppm: 9,82 (1H; d; *J* = 7,9 Hz; N*H*); 9,16 (2H; d; *J* = 2,1 Hz; *DNBAr*); 8,93 (1H; t; *J* = 2,1 Hz; *DNBAr*); 8,92 – 8,88 (1H; m; *Ar*); 8,83 (1H; d; *J* = 7,8 Hz;

Ar); 8,21 – 8,17 (1H; m; *Ar*); 8,01 (1H; d; *J* = 7,6 Hz; *Ar*); 7,92 (1H; s; *Ar*); 7,74 – 7,63 (4H; m; *Ar*); 6,57 (1H; m; C*H*NH); 6,43 (1H; ddd; *J* = 5,3; 10,3; 16,9 Hz; C*H*CH_2); 5,43 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; CH_2CH); 5,42 (1H; d; *J* = 16,9 Hz; CH_2CH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), δ/ppm: 161,49; 148,16; 136,85; 136,31; 134,35; 130,74; 130,25; 129,83; 129,66; 128,61; 127,83; 127,23; 127,18; 127,10; 126,73; 126,08; 123,89; 123,57; 122,77; 120,99; 116,62; 51,88.

ev > 99 %, **KNF-A**; MeOH; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 5,3 min; $t_{R(R)}$ = 9,2 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -172,2 (*c* 1,3; THF).

_N_-[1-(2-Metil-1-naftil)alil]-3,5-dinitrobenzamid

Žuta krutina (1,04 g; 88 %) iz **E8** (0,59 g).

Pročišćen prekristalizacijom iz metanola s 5 % DCM.

t.t. 233,4 – 234,2 °C

CHN analiza: C 63,80 %; H 4,49 %; N 10,47 %; očekivano za $C_{21}H_{17}N_3O_5$: C 64,45 %; H 4,38 %; N 10,74 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3321, 1638, 1543, 1347, 1074, 819, 730, 718.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ/ppm: 9,91 (1H; d; *J* = 5,4 Hz; N*H*); 9,06 (2H; d; *J* = 2,0 Hz; *DNBAr*); 8,91 (1H; t; *J* = 2,0 Hz; *DNBAr*); 8,37 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,86 (1H; d; *J* = 7,6 Hz; *Ar*); 7,76 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 7,52 – 7,40 (2H; m; *Ar*); 7,36 (1H; d; *J* = 8,4 Hz; *Ar*); 6,50 (1H; ddd; *J* = 4,9; 10,4; 17,0 Hz; C*H*CH_2); 6,41 (1H; m; C*H*NH); 5,25 (1H; d; *J* = 10,4 Hz; CH_2CH); 5,04 (1H; d; *J* = 17,0 Hz; CH_2CH); 2,68 (3H; s; ArCH_3).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), δ/ppm: 161,93; 148,04; 137,03; 136,55; 134,74; 133,09; 132,82; 130,67; 129,48; 128,65; 127,83; 127,80; 125,55; 125,11; 124,47; 120,85; 116,50; 53,07; 20,78.

(*S*)-*N*-[1-(2-Metil-1-naftil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (**KS-8**) je pripravljen odjeljivanjem enantiomera racemičnog spoja na semi-preparativnoj kiralnoj HPLC koloni; **KNF-A** kolona dimenzija 300 mm x 8 mm; *Ψ*(heksan, THF, DCM) = 3 : 1 : 1; 5 mL/min; 254 nm.

Racemični amid (100 mg) je otopljen u smjesi THF-a (11 mL) i pokretne faze (6 mL) i 0,6 mL je injektirano na kolonu. Za odjeljivanje enantiomera 100 mg amida potrebno je otprilike 28 slijedova.

t.t. 191,2 – 192,0 °C

ev 99 %, **KNF-A**; *Ψ*(heksan, THF, DCM) = 3 : 1 : 1; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 5,6 min; $t_{R(R)}$ = 7,3 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -24,6 (*c* 1,2; DCM).

(*S*)-*N*-[1-(2-Naftil)alil]-3,5-dinitrobenzamid (KS-9)

Žuta krutina (0,30 g; 73 %) iz **(*S*)-E8** (0,20 g).

Pročišćen prekristalizacijom iz metanola s 5 % DCM.

t.t. 193,0 – 193,9 °C

CHN analiza: C 63,35 %; H 3,95 %; N 10,97 %; očekivano za $C_{20}H_{15}N_3O_5$: C 63,66 %; H 4,01 %; N 11,14 %.

ν_{max}/cm^{-1} 3298, 1636, 1541, 1346, 1077, 935, 920, 825, 731, 721.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ/ppm: 9,81 (1H; d; *J* = 8,1 Hz; N*H*); 9,15 (2H; d; *J* = 2,1 Hz; *DNBAr*); 8,96 (1H; t; *J* = 2,1 Hz; *DNBAr*); 7,95 – 7,88 (4H; m; *Ar*); 7,57 (1H; d; *J* = 8,5 Hz; *Ar*); 7,53 – 7,49 (2H; m; *Ar*); 6,29 (1H; ddd; *J* = 6,4; 10,3; 17,1 Hz; C*H*CH_2); 5,95 (1H; m; C*H*NH); 5,34 (1H; d; *J* = 17,1 Hz; CH_2CH); 5,32 (1H; d; *J* = 10,3 Hz; CH_2CH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), δ/ppm: 162,06; 148,64; 138,90; 137,96; 137,19; 133,28; 132,73; 128,58; 128,30; 128,21; 127,97; 126,77; 126,46; 126,09; 125,95; 121,42; 117,18; 56,59.

ev 99 %; **KNF-A**; *Ψ*(heksan, EtOH) = 6 : 4; 1 mL/min; 254 nm; $t_{R(S)}$ = 7,9 min; $t_{R(R)}$ = 9,3 min.

$[\alpha]_D^{25}$ -32,1 (*c* 1,1; DCM).

*3.2.9. Priprava **KNF-1** – **KNF-9***

Opća procedura za pripravu KNF-OH-1 – KNF-OH-9

Odgovarajući amid (0,75 mmol) je suspendiran u inertnoj atmosferi u suhom DCM-u (10 mL). Otopina heksakloroplatinske kiseline (20 mg) u izopropanolu (0,5 mL) je dodana u reakcijsku smjesu nakon čega je dokapan dimetilklorsilan (10 mL; 9,0 mmol). Reakcijska smjesa je miješana uz povrat otapala 5 sati, ohlađena na sobnu temperaturu i koncentrirana pod sniženim tlakom. Tamni ostatak je još jednom otopljen u 5 mL DCM-a i uparen do suha te bez dodatnog pročišćavanja korišten u idućem stupnju sinteze.

U otopinu sirovog produkta u suhom DCM-u (8 mL) u inertnoj atmosferi dokapana je 1 : 1 smjesa trietilamina i apsolutnog etanola (10 mL) te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi pola sata. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom do tamnog ostatka koji je profiltriran na kratkom stupcu silikagela, Ψ(DCM, MeOH) = 100 : 1. Uparavanjem filtrata dobiven je žuto-smeđi ostatak koji je otopljen u suhom toluenu (5 mL) i dodan u suspenziju 5 μm HPLC silikagela (1,50 g) u suhom toluenu (50 mL) u Dean-Starkovoj aparaturi. Silikagel je prije upotrebe sušen 24 sata refluksom toluena u Dean-Starkovoj aparaturi. Suspenzija je miješana na temperaturi refluksa 24 h, a zatim profiltrirana preko G-4 lijevka i isprana s toluenom (30 mL) i metanolom (2 x 30 mL). Ovako pripravljene **KNF-OH** su sušene 4 sata na 60 °C.

KNF-OH-1

CHN analiza: C 5,45 %; H 0,55 %; N 0,77 % (0,21 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3448 (SiO_2), 1645, 1543, 1347 (signali selektora), 1217 – 1034 (SiO_2), 805 (SiO_2), 729 (selektor), 465 (SiO_2).

KNF-OH-2

CHN analiza: C 4,20 %; H 0,85 %; N 0,62 % (0,18 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3450 (SiO_2), 1641, 1544, 1346 (signali selektora), 1219 – 1034 (SiO_2), 807 (SiO_2), 731 (selektor), 466 (SiO_2).

KNF-OH-3

CHN analiza: C 4,91 %; H 0,93 %; N 0,75 % (0,20 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3434 (SiO_2), 1640, 1539 (signali selektora), 1219 – 1034 (SiO_2), 808 (SiO_2), 464 (SiO_2).

KNF-OH-4

CHN analiza: C 5,39 %; H 0,82 %; N 0,51 % (0,24 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3439 (SiO_2), 1640, 1542, 1349 (signali selektora), 1227 – 1030 (SiO_2), 808 (SiO_2), 731 (selektor), 465 (SiO_2).

KNF-OH-5

CHN analiza: C 5,43 %; H 0,80 %; N 0,70 % (0,22 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3445 (SiO_2), 1638, 1540 (signali selektora), 1214 – 1029 (SiO_2), 806 (SiO_2), 467 (SiO_2).

KNF-OH-6

CHN analiza: C 6,13 %; H 1,15 %; N 1,10 % (0,22 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3452 (SiO_2), 1643, 1545, 1346 (signali selektora), 1235 – 1023 (SiO_2), 805 (SiO_2), 731 (selektor), 460 (SiO_2).

KNF-OH-7

CHN analiza: C 6,41 %; H 1,07 %; N 1,06 % (0,21 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3439 (SiO_2), 1630, 1542, 1347 (signali selektora), 1223 – 1029 (SiO_2), 806 (SiO_2), 728 (selektor), 464 (SiO_2).

KNF-OH-8

CHN analiza: C 6,73 %; H 1,17 %; N 0,41 % (0,24 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3469 (SiO_2), 1638, 1545, 1348 (signali selektora), 1230 – 1034 (SiO_2), 807 (SiO_2), 731 (selektor), 463 (SiO_2).

KNF-OH-9

CHN analiza: C 5,36 %; H 0,63 %; N 0,96 % (0,20 mmol selektora / 1 g KNF).

ν_{max}/cm^{-1} 3451 (SiO_2), 1636, 1544, 1350 (signali selektora), 1228 – 1036 (SiO_2), 807 (SiO_2), 730 (selektor), 468 (SiO_2).

Opća procedura za pripravu KNF-1 – KNF-9 (*end-capping*)

U suspenziju pripremljene **KNF-OH** u suhom toluenu (20 mL) u inertnoj atmosferi dodan je heksametildisilazan, HMDS (2 mL) i smjesa je miješana na temperaturi povrata 20 sati. Suspenzija je ohlađena, profiltrirana preko G-4 sinter lijevka i isprana toluenom (30 mL) i metanolom (2 x 30 mL). Talog je suspendiran u metanolu i profiltriran preko 20 μm sita te ostavljen da se polako slegne. Sitne čestice su oddekantirane, a talog profiltriran preko G-4 lijevka, ispran s metanolom i osušen 4 sata na 60 °C. Odvagano je 1,5 g silikagela i suspendirano u 25 mL otapala Ψ(heksan, 2-PrOH) = 1 : 8 te je dobivenom suspenzijom napunjena čelična HPLC kolona.

3.3. Analiti upotrebljeni za testiranje pripravljenih KNF

Racemični spojevi *trans*-stilben-oksid (**TR01**), benzoin (**TR02**), metilni eter benzoina (**TR03**), flavanon (**TR04**), Troegerova baza (**TR05**), 1,1'-binaft-2-ol (**TR06**) i 1-(9-antril)-2,2,2-trifluoretanol (**TR07**) su kupljeni od tvrtke Sigma-Aldrich.

U Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković sintetizirani su sljedeći racemični spojevi: etil-5-fenil-7-klor-2-okso-2,3-dihidro-1*H*-1,4-benzo[*e*][1,4]diazepin-3-karboksilat (**TR08**), etil-5-fenil-7-klor-1,3-dimetil-2-okso-2,3-dihidro-1*H*-1,4-benzo[*e*][1,4]diazepin-3-karboksilat (**TR09**), *N*-(1-feniletil)-2,2-dimetilpropanamid (**TR10**), *N*-(1-feniletil)benzamid (**TR11**), *N*-(1-feniletil)-1-naftamid (**TR12**), *N*-fenil-2-(4-izopropilfenil)propanamid (**TR13**), *N*-(1-feniletil)-3,5-dinitrobenzamid (**TR14**), izopropilni esteri *N*-3,5-dinitrobenzoilnih derivata aminokiselina (**TR15** – **TR21**).

Racemična 2-[4-(2-metilpropil)fenil)propanska kiselina (ibuprofen, **TR22**) kupljena je od tvrtke Sigma-Aldrich. U Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković su sintetizirani ostali nesteroidni protuupalni lijekovi: 2-(3-benzoilfenil)propanska kiselina (ketoprofen, **TR23**), 2-(6-metoksi-2-naftil)propanska kiselina (naproksen, **TR24**), 2-(2-fluorobifenil-4-il)propanska kiselina (flurbiprofen, **TR25**), 2-[4-(tiofen-2-karbonil)fenil]propanska kiselina (suprofen, **TR26**), 2-(3-fenoksifenil)propanska kiselina (fenoprofen, **TR27**).

Racemični 3-hidroksi-7-klor-5-(2-klorfenil)-1,3-dihidro-benzo[*e*][1,4]diazepin-2-on (lorazepam, **TR28**) i 5-fenil-3-hidroksi-7-klor-1,3-dihidro-benzo[*e*][1,4]diazepin-2-on (oksazepam, **TR29**) su dobiveni od farmaceutske tvrtke Belupo d.o.o., dok je 5-fenil-3-hidroksi-7-klor-1-metil-1,3-dihidro-benzo[*e*][1,4]diazepin-2-on (temazepam, **TR30**) sintetiziran u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu.

Uzorci za HPLC analizu su pripravljeni otapanjem ~ 1 mg racemičnog spoja u 1 mL pokretne faze. Prilikom analize ubrizgano je 20 μL otopine uzorka. Pokretna faza se razlikuje ovisno o tipu spoja i uvijek je naznačena u rezultatima. Protok pokretne faze je u svim slučajevima 1 mL/min, a valna duljina pri kojoj su spojevi detektirani je 254 nm. Sve analize su rađene na sobnoj temperaturi.

Prilikom analize određeni su sljedeći parametri:

k_2 – faktor zadržavanja drugoizlazećeg enantiomera; $k_2 = (t_{R2}-t_M)/t_M$

α – faktor odjeljivanja; $\alpha = k_2/k_1$

R_s – razlučivanje; $R_s = 1{,}18*(t_{R2}-t_{R1})/(w_{h1}+w_{h2})$

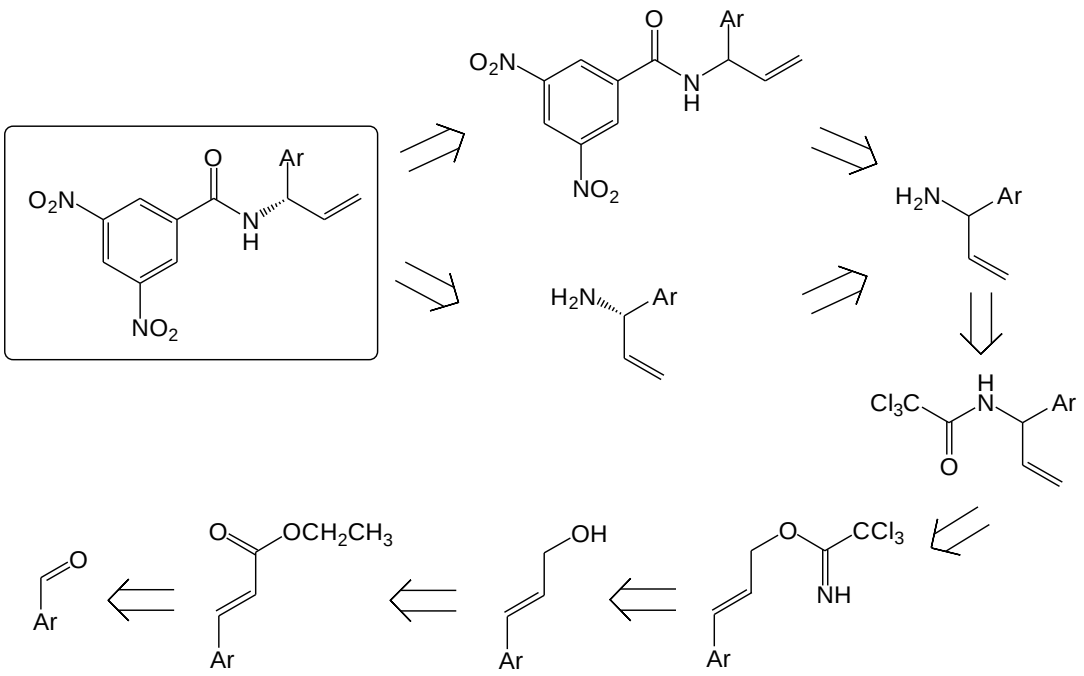
Razlučivanje je određivano prema metodi koja koristi širinu pika na polovini visine. Ova metoda je često korištena jer je jednostavnije odrediti širinu na polovini visine nego širinu na baznoj liniji te je točnija u slučajevima kada se pikovi ne odvajaju do bazne linije, odnosno dolazi do preklapanja. Zbog toga se ova metoda koristi u farmaceutskoj industriji te ju preporučuju Njemačka, Britanska te Europska farmakopeja.[74]

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava kiralnih nepokretnih faza KNF-1 – KNF-9

4.1.1. Retrosinteza molekule selektora

Molekula selektora u svojoj strukturi, osim navedenih funkcionalnih skupina, treba sadržavati i alilnu skupinu preko koje se kasnije može vezati na silikagel. Proučavajući ciljne molekule retrosintetski, odmah se uočavaju ključni međuprodukti sinteze – enantiomerno čisti alil-aril-amini, slika 25.



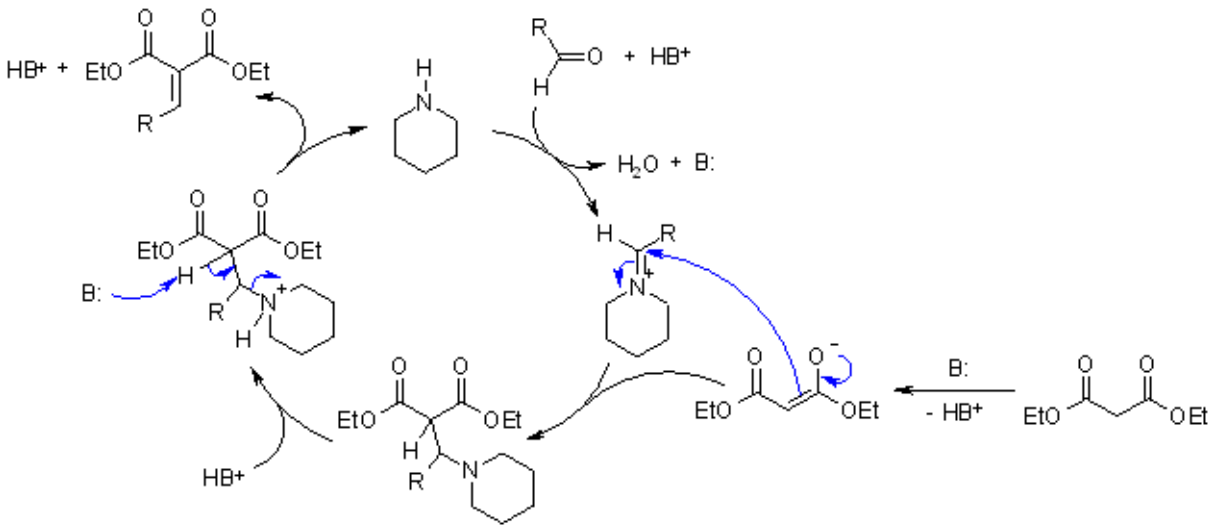
Slika 25. Retrosinteza molekule selektora

Priprava KNF odvija se u nekoliko stupnjeva. Prvo je potrebno prirediti (*E*)-nezasićeni alkohol, analog cinamola, koji nije komercijano dostupan. Sljedeća faza nakon priprave alkohola je priprava racemičnog amina s terminalnom dvostrukom vezom (alil-aril-amina). Zatim slijedi odjeljivanje njegovih enantiomera, a potom se enantiomerno čisti amin prevodi u 3,5-dinitrobenzoilni derivat koji se u posljednjem stupnju veže na silikagel. Ukoliko nije

moguće pronaći uvjete za rezoluciju alil-aril-amina, potrebno je pronaći način odjeljivanja enantiomera završnog 3,5-dinitrobenzoilnog derivata. Na kraju se enantiomerno čisti selektor veže na silikagel.

4.1.2. Priprava (E)-nezasićenih alkohola

Kako je u literaturi opisano mnogo načina priprave (*E*)-α,β-nezasićenih estera iz odgovarajućih aldehida, trebalo je odabrati najpovoljniju reakciju. Zbog jeftinih polaznih kemikalija, bezazlenih nusprodukata (CO_2 i voda) i vrlo dobre selektivnosti koja se pokazala kod aromatskih spojeva, odabrana je Knoevenagelova reakcija, slika 26, točnije Doebnerova modifikacija ove reakcije koja uključuje i dekarboksilaciju.[75]



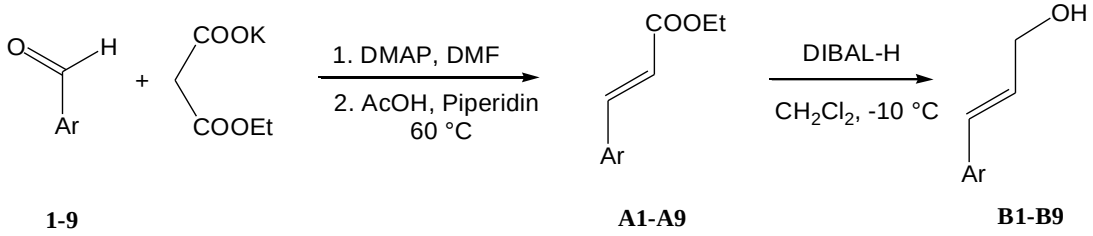
Slika 26. Mehanizam Knoevenagelove reakcije

Iako ima brojne prednosti, ova reakcija se dosad rijetko koristila za razliku od, recimo, Wittigove ili Horner–Wadsworth–Emmonsove. Razlog tome je što reakcijski uvjeti uključuju veliki suvišak monoestera malonske kiseline, reakcija se izvodi uz katalizator piperidin u piridinu na povišenoj temperaturi[76] te (*E*)/(*Z*) selektivnost ovisi o supstratu. Međutim, najveći nedostatak je da kod aldehida koji mogu enolizirati ne nastaju samo α,β-nezasićeni esteri već i β,γ-nezasićeni esteri. Svi ovi nedostatci su riješeni modificiranjem reakcijskih uvjeta uz korištenje 4-dimetilaminopiridina (DMAP) u DMF-u. Tako je dobivena učinkovita,

katalitička metoda koja uz blage reakcijske uvjete ide uz visoke α,β-regio- i (*E*)-stereoselektivnosti, te tolerira razne funkcionalne skupine i može se koristiti za alifatske i aromatske aldehide.[77]

U slučaju aromatskih aldehida pokazalo se kako piperidin kao kokatalizator smanjuje vrijeme reakcije. Monoetilmalonat je generiran *in situ* iz jeftinog kalijevog monoetilmalonata djelovanjem octene kiseline. Dobiveni nezasićeni ester je zatim selektivno reduciran diizobutilamonijevim hidridom (DIBAL-H) do nezasićenog alkohola, shema 10.

Shema 10



1-9 **A1-A9** **B1-B9**

Tablica 5. Sinteza nezasićenih alkohola

	Ar	A		B
		t/d	*η*/%	*η*/%
1	1-Naftil	5	95	99
2	4-Metilfenil	5	99	99
3	3,5-Dimetilfenil	5	98	98
4	2-Metilfenil	5	97	96
5	2,4,6-Trimetilfenil	21[a]	53	99
6	4-Metil-1-naftil	9	95	99
7	9-Fenantril	10	95	92
8	2-Metil-1-naftil	21	68	99
9	2-Naftil	4	99	98

[a] Nakon navedenog vremena, u reakcijskoj smjesi još ima reaktanta

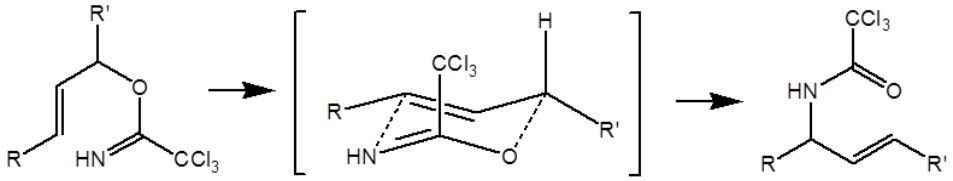
Knoevenagelova reakcija uz navedene uvjete se, iako je vremenski dugotrajna, pokazala odličnim odabirom, tablica 5. Naime, niti u jednom slučaju nije dokazan nastanak (*Z*)-nezasićenog alkohola. Obrada reakcijske smjese je vrlo jednostavna, a obzirom da u većini slučajeva nisu primijećeni nusprodukti, nije bilo potrebno niti dodatno čišćenje

produkta. Jedina iznimka su 2,4,6- trimetilni **A5** i 2-metil-1-naftilni derivat **A8**. U ova dva slučaja reaktanti u strukturi imaju metilne skupine u blizini aldehidne skupine koje sterički ometaju napad nukleofila. Zbog toga su reakcije trajale vrlo dugo, a aldehid **5** koji ima 2 metilne skupine u blizini aldehidne skupine niti nakon 21 dan nije potpuno izreagirao. Sirovi produkti nisu bili zadovoljavajuće čistoće, već ih je bilo potrebno očistiti kromatografski zbog čega iskorištenja nisu izvrsna.

Reakcija redukcije pomoću DIBAL-H pokazala se izrazito kemoselektivnom i niti u jednom slučaju nije detektiran zasićeni alkohol. Obrada reakcijske smjese je izrazito jednostavna i zahtijeva ekstrakciju zasićenom otopinom Rochelleove soli, a iskorištenja su vrlo visoka, tablica 5.

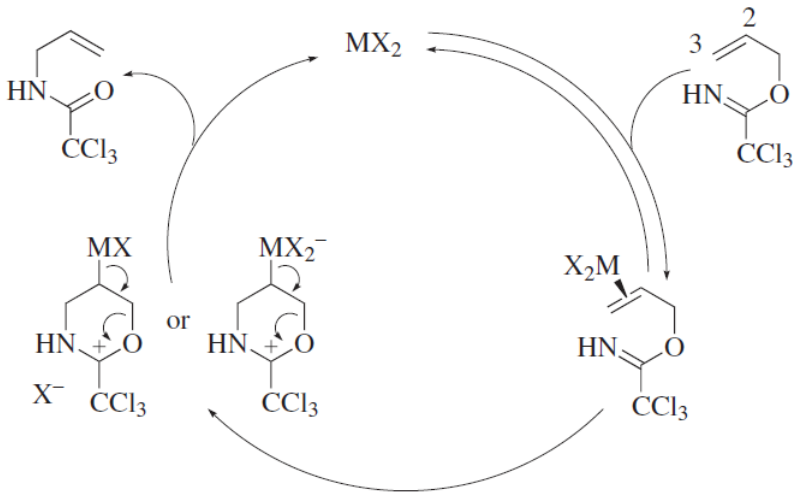
4.1.3. Priprava (±)-1-arilprop-2-en-1-amina

Iz dobivenog nezasićenog alkohola racemični amin je pripravljen Overmanovom reakcijom.[78] Pregradnju trikloracetimidata u alilne trikloracetamide prvi je 1970-ih godina zabilježio Larry E. Overman.[79] Reakcija je usklađeno [3,3]-sigmatropno pregrađivanje koje zahtijeva reaktant u (*E*)-konfiguraciji. Odvija se termički ili upotrebom katalizatora na bazi paladija (II) ili žive (II). Mehanizam pregradnje je dobro istražen i uključuje šesteročlano prijelazno stanje, slika 27.



Slika 27. Overmanova pregradnja

Kiralni metalni kompleksi koji bi katalizirali pregradnju enantiomerno obogaćenih alilnih trikloracetamida počeli su se razvijati 20 godina nakon otkrića ove pregradnje. Razlog ovako sporom razvoju kiralnih katalizatora je taj što je za kataliziranu pregradnju potrebna koordinacija paladija na π vezu, slika 28. Paralelna eliminacijska reakcija i vrlo spore reakcije najvjerojatnije su posljedica kompetitivne kompleksacije malog bazičnog trikloracetimidatnog dušika na paladij.[78]

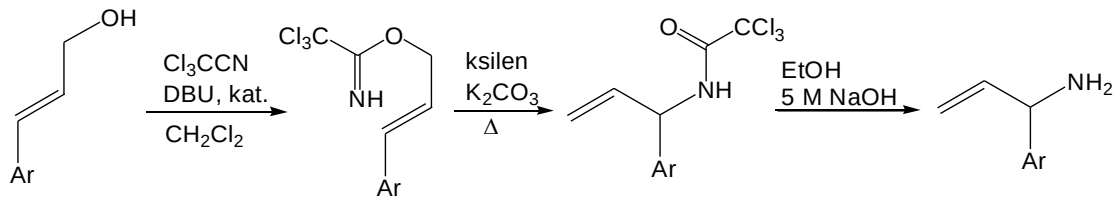


Slika 28. Overmanova pregradnja katalizirana s Pd(II) ili Hg(II)

Zbog navedenih razloga, prvi asimetrični Pd(II) katalizatori su bili učinkoviti samo u pregradnji *N*-arilimidata. Neutralni paladijevi kiralni katalizatori razvijeni su uz pretpostavku kako bi koordinacija dušika na Pd(0) bila puno manje povoljna nego koordinacija na kationski Pd(II) kompleks.[80] Od priređenih katalizatora za pregradnju alilnih trikloracetimidata najbolji se pokazao tzv. COP-Cl katalizator[81] koji je danas komercijalno dostupan u obje enantiomerne forme. Međutim, iako u slučaju alifatskih alilnih trikloracetimidata pokazuje odlične enantiomerne čistoće, u slučaju (*E*)-cinamiltrikloroacetimidata odgovarajući amid je dobiven u niskom iskorištenju, dok je kao glavni produkt dobiven amid nastao [1,3]-pregradnjom.[82] Stoga korištenje kiralnih katalizatora nije bila dobra opcija, već je povoljnije enantiomere nastalog amina odijeliti u kasnijem stupnju.

Prvi stupanj Overmanove reakcije je bazom katalizirana nukleofilna adicija alkohola na cijano skupinu trikloracetonitrila u inertnim uvjetima. Drugi stupanj je termička pregradnja dobivenog estera 2,2,2-trikloracetimidske kiseline u amid, shema 11.

Shema 11



B1-B9 **C1-C9** **D1-D9** **E1-E9**

Tablica 6. Sinteza (±)-aril alilamina iz nezasićenih alkohola

	Ar	η(**C**)/%	η(**D**)/%	η(**E**)/%
1	1-Naftil	95	96	88
2	4-Metilfenil	89	95	79
3	3,5-Dimetilfenil	93	95	76
4	2-Metilfenil	94	96	77
5	2,4,6-Trimetilfenil	95	95	87
6	4-Metil-1-naftil	96	95	91
7	9-Fenantril	97	89	91
8	2-Metil-1-naftil	97	83	86
9	2-Naftil	92	94	87

Reakcija nastajanja imidata **C1** – **C9** ide uz bazu 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) u izvrsnom iskorištenju, tablica 6. Pokazalo se kako paladijem katalizirana reakcija ne ide odgovarajućim tijekom i ne nastaje samo produkt [3,3]-pregradnje, već i amid koji je produkt [1,3]-pregradnje.[83] Zbog toga je za pregradnju 2,2,2-trikloracetimidata odabrana termička reakcija. Reakcija pregradnje 2,2,2-trikloracetimidata **C1** – **C9** u amide **D1** – **D9** se odvija u vrijućem ksilenu uz dodatak kalijevog karbonata (2 mg K_2CO_3 po 1 mL ksilena). Kao nusprodukt u reakciji pregradnje može nastati kiselina. Budući da tragovi kiseline mogu katalizirati raspad imidata i tako smanjiti iskorištenje, kalijev karbonat je dodan kako bi neutralizirao kiselinu. Pregradnja uz ove uvjete ide uz odlična iskorištenja.

Hidrolizom amida **D1** – **D9** u smjesi 5 mol L^{-1} vodene otopine natrijevog hidroksida i etanola dobiveni su racemični amini **E1** – **E9** u vrlo dobrom iskorištenju, tablica 6.

4.1.4. Enzimska rezolucija (±)-1-arilprop-2-en-1-amina

Enzim lipaza B iz *Candide antarctice* (CAL-B) je vrlo selektivan biokatalizator u enzimskoj rezoluciji primarnih amina.[60] Stoga je CAL-B kao potencijalno dobar enzim odabran za kinetičku enzimsku rezoluciju alil-aril-amina.

Velik je izbor organskih otapala i acilnih donora koji se koriste za enzimsku rezoluciju primarnih amina uz pomoć CAL-B.[59] Prvi izbor je svakako etil-acetat. Međutim, reakcije u etil-acetatu nisu išle u odgovarajućem smjeru, već su se acilirala oba enantiomera.

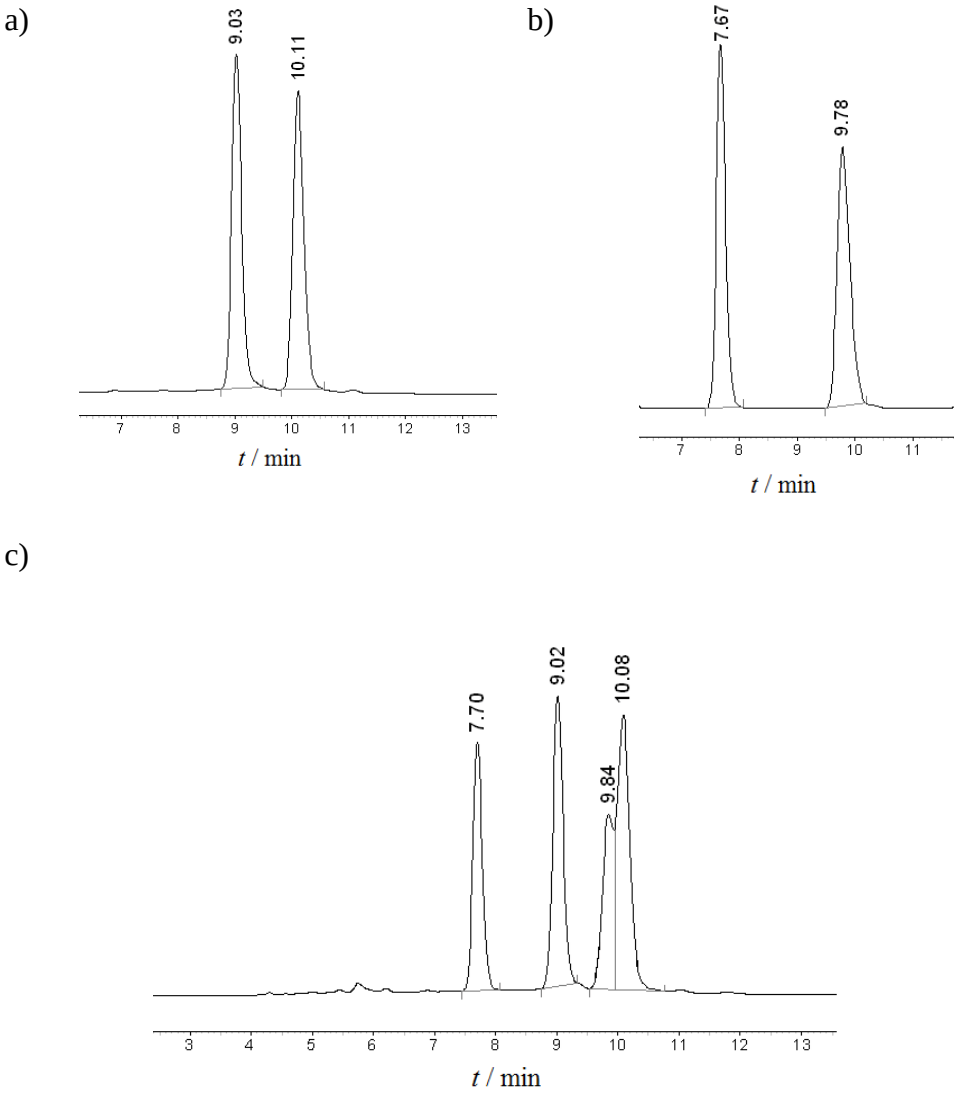
Zaključeno je kako je u slučaju ovih alil-aril-amina potrebno koristiti acilne donore koji su sterički zahtjevniji. Također, budući da su se alkil-metoksiacetati pokazali kao dobri acilni donori, etil-metoksiacetat (EMA) je korišten kao jedan od izbora. Kao otapalo za enzimsku rezoluciju pomoću CAL-B se najčešće koriste dioksan, metil-*tert*-butil-eter (MTBE), diizopropil-eter (DIPE), itd. Zbog relativno niskog vrelišta, kao prvi izbor odabran je MTBE. Iako se u literaturi navodi kako je heksan najlošije otapalo za enzimsku rezoluciju pomoću CAL-B,[59] u nekim slučajevima se heksan u kombinaciji s izopropil-acetatom pokazao kao najbolji izbor. Prilikom traženja uvjeta enzimske rezolucije, kombinirani su etil-acetat, izopropil-acetat i etil-metoksiacetat kao acilni donori s otapalima MTBE, DIPE i heksanom, tablica 7. U slučaju kada je etil-acetat bio acilni donor nije korišteno drugo organsko otapalo.

Tablica 7. Optimizacija uvjeta enzimske rezolucije za 1-(fenantren-9-il)prop-2-en-1-amin, **E7**, *m*(**E7**) = 80 mg, *m*(CAL-B) = 160 mg, 30 °C, tijek praćen HPLC-om (Chiralcel OD-H kolona, *Ψ*(heksan, EtOH, dietilamin) = 50 : 50 : 1, 1 mL/min, 254 nm

	EMA (200 μL), MTBE (4 mL)		*i*-PrOAc (0,8 mL), MTBE (3 mL)		*i*-PrOAc (0,8 mL), heksan (3 mL)		EtOAc (4 mL)	
t/h	amin *ev*/%	amid[a]	amin *ev*/%	amid[a]	amin *ev*/%	amid[a]	amin *ev*/%	amid[a]
18	94	26	57	13	63	14	19	18
42	98	41	83	22	55	32	28	26
114	92	82	97	43	61	40	36	65

[a] U navedenoj pokretnoj fazi enantiomeri produkta se ne razdvajaju te je naveden postotak površine produkta na kromatogramu u odnosu na ukupnu površinu reaktanata i produkta

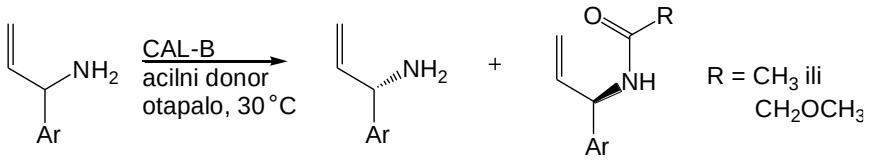
Kako bi se mogao pratiti tijek reakcije, prvo su priređeni racemični amidi koji nastaju reakcijom acilnog donora s aminom. Za praćenje tijeka rezolucije pomoću HPLC-a, bilo je potrebno pronaći odgovarajuću kiralnu kolonu u kombinaciji s prikladnom pokretnom fazom. Trebalo je pronaći uvjete u kojima se dobro odjeljuju enantiomeri reaktanta i po mogućnosti produkta. Također, navedeni signali se ne smiju preklapati na kromatogramu kada su reaktant i produkt u smjesi, slika 29. Kiralna polisaharidna kolona Chiralcel OD-H pokazala se pogodna za rezoluciju svih amina uz odgovarajuće pokretne faze. Dobiveni kromatogrami su prikazani slikom 29 na primjeru naftilnih derivata **E1** i **F1**.



Slika 29. Kromatogrami: a) 1-(1-naftil)prop-2-en-1-amina, **E1**; b) *N*-[1-(1-naftil)alil]-2-metoksiacetamida, **F1**; c) smjesa navedenih spojeva; polisaharidna kiralna kolona Chiralcel OD-H; *Ψ*(heksan, 2-PrOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,1**;** 1 mL/min; 300 nm

U skladu s očekivanjima, CAL-B se pokazao vrlo učinkovit u rezoluciji nerazgranatih alil-aril-amina, shema 12.[84] Apsolutna konfiguracija dobivenih amina nije određena, već je pretpostavljeno da se prema Kazlauskasovom pravilu acilira (*R*)-enantiomer i na taj način u otopini ostaje amin (*S*)-apsolutne konfiguracije.

Shema 12



E1-E9 **(*S*)-E1 - (*S*)-E9** **(*R*)-F1 - (*R*)-F9**

Tablica 8. Uvjeti enzimske rezolucije racemičnih alil-aril-amina

	Ar	Otapalo	Acilni donor	*t*/d	Amin *ev*/%	*η*/%
1	1-Naftil	MTBE	etil-metoksiacetat	5	> 99	45
2	4-Metilfenil	heksan	izopropil-acetat	3	99	39
3	3,5-Dimetilfenil	heksan	izopropil-acetat	7	81	43
4	2-Metilfenil	MTBE	etil-metoksiacetat	8	63	n.i.
5	2,4,6-Trimetilfenil	heksan	izopropil-acetat	4	0	n.i.[a]
		MTBE	etil-metoksiacetat	4	9	n.i.
			EtOAc	2	-	-[b]
6	4-Metil-1-naftil	MTBE	etil-metoksiacetat	3	> 99	48
7	9- Fenantril	MTBE	etil-metoksiacetat	1	99	42
8	2-Metil-1-naftil	heksan	izopropil-acetat	3	0	n.i.[a]
		MTBE	etil-metoksiacetat	6	14	n.i.
			EtOAc	2	-	-[b]
9	2-Naftil	heksan	izopropil-acetat	11	98	49

n.i. = nije izolirano; [a] niti jedan enantiomer amina ne reagira do amida; [b] oba enantiomera amina izreagiraju do amida

U slučaju alil-aril-amina koji u blizini kiralnog središta nemaju supstituente, enzimska rezolucija pomoću CAL-B daje odlične rezultate, tablica 8. Tako su uz izvrstan enantiomerni višak sintetizirani alil-aril-amini **(*S*)-E1**, **(*S*)-E2**, **(*S*)-E6**, **(*S*)-E7** i **(*S*)-E9**. U slučaju amina **E3** koji sadrži dvije metilne skupine u *meta* položaju, dobivena je nešto niža enantiomerna čistoća. Produženje vremena reakcije smanjuje iskorištenje, ali ne poboljšava enantiomerni višak amina. Dobiveni enantiomenrni višak je još niži kada je metilna skupina u *ortho* položaju (**E4**). Razlog je što supstituenti u blizini kiralnog središta onemogućavaju dobro smještanje amina u aktivno mjesto enzima te su reakcije sporije i enzim slabije razlikuje enantiomere amina. To je posebno vidljivo u slučaju amina **E5** i **E8** koji sadrže dvije metilne skupine u *ortho* položaju, odnosno jednu metilnu skupinu u kombinaciji s većom naftilnom

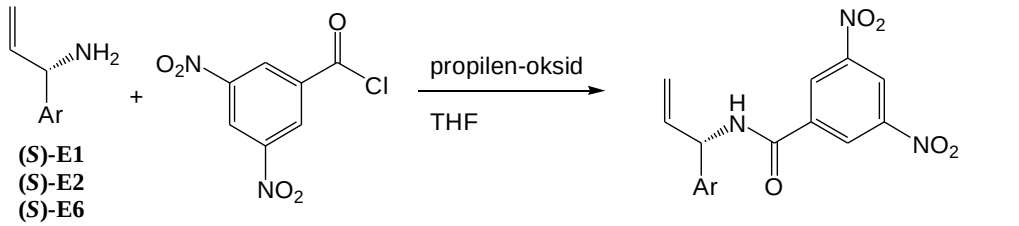
skupinom. Tada ili uopće ne dolazi do reakcije ili je reakcija iznimno spora. Reakcija ovih supstrata s etil-acetatom ide, ali nestereoselektivno i oba enantiomera se aciliraju u potpunosti, kao što je slučaj i za ostale amine,. Povišenje temperature reakcije na 35 °C neznatno utječe na ubrzanje reakcije. Međutim, ne dolazi do poboljšanja enantiomernog viška. To je i razumljivo jer je uzrok nestereoselektivnosti to što enzim zbog steričkih utjecaja jednostavno ne razlikuje enantiomere.

*4.1.5. Priprava (S)-N-(1-arilpropil)-3,5,-dinitrobenzamidnih selektora **KS-1** – **KS-9***

Selektori **KS-1** – **KS-9** su priređeni aciliranjem alil-aril-amina s 3,5-dinitrobenzoil-kloridom u prisustvu baze. U slučaju alil-aril-amina koji su dobiveni u enantiomerno čistom obliku enzimskom rezolucijom, odgovarajući selektori su dobiveni direktno aciliranjem. Kada enzimska rezolucija nije dala odgovarajuće rezultate, bilo je potrebno razdvojiti enantiomere racemičnih amida kiralnom kromatografijom.

Enantiomerno čisti amidi **KS-1**, **KS-2 KS-6**, **KS-7** i **KS-9** sintetizirani su kao što je prikazano na shemi 13. Uz to su priređeni i racemični amidi iz racemičnih amina kako bi se na kiralnoj koloni pronašli uvjeti za odjeljivanje enantiomera. Nakon toga je moguće sintetiziranim selektorima odrediti enantiomerni višak.

Shema 13



(*S*)-E1
(*S*)-E2
(*S*)-E6
(*S*)-E7
(*S*)-E9

KS-1 (90 %), **KS-2** (92 %), **KS-6** (78 %),
KS-7 (79 %), **KS-9** (73 %)

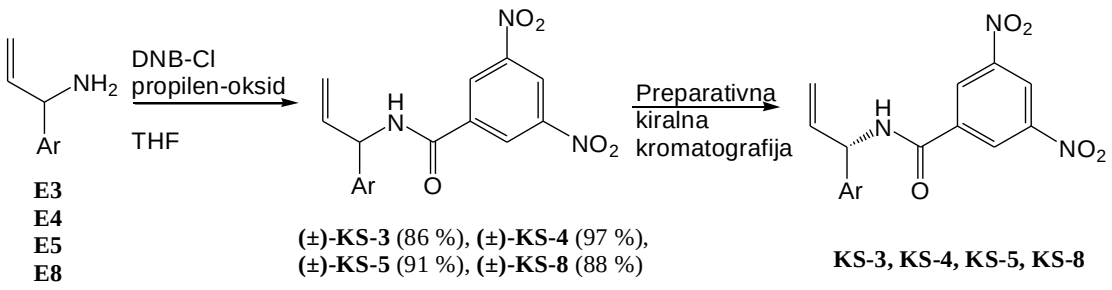
S obzirom da čišćenje sirovog selektora u nekim slučajevima uključuje prekristalizaciju, dobiveni selektori **KS-2, KS-7** i **KS-9** imaju veći enantiomerni višak nego polazni amini **(*S*)-E2**, **(*S*)-E7** i **(*S*)-E9**. To znači da je došlo do dodatnog enantiomernog obogaćivanja prilikom kristalizacije, tablica 9.

Tablica 9. Određivanje enantiomernog viška selektorima dobivenim enzimskom rezolucijom

	Pokretna faza	$t_{R(S)}$/min	$t_{R(R)}$/min	*ev*/%
KS-1	MeOH	3,7	4,5	> 99
KS-2	Ψ(heksan, 2-PrOH) = 1 : 1	6,7	8,7	> 99
KS-6	MeOH	4,2	5,5	> 99
KS-7	MeOH	5,3	9,2	> 99
KS-9	Ψ(heksan, EtOH) = 6 : 4	7,9	9,3	99

Iz alil-aril-amina koje nije bilo moguće enzimskom rezolucijom prirediti u enantiomerno čistom obliku, sintetizirani su racemični amidi. Dobiveni amidi su zatim razdvojeni na enantiomere kiralnom preparativnom kromatografijom, shema 14.

Shema 14

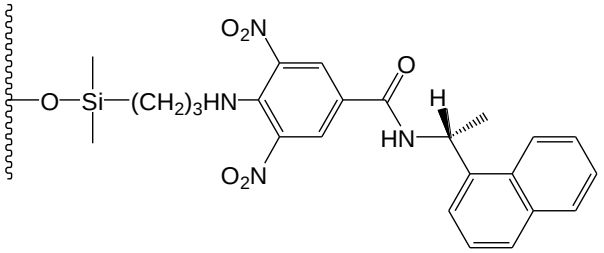


E3
E4
E5
E8

(±)-KS-3 (86 %), **(±)-KS-4** (97 %),
(±)-KS-5 (91 %), **(±)-KS-8** (88 %)

KS-3, KS-4, KS-5, KS-8

Za kiralnu preparativnu kao i za analitičku kromatografiju korištena je četkolika kiralna kolona **KNF-A** opisana u Ranogajec et al. (**CSP 7**)[73] čija je struktura prikazana na slici 30. Ova kolona se pokazala pogodnom za enantioseparaciju raznih spojeva koji sadrže 3,5-dinitrobenzoilnu skupinu.



Slika 30. Struktura selektora kiralne kolone **KNF-A**

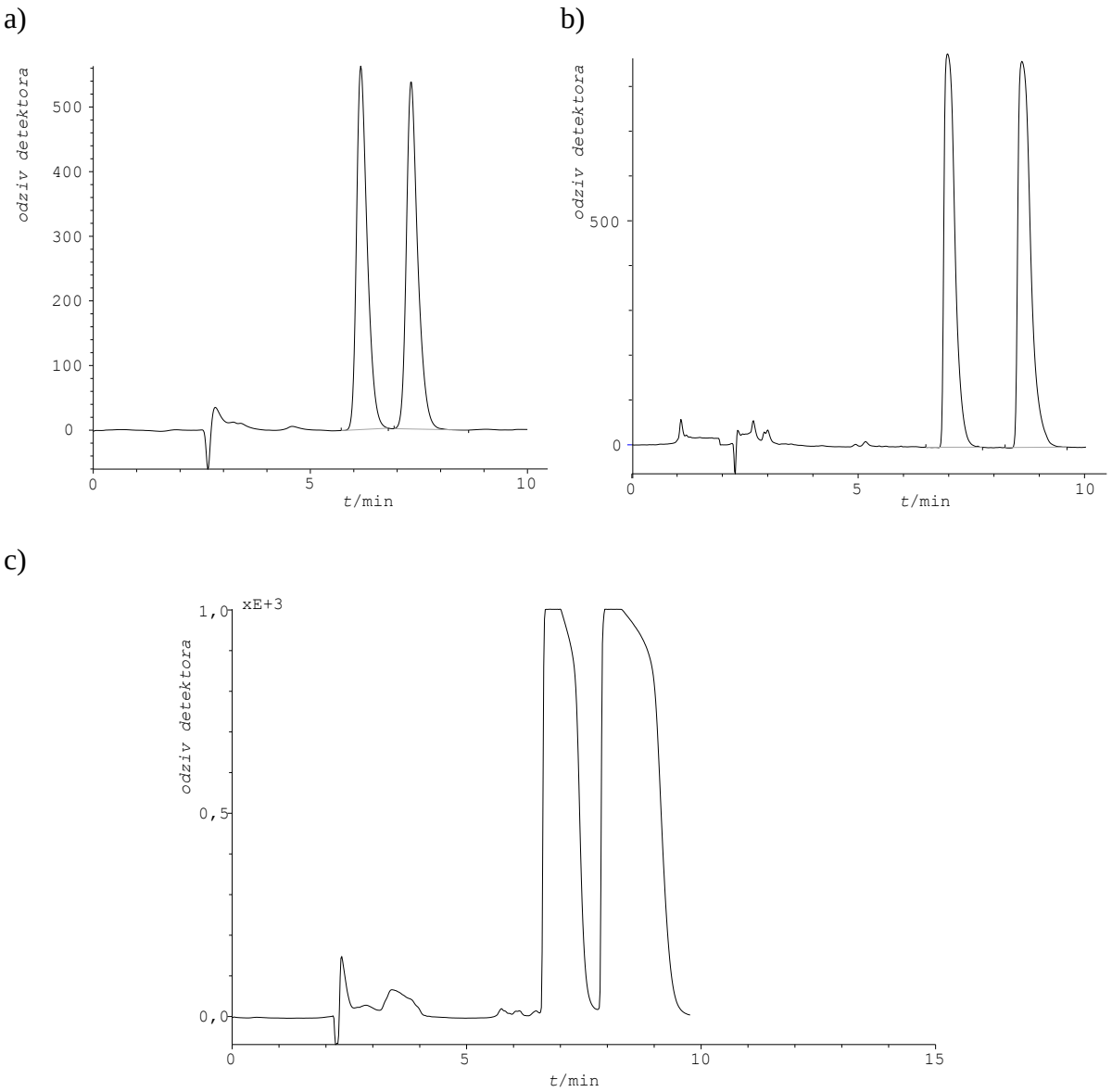
Iako je navedena kolona bila dostupna tek u semi-preparativnom obliku, velika prednost je širok izbor otapala koja se mogu koristiti u pokretnoj fazi. Naime, polisaharidne kolone, koje se najčešće koriste jer su komercijalno dostupne u analitičkoj i preparativnoj formi, imaju ograničenje što se tiče izbora otapala za pokretnu fazu.[85] U radu s njima nije moguće koristiti jako polarna otapala u velikom volumnom udjelu u pokretnoj fazi. Pripravljeni racemični amidi su relativno slabo topljivi u nepolarnim otapalima, već ih je potrebno otopiti u smjesama koje sadrže visok udio DCM-a ili THF-a. Zbog toga polisaharidne kolone nisu bile dobar izbor za odjeljivanje enantiomera.

Tablica 10. Uvjeti za odjeljivanje enantiomera racemičnih selektora na kiralnoj koloni **KNF-A**, 1 mL/min, 254 nm

	Pokretna faza	$t_{R(S)}$/min	$t_{R(R)}$/min	N[a]	*ev*/%[b]
KS-3	*Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 50 : 100 : 1	8,6	11,3	23	> 99
KS-4	*Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 40 : 60 : 1	6,3	7,8	21	> 99
KS-5	*Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 65 : 35 : 1,5	7,4	8,3	34	> 99
KS-8	*Ψ*(heksan, THF, DCM) = 3 : 1 : 1;	5,6	7,3	28	99

[a] N – broj slijedova potrebnih za odjeljivanje enantiomera 100 mg amida
[b] *ev* (*S*)-enantiomera

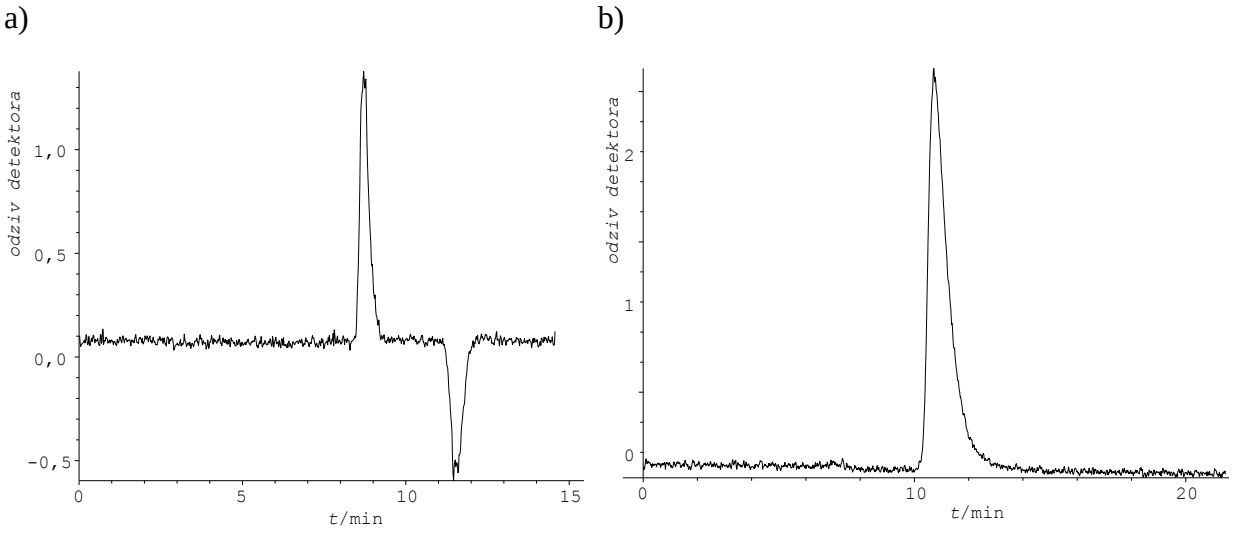
Kiralna kolona **KNF-A** se pokazala dobrim izborom za odjeljivanje enantiomera racemičnih selektora te su za sve amide pronađeni potrebni uvjeti na analitičkoj koloni **KNF-A**, tablica 10. Preparativna kromatografija izvedena je pomoću navedene semi-preparativne kolone **KNF-A** uz protok 5 mL/min i UV detekciju na 254 nm. Slika 31 prikazuje analitičke i preparativne kromatograme odjeljivanja enantiomera *N*-(1-(2-metilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamida (**KS-4**). U svim slučajevima preparativne kromatografije dobiveni su enantiomeri izvrsne enantiomerne čistoće.



Slika 31. Odjeljivanje enantiomera *N*-(1-(2-metilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamida, (±)-**KS-4** na kiralnoj koloni **KNF-A**, *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 40 : 60 : 1; 254 nm; a) analitička kolona (250 mm x 4,6 mm), 1 mL/min; b) semi-preparativna kolona (300 mm x 8 mm), 5 mL/min, injektirani volumen 20 μL; c) semi-preparativna kolona, 5 mL/min, injektirani volumen 700 μL

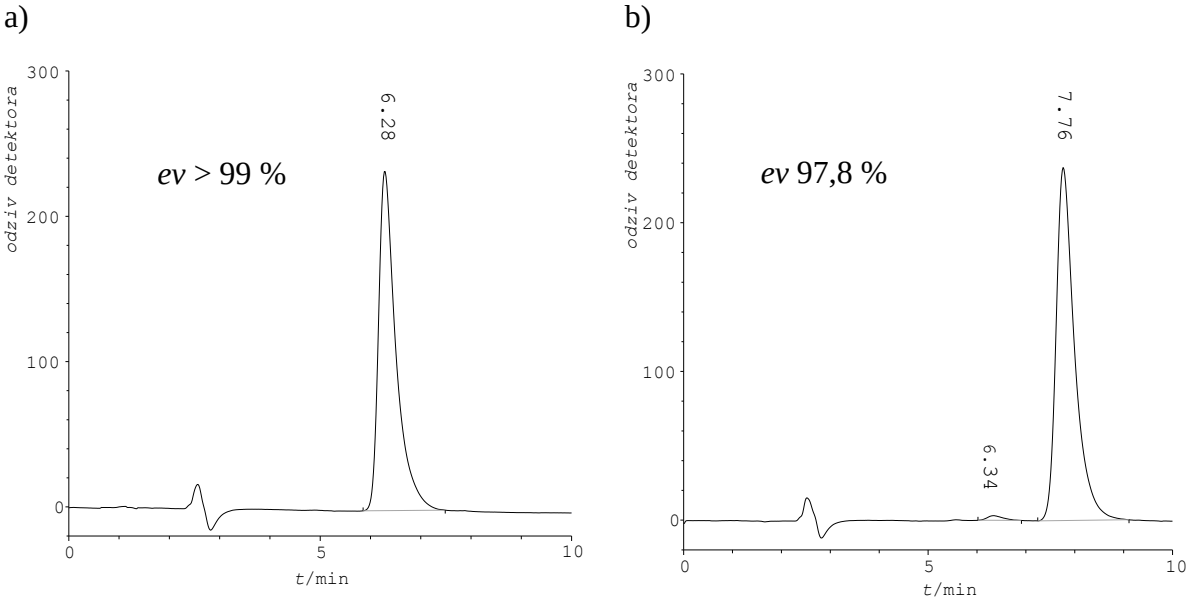
Osim što su na koloni **KNF-A** odvojeni racemati te selektorima dobivenim enzimskom rezolucijom određen enantiomerni višak, ova kolona je omogućila i jednostavno određivanje koji od enantiomera je (*S*), a koji (*R*) apsolutne konfiguracije. Pretpostavka je bila kako enzim CAL-B acilira (*R*)-enantiomer, dok (*S*)-alil-aril-amin ostaje u otopini, odnosno enzim se ponaša prema Kazlauskasovom pravilu. Tijek enzimske rezolucije je bio praćen na

polisaharidnoj koloni Chiralcel OD-H. Poznato je kako kolone ovog tipa imaju vrlo kompliciran mehanizam prepoznavanja zbog čega u slučaju serije analognih alil-aril-amina redoslijed ispiranja enantiomera s kolone nije isti za sve amine. Suprotno tome, u slučaju četkolikih KNF mehanizam kiralnog prepoznavanja je jednostavniji i puno više istražen. U seriji analognih spojeva koji se razlikuju samo u aromatskoj skupini, redoslijed izlaženja enantiomera s kolone će biti isti.[39,86] Tako se u slučaju selektora dobivenih enzimskom rezolucijom pokazalo kako se (*S*)-enantiomer prvi ispire s kolone. Kao dodatni dokaz prilikom HPLC analize korišten je i CD (cirkularni dikroizam, engl. *Circular Dichroism*) detektor. Pokazalo se kako u slučaju derivata koji sadrže različito supstituirani benzenski prsten, enantiomer koji prvi izlazi pokazuje pozitivan Cottonov efekt na 254 nm, slika 32. Isto je zabilježeno i za 1-naftilne derivate pri 240 nm. Ovi rezultati su još jedna potvrda kako je redoslijed izlaženja enantiomera s kolone **KNF-A** uvijek isti. Jedino u slučajevima 9-fenantrilnog i 2-naftilnog derivata, zabilježen je negativan Cottonov efekt pri 254 nm i 240 nm za enantiomer koji se prvi ispire s kolone. Međutim, ovaj rezultat nije iznenađujući s obzirom da su ovi aromatski sustavi bitno različiti od prije navedenih te su im i CD spektri vjerojatno različiti od ostalih.



Slika 32. Odjeljivanje enantiomera na kiralnoj koloni **KNF-A**, 1 mL/min, 254 nm, CD detekcija: a) *N*-(1-(3,5-dimetilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamid ((±)-**KS-3)**, *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 50 : 100 : 1; b) (*S*)-*N*-(1-(4-metil-1-naftil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-6**), *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 1 : 1

Zbog navedenih razloga, u daljnjoj pripravi kiralnih punila kod selektora koji su dobiveni odjeljivanjem enantiomera na kiralnoj koloni, koristili su se enantiomeri koji se ispiru prvi s kolone, odnosno enantiomeri (*S*)-apsolutne konfiguracije. Dodatni razlog za takvu odluku je i činjenica što je prilikom odjeljivanja enantiomera na kiralnoj koloni enantiomerna čistoća enantiomera koji se prvi ispire s kolone uvijek veća nego enantiomera koji se drugi ispire s kolone, slika 33.[22] Zbog toga je svakako bolje koristiti prvoizlazeći enantiomer u daljnjoj pripravi KNF. Usput su sve novopripravljene **KNF-1 – KNF-9** uniformno sadržavale selektor (*S*)-apsolutne konfiguracije, bez obzira na način odjeljivanja enantiomera.



Slika 33. Određivanje *ev* enantiomera dobivenih odjeljivanjem enantiomera **(±)-KS-4** na kiralnoj koloni **KNF-A**, *Ψ*(heksan, DCM, MeOH) = 40 : 60 : 1; 254 nm; 1 mL/min

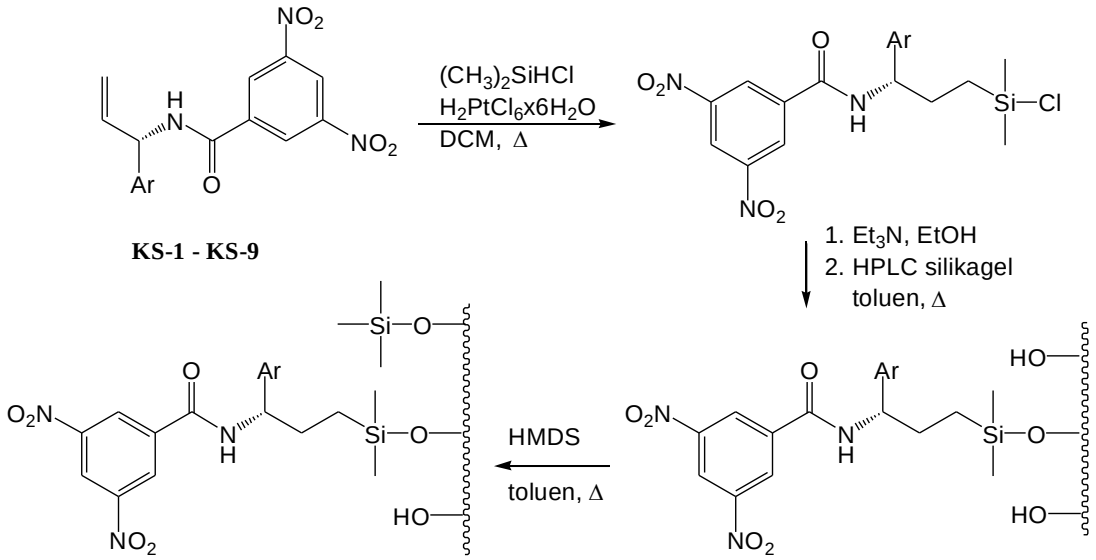
*4.1.6. Priprava kiralnih nepokretnih faza **KNF-1** – **KNF-9***

Pripravljene selektore je potrebno kovalentno vezati na silikagel. Za vezanje kiralnog selektora na silikagel korištena je metoda koja ne uvodi dodatne polarne skupine u strukturu KNF, shema 15.[87]

Prvo se amid dimetilklorsilanom hidrosililira u prisustvu Speierovog katalizatora, heksakloroplatinske kiseline otopljene u izopropanolu.[88] Zatim je dobivenom sirovom

produktu klor zamijenjen etoksi skupinom pomoću trietilamina i apsolutnog etanola. Dobiveni spoj je kromatografiran na kratkoj koloni silikagela, nakon čega je dobiveni produkt, bez pročišćavanja i identifikacije, vezan na 5 μm silikagel u Dean-Starkovoj aparaturi u vrijućem toluenu.[89] Izolirane KNF-OH su podvrgnute CHN i IR analizi kako bi se odredilo koliko selektora se vezalo na silikagel. CHN analiza je pokazala da je to uobičajenih[73] cca. 0,2 mmol selektora po 1 gramu kiralnog punila. Primjer FT-IR spektra selektora **KS-6** i **KNF-OH-6** nalazi se u Dodatku, slike D1–D3.

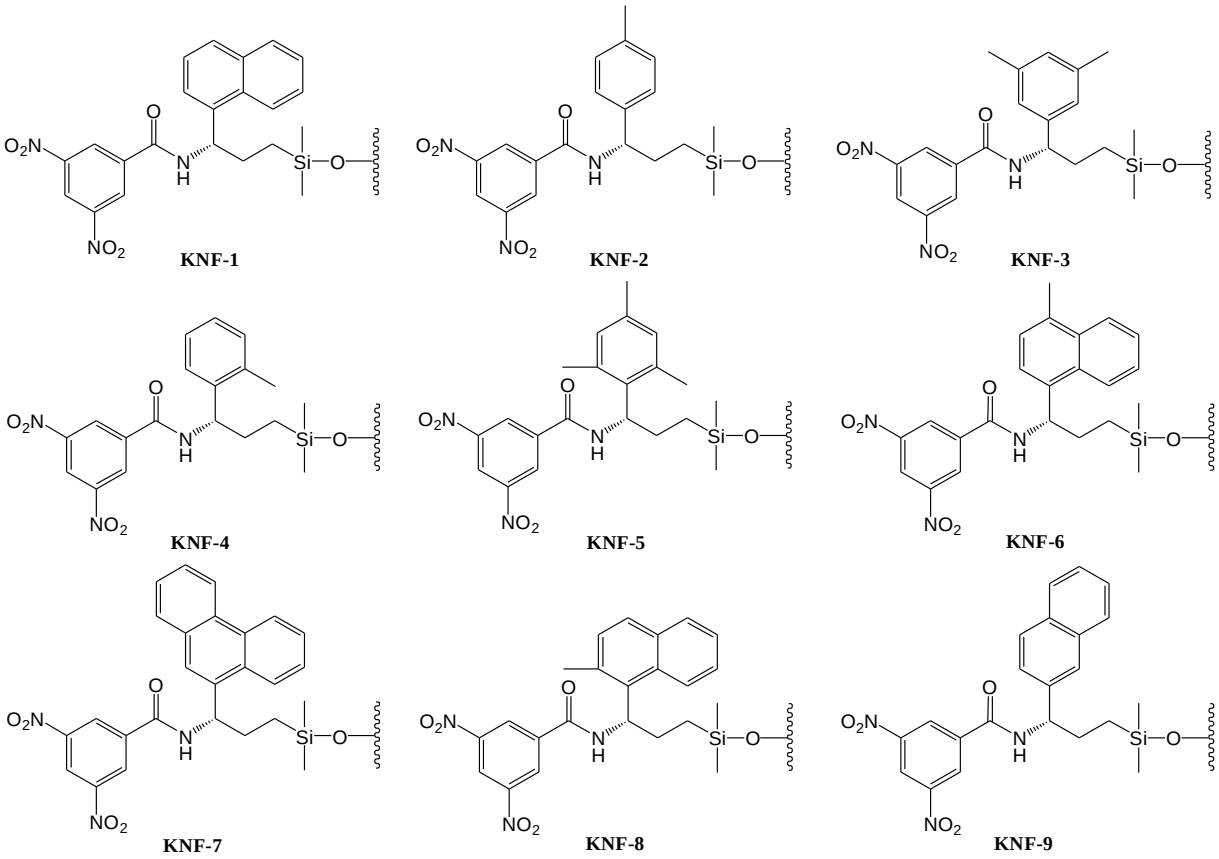
Shema 15



Zadnji stupanj priprave KNF je postupak kojim se zaštićuju slobodne silanolne skupine (engl. *end-capping*).[90] Silanizacija silikagela izvedena je s heksametildilazanom (HMDS) u vrijućem toluenu.

4.2. Evaluacija kiralnih nepokretnih faza KNF-1 – KNF-9

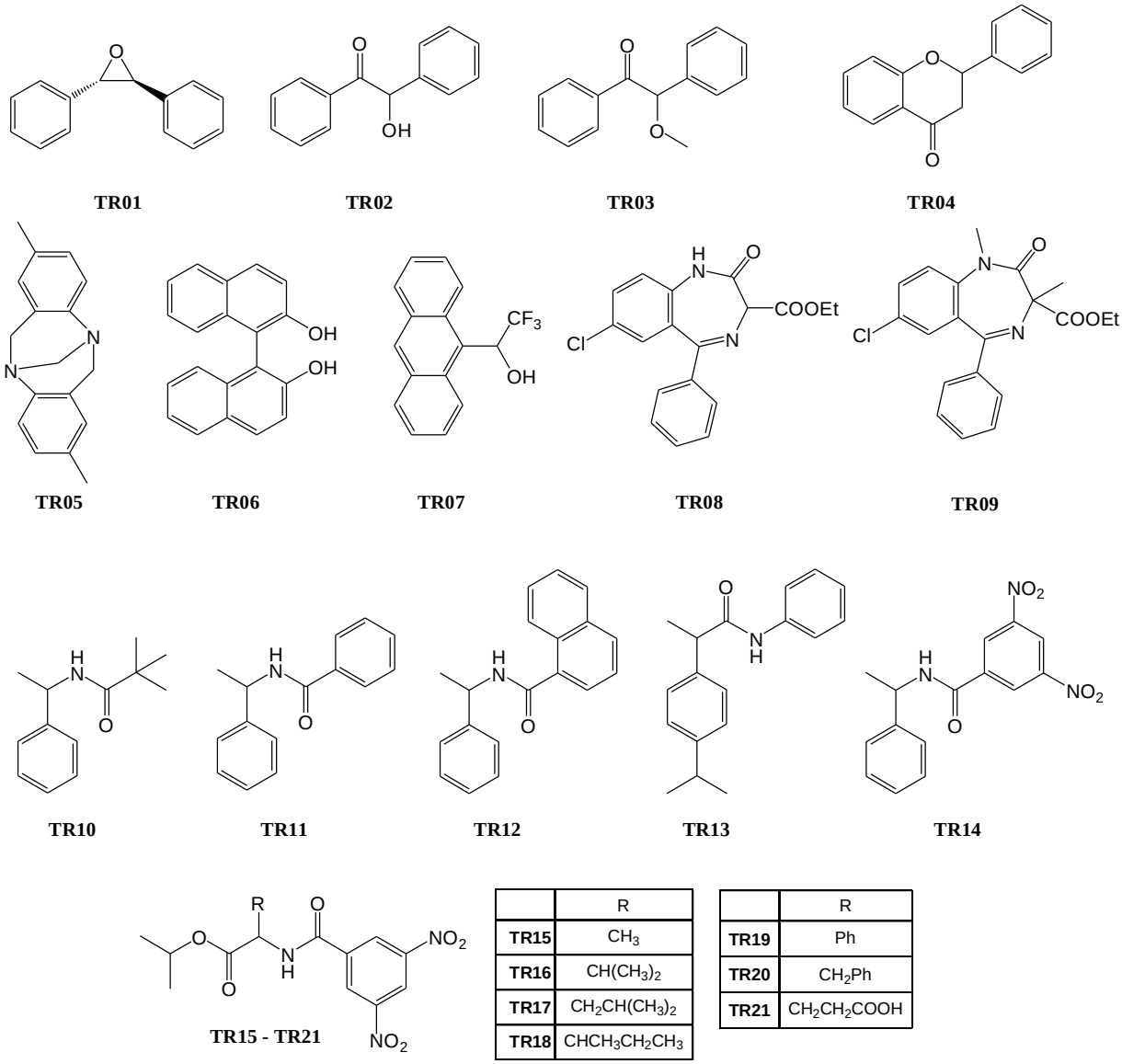
Pripravljene **KNF-1** – **KNF-9**, prikazane slikom 34, bilo je potrebno evaluirati odjeljivanjem enantiomera različitih racemičnih analitima. Za tu svrhu odabrani su racemični spojevi koji se mogu podijeliti u tri skupine: set standardnih racemata, nesteroidni protuupalni lijekovi i 3-hidroksi derivati benzodiazepina. Analize su rađene uz nepolarnu pokretnu fazu, odnosno u kromatografiji normalnih faza.



Slika 34. Strukture novopripravljenih kiralnih nepokretnih faza **KNF-1 – KNF-9**

*4.2.1. Odjeljivanje enantiomera standardnog seta racemičnih analita na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9***

Prvu skupinu racemičnih analita čini standardni set od 21-og spoja koji se u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu standardno koristi za ispitivanje sposobnosti enantioseparacije pripravljenih KNF, slika 35.[83,91] Ovaj set sadrži nekoliko podskupova.



	R
TR15	CH_3
TR16	$CH(CH_3)_2$
TR17	$CH_2CH(CH_3)_2$
TR18	$CHCH_3CH_2CH_3$

	R
TR19	Ph
TR20	CH_2Ph
TR21	CH_2CH_2COOH

Slika 35. Strukture racemičnih testnih spojeva **TR01** – **TR21** korištenih za ispitivanje sposobnosti enantioseparacije **KNF-1** – **KNF-9**

Prvi podskup čine spojevi **TR01** – **TR04** koji su malih dimenzija i posjeduju jednu ili niti jednu karbonilnu skupinu, koja je akceptor ali ne i donor vodikove veze. Zbog takve strukture se teško odjeljuju na KNF četkolikog tipa.

Spojevi **TR05** – **TR07** se zbog velikih dimenzija, većih aromatskih sustava te hidroksilne odnosno amino skupine, odvajaju na većini četkolikih KNF. U ovaj podskup mogu se uključiti i analiti **TR08** i **TR09** koji imaju benzodiazepinski skelet i nekoliko funkcionalnih skupina koje mogu stvarati vodikove veze. Zbog toga se može očekivati kako će se i ovi analiti dobro odjeljivati na pripravljenim kolonama.

Spojevi **TR10** – **TR14** su amidi koji na jednom ili oba kraja amidne skupine sadrže aromatske sustave te mogu stvarati vodikove veze i aromatske π-π i CH-π interakcije.

Zadnji podskup čine izopropilni esteri *N*-3,5-dinitrobenzoilnih derivata aminokiselina **TR15** – **TR21**. Ovi spojevi uz amidnu skupinu sadrže i estersku skupinu te 3,5-dinitrobenzoilnu skupinu koja je dobra π-akceptorska skupina i može stvarati jake π-π interakcije s aromatskim skupinama selektora.

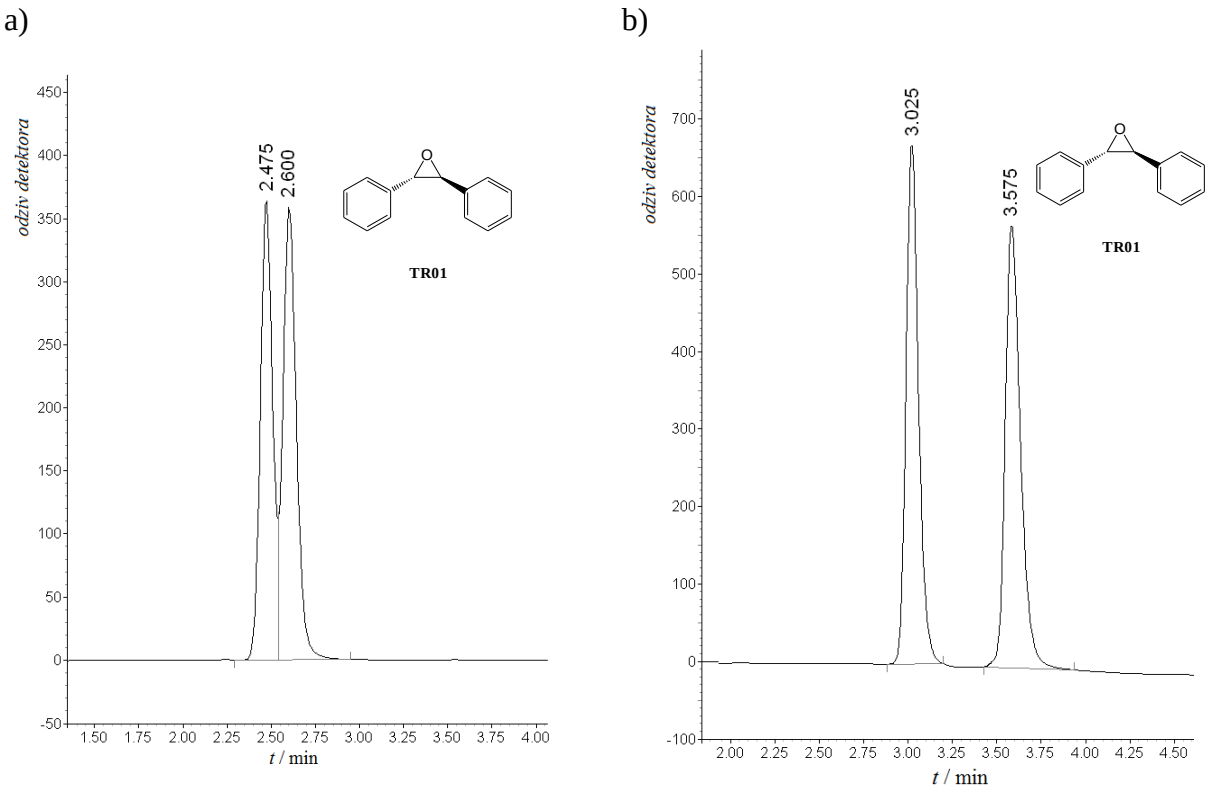
Tablica 11. Rezultati odjeljivanja enantiomera **TR01** – **TR07** i **TR09** na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9**, *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10, 1 mL/min, 254 nm

		TR01	TR02	TR03	TR04	TR05	TR06	TR07	TR09
KNF-1	k_2	0,70	2,72	1,68	1,82	1,26	1,36	1,51	3,11
	α	1,43	1,27	1,00	1,00	1,34	1,05	1,20	1,13
	R_s	2,82	2,55	0,00	0,00	2,95	0,49	2,23	2,18
KNF-2	k_2	0,29	0,97	0,69	0,75	0,52	0,58	0,90	1,37
	α	1,26	1,19	1,00	1,00	1,23	1,19	1,48	1,08
	R_s	0,89	0,96	0,00	0,00	0,87	0,97	3,32	0,94
KNF-3	k_2	0,15	1,23	0,70	0,88	0,36	2,64	1,30	1,42
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,17	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
KNF-4	k_2	0,12	0,83	0,36	0,40	0,36	0,21	0,37	0,72
	α	1,33	1,00	1,00	1,00	1,13	1,00	1,46	1,08
	R_s	0,47	0,00	0,00	0,00	0,47	0,00	1,36	0,62
KNF-5	k_2	0,09	0,27	0,20	0,25	0,30	0,17	0,30	0,37
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,61	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,00
KNF-6	k_2	0,72	2,57	1,35	1,71	1,44	0,94	1,38	2,76
	α	1,60	1,57	1,00	1,00	1,49	1,14	1,10	1,14
	R_s	4,13	4,43	0,00	0,00	4,28	1,05	0,90	2,36
KNF-7	k_2	0,69	2,24	1,51	1,84	1,74	1,17	1,10	2,74
	α	1,45	1,25	1,05	1,06	1,46	1,00	1,21	1,03
	R_s	2,88	1,09	0,59	0,64	3,15	0,00	1,44	0,47
KNF-8	k_2	0,37	1,01	0,68	0,91	0,51	0,74	1,45	1,50
	α	1,29	1,10	1,00	1,03	1,16	1,14	1,84	1,00
	R_s	1,43	0,46	0,00	0,39	0,69	0,82	4,98	0,00
KNF-9	k_2	0,35	1,13	0,89	0,98	0,71	0,73	0,89	1,87
	α	1,24	1,14	1,04	1,00	1,27	1,13	1,23	1,05
	R_s	1,18	1,06	0,49	0,00	1,86	0,90	1,62	0,69

Spojevi **TR01** – **TR07** i **TR09** su analizirani u pokretnoj fazi koja sadrži 10 % polarne komponente (2-propanol), dok su spojevi **TR08** i **TR10** – **TR21** zbog dužeg zadržavanja na kolonama analizirani u pokretnoj fazi koja sadrži 20 % 2-propanola.

U tablicama 11, 12 i 13 prikazani su rezultati enantioselektivnog odjeljivanja **TR01** – **TR21** na pripravljenim kiralnim kolonama **KNF-1** – **KNF-9**.

KNF koje sadrže supstituirane fenilne sustave (**KNF-2** – **KNF-5**) u većini slučajeva ne odjeljuju analite **TR01** – **TR04**. U slučaju KNF koje imaju veće aromatske supstituente, **TR01** se većinom dobro razdvaja, kao što pokazuje slika 36, a **TR02** samo nešto slabije. Spojevi **TR03** i **TR04** se djelomično odjeljuju jedino na KNF koja sadrži veliki fenantrilni sustav (**KNF-7**), te **TR03** vrlo slabo na **KNF-9** i **TR04** slabo na **KNF-8**, što se može vidjeti u tablici 11.



Slika 36. Odjeljivanje enantiomera analita **TR01,** Ψ(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10; 1 mL/min; 254 nm; na kolonama: a) **KNF-2**; b) **KNF-6**

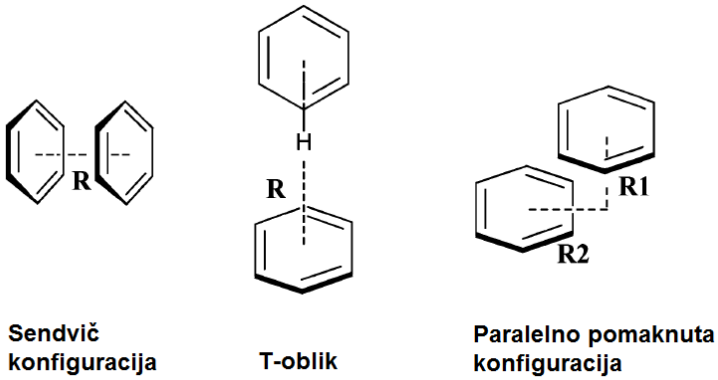
Kao i u prethodnom slučaju, KNF koje sadrže supstituirane fenilne sustave su pokazale puno lošije odjeljivanje analita **TR05** – **TR09,** tablica 11. Tako ove KNF odjeljuju jedino **TR07** i **TR08** koji se zapravo vrlo dobro odjeljuju na gotovo svim pripravljenim KNF. **KNF-2** i **KNF-4,** koje imaju samo jednu metilnu skupinu, pokazuju slabo odjeljivanje ostalih spojeva, dok **KNF-3** i **KNF-5** koje imaju dvije, odnosno tri metilne skupine uopće ne razdvajaju ostale analite. Nasuprot tome, kod KNF koje sadrže veći aromatski sustav (naftilni ili fenantrilni), zabilježeno je dobro odjeljivanje gotovo svih analita **TR05** – **TR09**. Jedini spojevi koji se slabije razdvajaju na ovim KNF su **TR06** koji se slabo ili uopće ne odjeljuje na svim pripravljenim KNF, te **TR09** u slučaju **KNF-7** – **KNF-9**. Zanimljiv rezultat je vrlo slabo odjeljivanje **TR07** na **KNF-6**. Analit **TR07** s velikim π-donorskim antrilnim sustavom se odlično odjeljuje na svim ostalim KNF, a **KNF-6** inače pokazuje vrlo dobre rezultate enantioseparacije testiranih analita. Ovaj rezultat ide u prilog tvrdnji kako je kiralno prepoznavanje teško predvidljivo i ovisno o sitnim detaljima. Mogući uzrok ometanja kiralnog razlikovanja je metilna skupina na položaju 4 kiralnog selektora **KNF-6** koja je isturena naprijed i može ostvariti relativno jake CH-π interakcije s elektronima bogatom antrilnom skupinom analita **TR07**. Na taj način molekule analita se zaustavljaju na ulasku u kiralnu šupljinu selektora pa je kiralna diskriminacija oslabljena.

Racemični amidi **TR10** – **TR14** se vrlo dobro razdvajaju na svim pripravljenim KNF što pokazuje tablica 12. Jedino su zabilježeni slabiji rezultati na **KNF-3** i **KNF-5**, koje su i prije pokazale slabije mogućnosti enantioseparacije. Također, treba primijetiti kako su vremena zadržavanja analita na koloni, što se može vidjeti promatrajući podatak k_2, puno kraća u slučaju KNF koje sadrže supstituirane fenilne sustave nego u slučaju KNF s naftilnim, odnosno fenantrilnim sustavima. Iz toga se može zaključiti kako su interakcije koje analiti stvaraju s ove dvije KNF mnogo slabije nego s ostalim KNF. Glavna zajednička strukturna karakteristika, koja je očigledno razlog slabim rezultatima koje su **KNF-3** i **KNF-5** pokazale, je što imaju više od jedne metilne skupine na aromatskom prstenu.

Tablica 12. Rezultati odjeljivanja enantiomera spojeva **TR08, TR10** – **TR14** na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9**, *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20, 1 mL/min, 254 nm

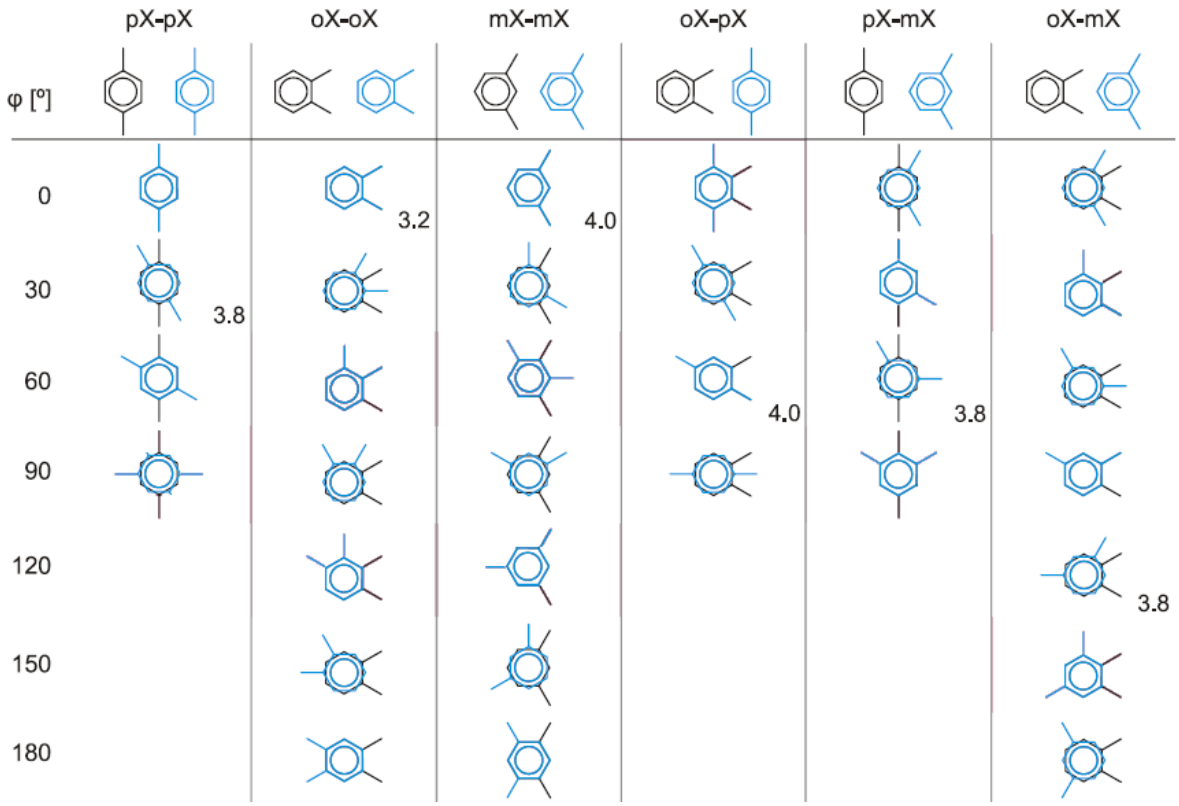
		TR08	TR10	TR11	TR12	TR13	TR14
KNF-1	k_2	4,21	2,61	4,51	11,79	2,16	14,10
	α	1,32	2,12	1,61	1,49	1,55	1,74
	R_s	3,56	6,68	7,38	4,91	6,57	3,44
KNF-2	k_2	1,90	1,18	2,30	8,00	1,12	2,45
	α	1,54	1,49	1,36	1,54	1,41	1,09
	R_s	4,83	2,88	3,85	4,38	3,54	1,00
KNF-3	k_2	3,00	0,54	1,68	2,04	0,85	9,12
	α	1,22	1,08	1,11	1,07	1,22	1,21
	R_s	1,47	0,47	0,87	0,59	1,51	1,52
KNF-4	k_2	0,84	0,61	1,02	2,61	0,50	0,72
	α	1,46	1,66	1,42	1,40	1,48	1,30
	R_s	2,84	2,46	3,08	3,47	2,36	1,85
KNF-5	k_2	0,33	0,21	0,41	0,82	0,17	0,37
	α	1,14	1,00	1,16	1,23	1,18	1,00
	R_s	0,59	0,00	0,76	1,61	0,49	0,00
KNF-6	k_2	4,08	3,60	5,56	16,94	2,40	11,68
	α	1,57	2,82	1,90	1,68	1,64	1,48
	R_s	6,16	9,05	9,80	5,56	7,93	4,93
KNF-7	k_2	4,72	2,96	4,36	9,92	1,69	19,14
	α	1,67	3,02	1,83	1,46	1,50	1,44
	R_s	4,96	7,12	7,01	3,77	5,22	2,93
KNF-8	k_2	2,33	0,88	2,26	6,80	1,70	3,78
	α	1,50	1,23	1,27	1,35	1,50	1,34
	R_s	4,91	1,50	3,21	3,30	5,22	4,13
KNF-9	k_2	2,78	1,64	2,98	8,02	1,41	6,94
	α	1,43	1,57	1,35	1,43	1,35	1,09
	R_s	5,38	6,00	5,34	5,36	4,25	1,25

Unatoč brojnim istraživanjima, najviše u području računalne kemije, priroda π-π interakcija ostaje do danas nedovoljno razjašnjena. Dimer benzena, koji je najjednostavniji primjer π-π interakcija, je detaljno istraživan kako u teoriji, tako i eksperimentalno. Tako je poznato da postoji nekoliko mogućih konfiguracija dimera benzena od kojih su one najniže energije sendvič konfiguracija (*face to face*), T-oblik (*edge to face*) i paralelno pomaknuta konfiguracija, slika 37.[92]



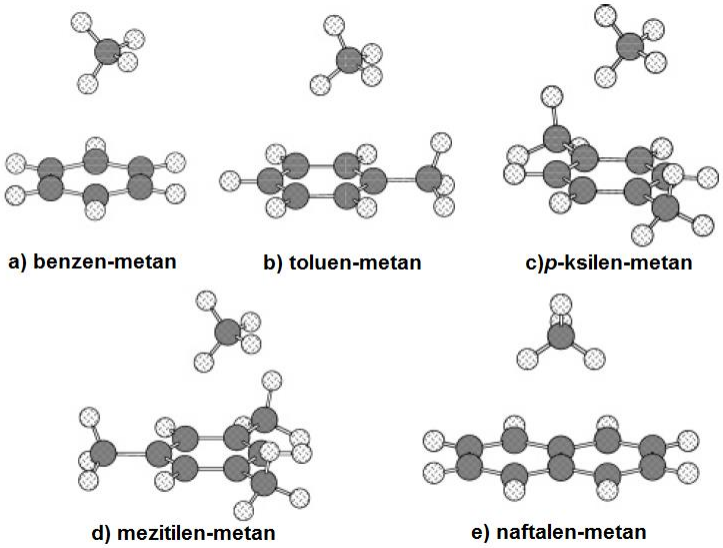
Slika 37. Najstabilnije konfiguracije dimera benzena

Većina istraživanja pokazuje kako je T-oblik nešto niže energije, ali energetske razlike su vrlo male te se smatra kako postoji dinamička ravnoteža ovih konfiguracija. Dimer benzen je, unatoč tome što je najjednostavniji primjer π-π interakcija, i dalje vrlo kompliciran sustav za istraživanje. Stvari se dodatno kompliciraju uvođenjem supstituenata, odnosno proučavanjem većih aromatskih sustava. Tako se pokazalo kako zapravo samo dimer benzena ima stabilnu konfiguraciju T-oblika. U ostalim sustavima, koji uključuju supstituirane fenilne sustave i poliaromatske sustave, konfiguracija koja prevladava je neki oblik paralelno pomaknute konfiguracije.[93] Također, π-π interakcije su jače što je aromatski sustav veći (naftilni, antrilni, fenantrilni prstenovi).[93,94] Jačina interakcija se povećava i supstitucijom (npr. metil, klor).[95] Međutim, tu treba istaknuti kako kod susptituiranih fenilnih prstenova postoji ograničen broj geometrijskih rasporeda supstrata kod kojih dolazi do maksimalne interakcije, slika 38. To je pogotovo važno u većim sustavima gdje su konformacijske promjene ograničene i ostalim skupinama u molekuli.



Slika 38. Geometrije šest parova ksilena najniže energije, na najstabilnijim strukturama je označena udaljenost (Å) između prstenova

Druga vrsta slabih aromatskih interakcija su CH-π interakcije koje imaju važnu ulogu u procesima kristalnog pakiranja, strukturama bioloških molekula i procesima molekularnog prepoznavanja.[96,97] Priroda ovih interakcija je dugo bila kontroverzno pitanje. U početku se pretpostavljalo kako su CH-π interakcije, kao i NH-π i OH-π interakcije, slične vodikovoj vezi te su nazivane najslabijom vodikovom vezom. Međutim, istraživanja u plinskoj fazi te *ab initio* računi CH-π klastera su pokazali kako se ove interakcije značajno razlikuju od tipične vodikove veze. Disperzne interakcije su glavni uzrok privlačenja dok je elektrostatski doprinos gotovo zanemariv. Suprotno tome, kod vodikovih veza su za privlačenje odgovorne upravno elektrostatske interakcije. Zato je priroda CH-π interakcija puno sličnija van der Waalsovim interakcijama.[96]



Slika 39. Optimizirane strukture Ar–CH_4 klastera[98]

Benzen–metan klaster je najjednostavniji model za proučavanje CH-π interakcija. Optimizirana struktura ovog klastera dobivena računalnim metodama pokazuje kako se molekula metana u klasteru smješta iznad benzenskog prstena tako da je jedna C–H veza usmjerena prema ravnini prstena. Supstitucijom benzena (toluen, ksilen, mezitilen) položaj metana u optimiziranoj strukturi se ne mijenja, slika 39, a raste energija interakcije CH_4–Ar klastera. Povećanje elektronske gustoće benzenskog prstena zbog elektron-donorskih metilnih skupina nije glavni razlog povećanju interakcije. Glavni uzrok tome su zapravo veće disperzne interakcije.[98] Za razliku od supstituiranih benzena koji imaju tzv. monodentatne strukture, najstabilnija geometrija naftalen–metan klastera je ona u kojoj su dvije C–H veze usmjerene prema naftalenskom prstenu, odnosno struktura je bidentatna, slika 39. Također, energija interakcije ovog klastera je veća nego energija interakcije benzen–metan klastera i klastera metana i supstiturianih benzena.[98] Jakost interakcija povećava se s povećanjem aromatskog sustava, pa tridentatni piren–metan klaster ima još veću energiju interakcije. Uzrok ovih jačih interakcija su veće disperzne interakcije dok elektrostatske interakcije nemaju puno utjecaja.[99]

Dakle, ako se vratimo raspravi rezultata, možemo zaključiti da su rezultati kromatografske evaluacije u većini slučajeva u skladu s očekivanima. Prema teorijskom predviđanju, π-π i CH-π aromatske interakcije racemičnog analita i KNF su veće što je veći aromatski sustav pa je na taj način i kiralno razlikovanje veće. Međutim, interakcije bi trebale

biti veće i s povećanjem broja metilnih supstituenata na benzenskom prstenu. Suprotno tome, pokazalo se kako se analiti na takvim KNF zadržavaju kraće te je enantioseparacija slabija. Najvjerojatniji uzrok tome su sterička ometanja koja onemogućavaju da analit i selektor kiralne nepokretne faze dođu u povoljnu konformaciju kako bi se ostvarile maksimalne interakcije.

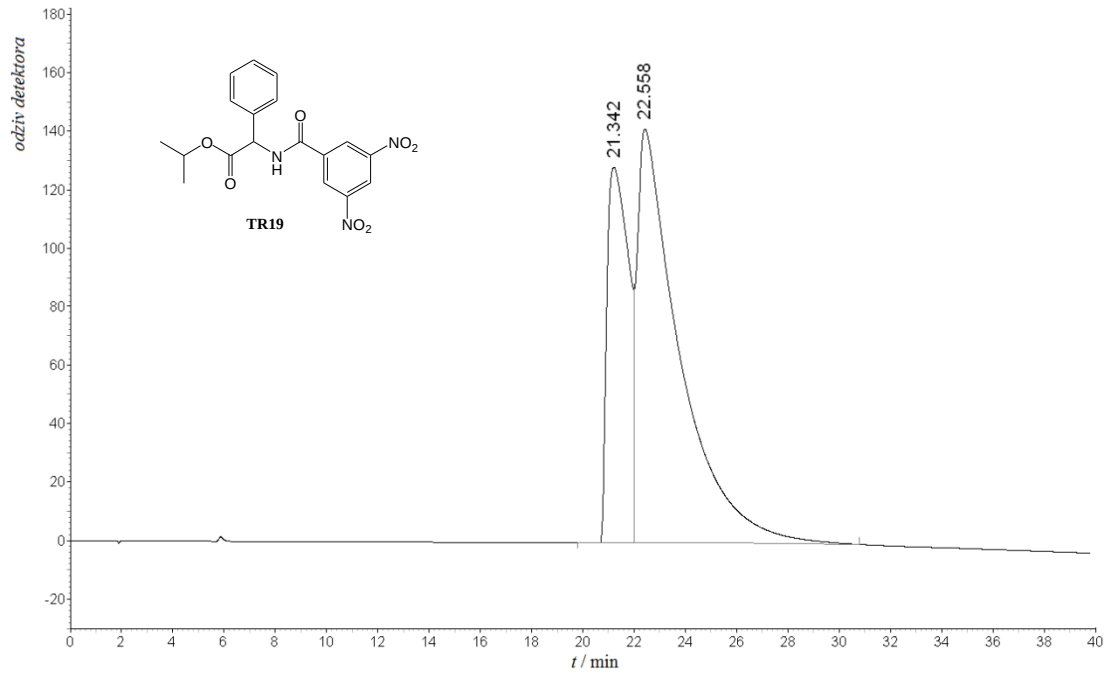
Tablica 13. Rezultati odjeljivanja enantiomera spojeva **TR15** – **TR21** na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9**, Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20, 1 mL/min, 254 nm

		TR15	TR16	TR17	TR18	TR19	TR20	TR21
KNF-1	k_2	4,59	4,72	4,83	5,89	6,44	5,63	5,45
	α	1,31	1,43	1,65	1,52	1,03	1,27	1,41
	R_s	2,66	3,54	4,21	3,02	0,31	2,04	3,10
KNF-2	k_2	0,96	0,93	0,87	0,93	1,29	1,19	1,17
	α	1,08	1,10	1,29	1,15	1,00	1,14	1,19
	R_s	0,68	0,87	2,25	1,35	0,00	1,37	1,82
KNF-3	k_2	5,27	3,64	3,58	3,09	4,78	5,87	4,78
	α	1,14	1,19	1,17	1,19	1,06	1,06	1,17
	R_s	1,09	1,47	1,38	1,25	0,54	0,51	1,34
KNF-4	k_2	0,29	0,28	0,22	0,24	0,41	0,31	0,32
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,16	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00
KNF-5	k_2	0,21	0,21	0,15	0,17	0,28	0,23	0,20
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,17	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00	0,00
KNF-6	k_2	3,88	4,45	4,21	4,34	6,39	5,69	5,19
	α	1,31	1,48	1,81	1,51	1,10	1,37	1,45
	R_s	3,89	5,55	8,71	5,02	1,16	4,28	5,47
KNF-7	k_2	6,69	6,39	6,11	6,21	10,06	9,14	8,92
	α	1,19	1,28	1,50	1,33	1,06	1,32	1,36
	R_s	1,57	2,27	4,14	2,31	0,53	2,40	2,86
KNF-8	k_2	1,47	1,50	1,21	1,42	2,44	1,99	1,78
	α	1,00	1,09	1,12	1,07	1,23	1,13	1,09
	R_s	0,00	1,01	1,33	0,69	2,77	1,77	1,07
KNF-9	k_2	3,57	3,53	4,18	3,61	4,57	4,83	4,60
	α	1,45	1,51	2,08	1,64	1,18	1,45	1,67
	R_s	5,90	6,57	11,72	7,29	2,63	5,71	7,81

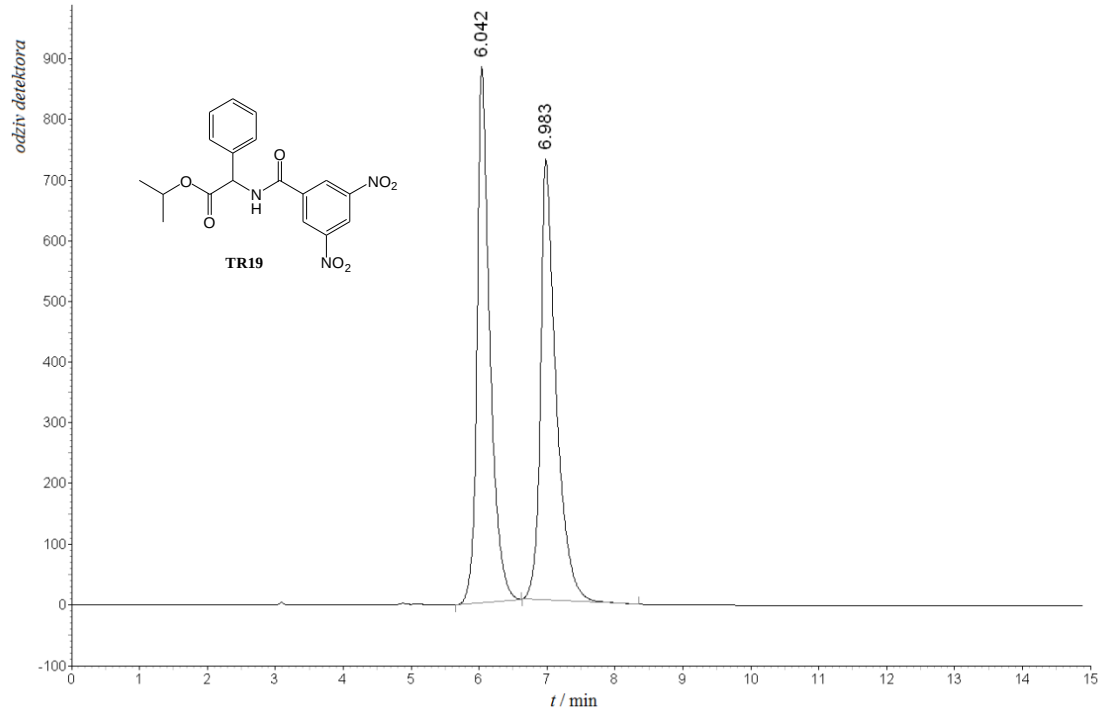
3,5-Dinitrobenzoilni derivati aminokiselina s izopropilnom zaštitom karboksilne skupine posjeduju amidnu i estersku skupinu i aromatski sustav koji je dobar π-akceptor. Zbog toga je razumljivo za pretpostaviti kako bi se trebali dobro odjeljivati na pripravljenim KNF. Pretpostavka se pokazala točnom u slučaju KNF s naftilnim i fenantrilnim aromatskim sustavom, međutim ne i u slučaju KNF sa supstituiranim fenilnim prstenom, tablica 13.

Kako se pokazalo i u slučaju prethodnih analiza, KNF koje sadrže selektore s metilnim skupinama na benzenskom prstenu pokazuju lošije rezultate enantioseparacije. Tako **KNF-2** i **KNF-3** mogu razdvojiti neke spojeve iz ove serije, međutim razlučivanje je u većini slučajeva lošije nego u slučaju KNF s većim aromatskim skupinama. Kod **KNF-4** i **KNF-5** uopće nije zabilježeno odjeljivanje enantiomera spojeva iz ove serije, osim vrlo slaba u slučaju **TR19**. Razlog tome je prisutnost metilne skupine u *ortho* položaju fenilnog prstena zbog čega je rotacija oko C–C veze između kiralnog centra i aromatskog sustava donekle onemogućena. Zato šupljina selektora ne može poprimiti prikladan oblik kako bi se analit približio kiralnom centru. Kiralni centar u molekulama analita nalazi se u sredini okružen prilično velikim skupinama (3,5-dinitrobenzoilna i izopropilna skupina te bočni ogranak same aminokiseline). Zbog toga je vrlo vjerojatno kako sami analit ne može prići dovoljno blizu kiralnom centru i amidnoj skupini te dolazi do vrlo slabih interakcija. Posljedica toga je i da se analiti puno brže ispiru s kolone što se vidi i iz vrlo niskih vrijednosti k_2. To znači kako oba enantiomera prolaze kolonom gotovo bez zadržavanja i pri tome ne dolazi do kiralnog razlikovanja. Dodatna potvrda ovome su i rezultati analize na **KNF-8.** Ova KNF također ima metilnu skupinu na položaju 2 naftilnog prstena te je zbog toga puno rigidnija. U seriji KNF s većim aromatskim sustavima, **KNF-8** pokazuje najslabije rezultate enantioseparacije. Zanimljivo je i da ove KNF, koje imaju krute strukture u kojima je rotacija aromatskog sustava donekle onemogućena, pokazuju dobru mogućnost odjeljivanja enantiomera **TR19**. Ovaj spoj je derivat fenilglicina i ima benzenski prsten vezan na asimetrični ugljik što omogućuje dodatnu aromatsku interakciju koja sudjeluje u kiralnom prepoznavanju. Ovaj spoj na fleksibilnijim KNF pokazuje najslabije rezultate odjeljivanja enantiomera, slika 40.

a)



b)

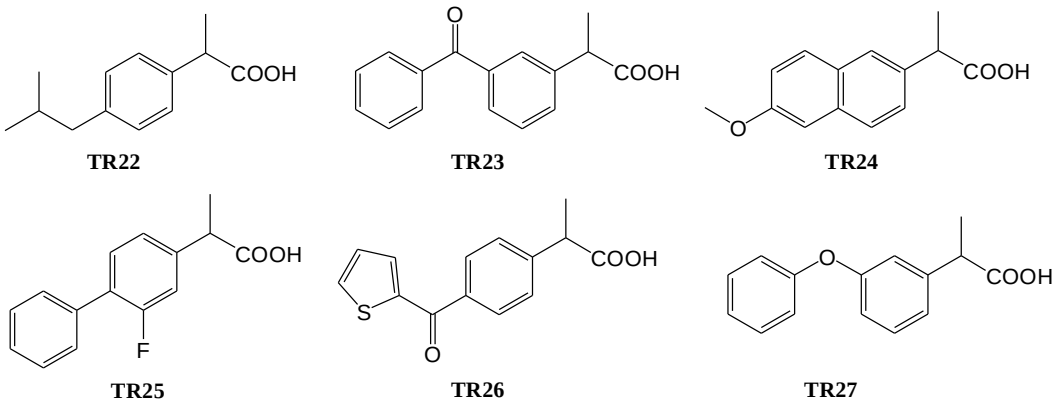


Slika 40. Odjeljivanje enantiomera analita **TR19**, *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20; 1 mL/min; 254 nm; na kolonama: a) **KNF-7**; b) **KNF-8**

*4.2.2. Odjeljivanje enantiomera nesteroidnih protuupalnih lijekova na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9***

Spojevi **TR22** – **TR27** pripadaju skupini lijekova pod nazivom nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs*, NSAID), točnije u skupinu derivata propionske kiseline, slika 41.

Termin nesteroidni razlikuje ove lijekove od steroida, koji pored velikog broja drugih učinaka imaju slično protuupalno djelovanje. NSAID lijekovi se koriste u liječenju boli i upalnih procesa kod akutnih ili kroničnih stanja. Kao analgetici, NSAID lijekovi su specifični po tome što ne stvaraju ovisnost. Najpoznatiji predstavnici su ketoprofen, ibuprofen i naproksen. Mogu se klasificirati prema kemijskoj strukturi ili mehanizmu njihovog djelovanja. Stariji lijekovi su bili poznati puno prije nego je bio poznat mehanizam njihovog djelovanja, pa se zato klasificiraju prema kemijskoj strukturi. Za razliku od njih, noviji lijekovi se klasificiraju prema mehanizmu djelovanja.



Slika 41. Strukture analiziranih nesteroidnih protuupalnih lijekova

Budući da su ovi spojevi kiseline, pokretna faza mora sadržavati kiseli aditiv zbog bržeg izlaska spojeva.[85] Aditiv u ovdje korištenoj pokretnoj fazi je octena kiselina (0,1 %).

Amonijev acetat je hlapljiv na niskim temperaturama, te se zato često koristi u pripremi uzoraka za masenu spektrometriju i kao pufer u pokretnim fazama za LC-MS analize.[100] Poznato je kako aditivi u pokretnoj fazi poput octene kiseline ili trifluoroctene kiseline mogu pozitivno utjecati na oblik pika u kromatogramu kao i na retenciju.[85] Pokazalo se kako u nekim slučajevima neutralne hlapljive soli poput amonijevog acetata i amonijevog

formijata imaju jači utjecaj na separaciju analita nego kiseline.[101] Zbog toga se često koriste kao aditivi umjesto octene kiseline u pokretnim fazama. Iako se u početku amonijev acetat koristio kao aditiv u kromatografiji obrnutih faza, pokazao se vrlo korisnim i u kromatografiji normalnih faza. Tako su i NSAID lijekovi iz skupine derivata propionske kiseline pokazali dobre rezultate enantioselektivne analize na kiralnoj koloni Whelk-O1 uz pokretne faze koje sadrže amonijev acetat.[102] Stoga su profeni **TR22** – **TR27** analizirani i u pokretnoj fazi s ovom soli (1 g dm^{-3}).

Tablica 14. Rezultati odjeljivanja enantiomera spojeva **TR22** – **TR27** na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9**, Ψ(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 90 : 10 : 0,1; 1 mL/min; 254 nm

		TR22	TR23	TR24	TR25	TR26	TR27
KNF-1	k_2	0,28	2,51	2,79	0,63	4,16	0,62
	α	1,00	1,00	1,34	1,06	1,00	1,08
	R_s	0,00	0,00	3,78	0,41	0,00	0,53
KNF-2	k_2	0,10	1,02	1,00	0,22	1,44	0,24
	α	1,00	1,00	1,11	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00
KNF-3	k_2	0,40	4,22	1,78	1,32	8,42	1,03
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNF-4	k_2	0,01	0,48	0,46	0,25	1,17	0,17
	α	1,00	1,00	1,21	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,90	0,00	0,00	0,00
KNF-5	k_2	0,03	0,33	0,24	0,09	0,46	0,09
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNF-6	k_2	0,24	2,33	4,35	0,52	3,79	0,52
	α	1,14	1,05	1,58	1,14	1,00	1,21
	R_s	0,47	0,60	5,80	0,73	0,00	1,18
KNF-7	k_2	0,22	2,28	2,89	0,53	4,09	0,50
	α	1,00	1,00	1,45	1,00	1,00	1,10
	R_s	0,00	0,00	3,52	0,00	0,00	0,56
KNF-8	k_2	0,12	1,34	0,99	0,31	2,25	0,31
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNF-9	k_2	0,16	1,45	1,24	0,32	2,22	0,36
	α	1,00	1,00	1,09	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,95	0,00	0,00	0,00

U pokretnoj fazi koja kao aditiv sadrži octenu kiselinu, odjeljivanje enantiomera na pripremljenim KNF je prilično loše, tablica 14. Jedini spoj koji se odvaja na većini pripremljenih KNF je naproksen, **TR24**. Razlog tome je njegova naftilna aromatska skupina koja stvara puno bolje aromatske interakcije s KNF od ostalih profena.

Tablica 15. Rezultati odjeljivanja enantiomera spojeva **TR22** – **TR27** na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9**, Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc; 1 mL/min; 254 nm

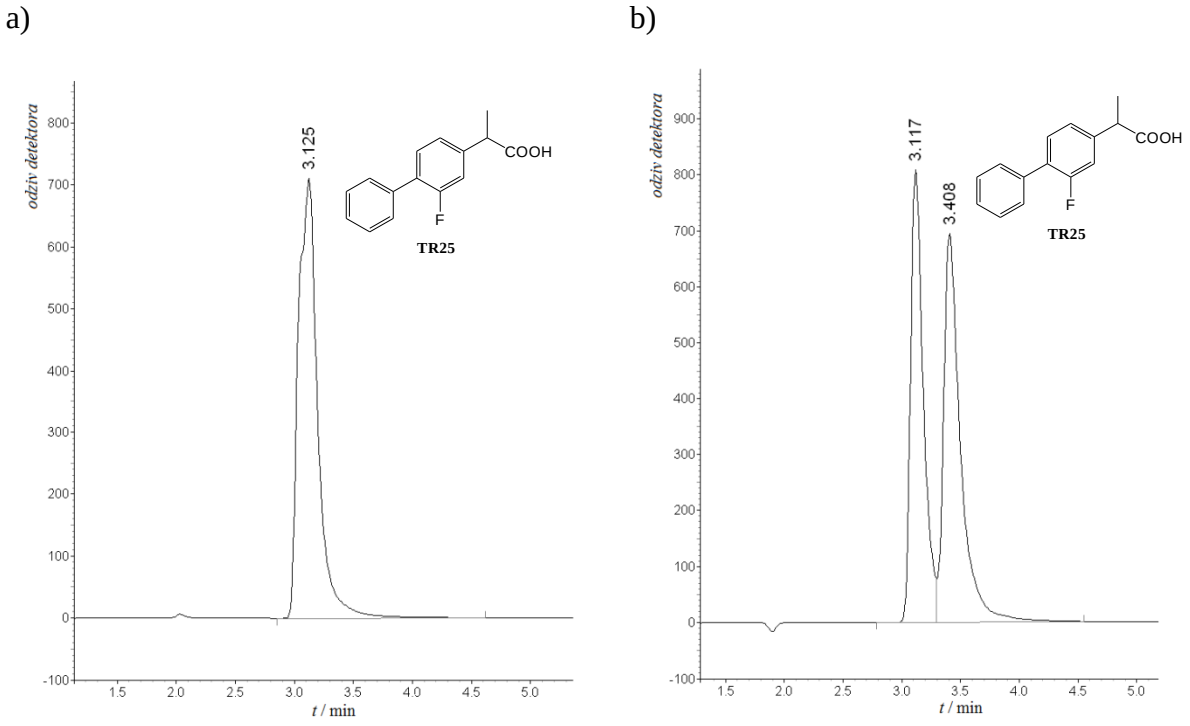
		TR22	TR23	TR24	TR25	TR26	TR27
KNF-1	k_2	0,45	6,25	8,95	2,00	11,01	1,14
	α	1,00	1,10	1,82	1,14	1,11	1,26
	R_s	0,00	0,75	4,37	1,09	0,63	2,10
KNF-2	k_2	0,08	0,64	1,02	0,19	0,90	0,20
	α	1,00	1,00	1,34	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	2,19	0,00	0,00	0,00
KNF-3	k_2	0,37	2,70	1,85	1,01	5,33	0,96
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNF-4	k_2	0,01	0,33	0,48	0,08	0,46	0,07
	α	1,00	1,00	1,43	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	1,43	0,00	0,00	0,00
KNF-5	k_2	0,04	0,31	0,25	0,12	0,47	0,13
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNF-6	k_2	0,16	1,31	3,51	0,43	2,03	0,45
	α	1,50	1,20	2,39	1,53	1,16	1,55
	R_s	0,62	1,43	7,70	1,83	1,18	1,95
KNF-7	k_2	0,31	1,83	3,35	0,67	2,94	0,63
	α	1,19	1,12	2,14	1,27	1,11	1,24
	R_s	0,51	0,87	4,68	1,37	0,78	1,13
KNF-8	k_2	0,06	0,67	0,64	0,17	1,05	0,18
	α	1,00	1,00	1,08	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00
KNF-9	k_2	0,11	0,81	1,03	0,23	1,22	0,25
	α	1,00	1,00	1,21	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00	0,00

Kao što je bio slučaj i dosad, na **KNF-3** i **KNF-5** nije zabilježeno odjeljivanje enantiomera niti na jednom od analita **TR22** – **TR27**, te spojevi vrlo brzo izlaze s kolona,

gotovo bez zadržavanja. Na **KNF-8** također nije zabilježeno odjeljivanje enantiomera niti jednog analita, dok je na **KNF-2**, **KNF-4** i **KNF-9** zabilježena jedino slabo odjeljivanje enantiomera u slučaju naproksena. Najveće iznenađenje je **KNF-7**, koja unatoč velikom fenantrilnom armatskom sustavu pokazuje tek odjeljivanje enantiomera **TR24** i vrlo slabo **TR27**. U ovim uvjetima su se najboljima pokazale **KNF-1** i posebno **KNF-6** koje, osim odličnog odjeljivanja enantiomera naproksena, pokazuju i djelomično odjeljivanje enantiomera nekih od preostalih profena.

Uspoređujući rezultate enantioselektivnog odjeljivanja profena **TR22** – **TR27** na pripravljenim KNF uz pokretnu fazu koja kao aditiv sadrži octenu kiselinu prikazane u tablici 14 i rezultate uz pokretnu fazu koja sadrži amonijev acetat prikazane u tablici 15, jasno je da su rezultati dobiveni uz amonijev acetat puno bolji.

Kao i u prethodnom slučaju, **KNF-3** i **KNF-5** ne odjeljuju enantiomere niti jednog profena u seriji, a **KNF-2**, **KNF-4**, **KNF-8** i **KNF-9** razdvajaju samo enantiomere naproksena, **TR24**. Međutim, u slučaju navedenih KNF odjeljivanje naproksena je bolje u pokretnoj fazi s amonijevim acetatom nego s octenom kiselinom.



Slika 42. Odjeljivanje enantiomera **TR25** na **KNF-7,** 1 mL/min; 254 nm; a) *Ψ*(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 90 : 10 : 0,1; b) *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc

Najbolje odjeljivanje enantiomera profena pokazuju **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7**, a zabilježena razlučivanja su puno bolja u pokretnoj fazi s amonijevim acetatom nego s octenom kiselinom. To je posebno vidljivo u slučaju **KNF-7** kod koje je uz octenu kiselinu kao aditiv zabilježeno jedino dobro razlučivanje u slučaju **TR24** i slabo kod **TR27**, dok je uz amonijev acetat kao aditiv u svim slučajevima zabilježena barem djelomično odjeljivanje enantiomera, slika 42.

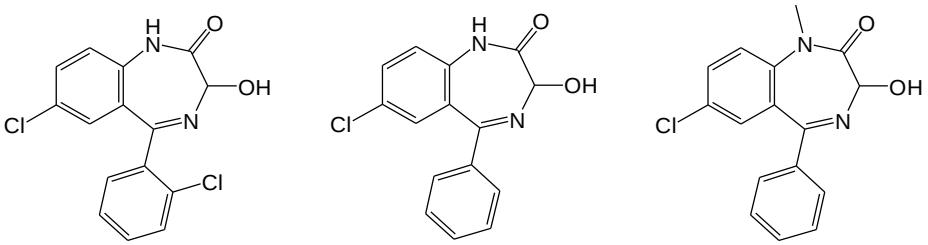
Sam mehanizam djelovanja amonijevog acetata u pokretnim fazama za HPLC do sada nije objašnjen. Octena kiselina u organskim otapalima ima dosta veliku konstantu disocijacije, pK_a (pK_a = 11,3 u čistom 2-propanolu).[103] Stoga je razumljivo za pretpostaviti kako je u pokretnoj fazi u nedisociranom obliku. Takva kiselina može stvarati OH-π interakcije s aromatskim sustavima selektora KNF i molekula analita. Poznato je da su OH-π interakcije puno jače nego CH-π interakcije i po karakteru su puno bliže vodikovim vezama.[104] Zbog toga se može pretpostaviti kako molekule kiseline iz pokretne faze mogu okupirati mjesta na aromatskim sustavima i na taj način ometati nastajanje interakcije između analita i selektora KNF. S druge strane, amonijev acetat je ionski spoj te je u organskoj pokretnoj fazi koja sadrži heksan i 2-propanol vjerojatno solvatiziran molekulama 2-propanola. Stoga ne može doći u kontakt s aromatskim sustavima KNF i analita koje su onda slobodne za međusobnu interakciju.

*4.2.3. Odjeljivanje enantiomera 3-hidroksibenzodiazepinskih lijekova na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9***

Benzodiazepini su psihoaktivne supstance koje pojačavaju utjecaj neurotransmitera γ-aminobutanske kiseline (GABA) na $GABA_A$ receptoru.[105] Zbog toga imaju sedativna, antidepresivna, antikonvulzijska, hipnotička (induciraju san) svojstva te su dobri relaksatori mišića. Zbog ovih svojstava se koriste u liječenju depresije, nesanice, epilepsije, grčenja mišića, prilikom odvikavanja od alkohola i kao terapija prije medicinskih ili dentalnih zahvata. Kategoriziraju se kao kratko-, srednje- i dugodjelujući. Kratko djelujući se koriste kod liječenja nesanice, dok se dugodjelujući preporučuju u liječenju depresije.[105]

Termin benzodiazepin označava kemijski naziv heterocikličkog sustava čija se struktura sastoji od kondenziranog benzenskog i diazepinskog prstena. Prema Hantzsch-

Widmanovoj nomenklaturi diazepin je heterociklički prsten s dva atoma dušika, pet atoma ugljika i s maksimalnim brojem kumulativnih dvostrukih veza.[106] Benzodiazepinski lijekovi su zapravo supstituirani 1,4-benzodiazepini, iako se sam naziv odnosi i na mnoge druge spojeve koji nemaju farmakološko djelovanje. Benzodiazepinski lijekovi se dijele na pet tipova: 2-keto spojevi, 3-hidroksi spojevi, 7-nitro spojevi, triazolni spojevi i imidazo spojevi.



TR28 **TR29** **TR30**

Slika 43. Strukture analiziranih 3-hidroksibenzodiazepinskih lijekova

Enantiomeri analiziranih spojeva **TR08** i **TR09**, koji su strukturni analozi 3-hidroksibenzodiazepinskih lijekova s esterskom skupinom na položaju 3 umjesto hidroksi skupine, dobro su se odjeljivali na pripremljenim **KNF-1** – **KNF-9**. Zbog toga su u testiranje mogućnosti enantioseparacije pripremljenih KNF uključeni i predstavnici 3-hidroksibenzodiazepinskih lijekova **TR28** – **TR30**, slika 43. S obzirom da ovi spojevi imaju i kisela i bazna svojstva,[107] amonijev acetat je korišten kao aditiv u pokretnoj fazi.

3-Hidroksi derivati benzodiazepina pokazuju vrlo dobre rezultate enantioselektivne separacije na pripravljenim KNF. Kao i prethodno, najslabije rezultate pokazuju **KNF-3** i **KNF-5,** kod koje zapravo uopće ne dolazi do odjeljivanja enantiomera. Ostale KNF pokazuju vrlo dobre rezultate, posebno u slučaju **TR28** koji pokazuje vrlo visoko razlučivanje na svim preostalim KNF, što se vidi iz tablice 16. Razlog tome je zasigurno prisutnost klora na benzenskom prstenu koji nije prisutan u preostala dva analita. Naime, analiti **TR28** i **TR29** razlikuju se jedino u navedenom klorovom supstituentu, a dobiveni rezultati enantioselektivne separacije se kod svih pripravljenih kolona za ova dva analita dosta razlikuju, slika 44. Ovaj rezultat je u skladu s dosad poznatim istraživanjima u kojima se pokazalo kako supstitucija klora i metila povećava jakost aromatskih π-π interakcija[95] i CH-π interakcija.[96] Uz to, klor je manji od metilne skupine[108] tako da steričke prepreke očito nemaju velik utjecaj prilikom kiralnog prepoznavanja analita i KNF.

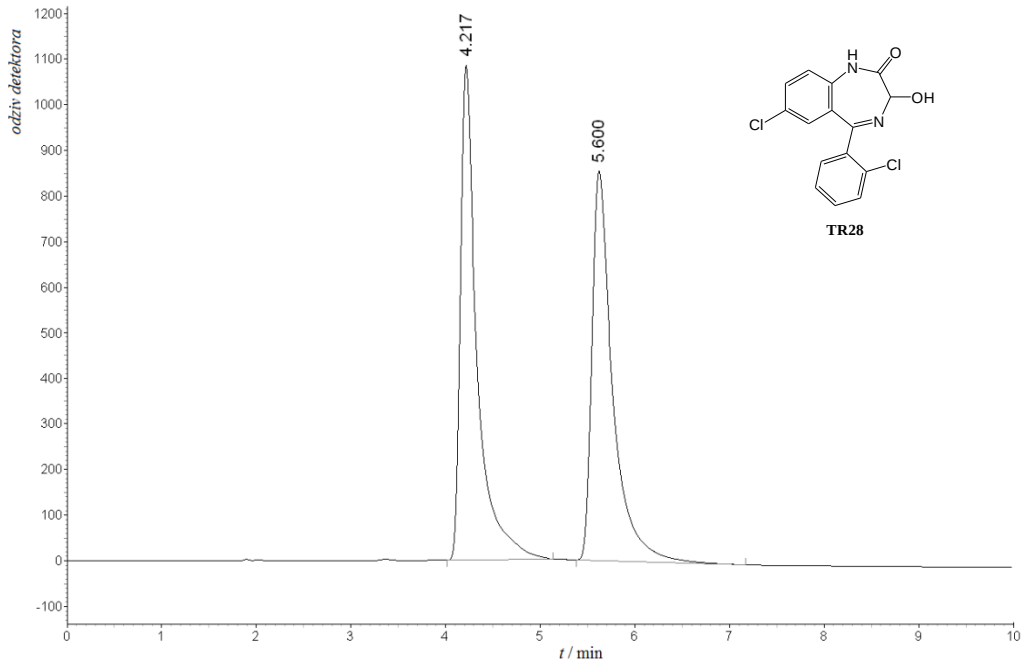
Tablica 16. Rezultati odjeljivanja enantiomera spojeva **TR28** – **TR30** na pripravljenim **KNF-1** – **KNF-9**, Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc; 1 mL/min; 254 nm

		TR28	TR29	TR30
KNF-1	k_2	14,20	9,78	14,34
	α	1,93	1,39	1,31
	R_s	6,38	3,08	3,13
KNF-2	k_2	1,77	1,26	2,50
	α	1,63	1,21	1,15
	R_s	4,40	1,30	1,53
KNF-3	k_2	3,92	3,66	3,89
	α	1,15	1,09	1,00
	R_s	1,06	0,61	0,00
KNF-4	k_2	0,78	0,58	1,16
	α	1,61	1,21	1,18
	R_s	2,49	0,76	1,12
KNF-5	k_2	0,35	0,33	0,53
	α	1,00	1,00	1,00
	R_s	0,00	0,00	0,00

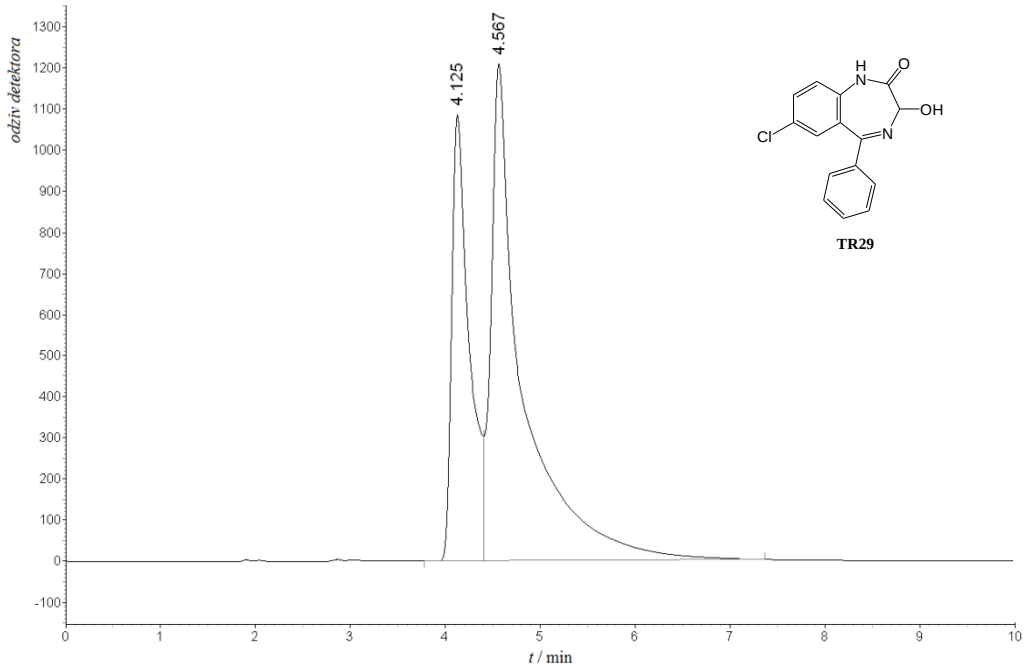
		TR28	TR29	TR30
KNF-6	k_2	5,44	3,13	6,31
	α	2,54	1,59	1,39
	R_s	8,11	4,28	3,87
KNF-7	k_2	6,59	4,27	8,61
	α	2,48	1,59	1,45
	R_s	6,00	1,89	3,02
KNF-8	k_2	1,94	1,45	2,67
	α	1,47	1,20	1,12
	R_s	3,63	1,34	1,24
KNF-9	k_2	2,46	1,82	3,83
	α	1,53	1,17	1,14
	R_s	4,84	1,66	1,53

Zanimljivo je primijetiti kako se na svim kolonama analit **TR30** zadržava najduže, dok se **TR29** zadržava najkraće. Jedina razlika u strukturi između ova dva spoja je prisutnost metilne skupine na položaju 1 kod **TR30** dok je kod **TR29** na tom mjestu NH. Očito ova metilna skupina stvara dodatne interakcije, najvjerojatnije CH-π interakcije, koje utječu na duže zadržavanje spoja na koloni. Međutim, ove interakcije su očito udaljene od kiralnog centra i isključivo akiralne prirode jer kod većine pripravljenih kolona ne utječu na poboljšanu enantioseparaciju.

a)



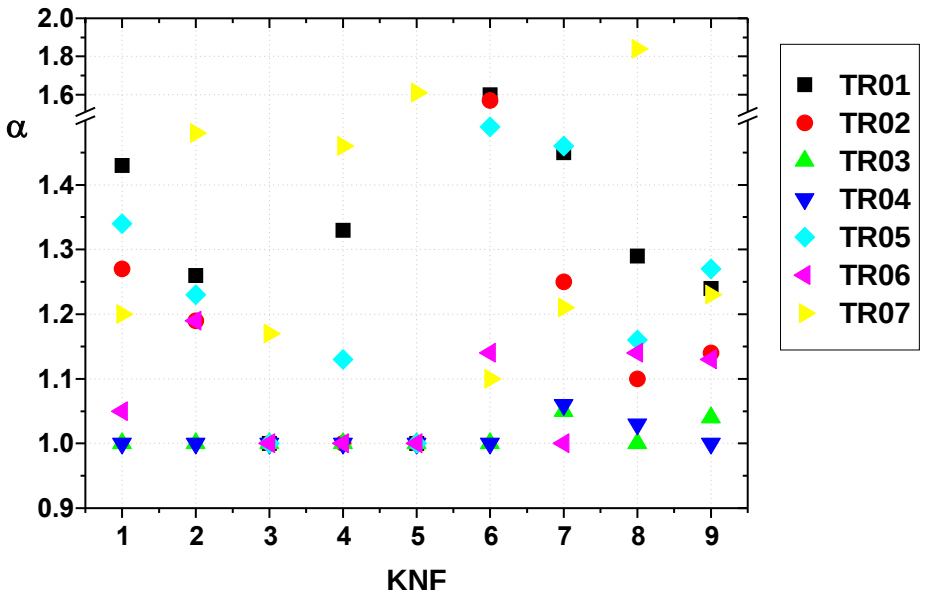
b)



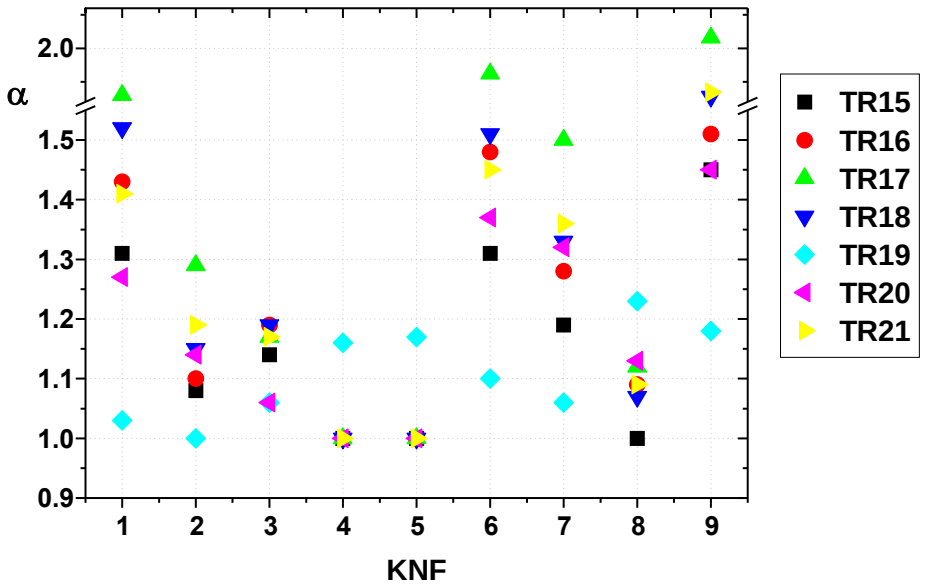
Slika 44. Enantioselektivna separacija: a) **TR28**; b) **TR29**; na **KNF-2;** Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc; 1 mL/min; 254 nm

4.3. Usporedba rezultata odjeljivanja enantiomera na KNF-1 – KNF-9

Kako bi se pregledno usporedili rezultati HPLC evaluacije **KNF-1** – **KNF-9**, oni su grafički prikazani na iduće četiri slike.

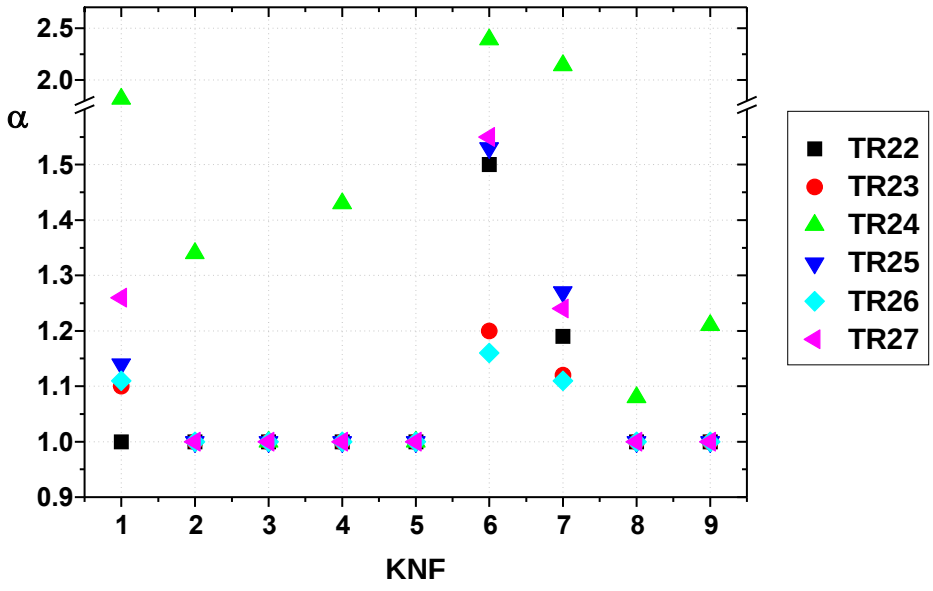


Slika 45. Faktor odjeljivanja enantiomera analita **TR01** – **TR07** na pripravljenim kolonama **KNF-1** – **KNF-9,** *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10



Slika 46. Faktor odjeljivanja enantiomera analita **TR15** – **TR21** na pripravljenim kolonama **KNF-1** – **KNF-9,** *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20

Za odjeljivanje enantiomera spojeva **TR01** – **TR21** najbolje su se pokazale **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7** kao što se vidi na slikama 45 i 46. Kako bismo dobili bolji dojam koliko su pripravljene kolone dobre, potrebno ih je usporediti s komercijalno dostupnim kolonama. Od komercijalnih kolona svakako je najčešće korištena Whelk-O1 koja je pokazala najbolje mogućnosti enantioseparacije na velikom broju racemičnih analita.[24,39] Tako se pokazala dobra i u odjeljivanju enantiomera analita **TR01** (Ψ(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10; α = 2,00), **TR02** (Ψ(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 80 : 20 : 0,5; α = 1,97) i **TR05** (Ψ(heksan, EtOH) = 80 : 20; α = 1,80).[109] Dobivene vrijednosti pripravljenih kolona **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7** su nešto niže, ali su se približile ovoj koloni koja se smatra najboljom KNF četkolikog tipa. Za ova tri analita najbolja se pokazala kolona **KNF-6**. Na komercijalno dostupnoj koloni ULMO razdvojeni su enantiomeri spojeva **TR06** (Ψ(heksan, 2-PrOH, TFA) = 98 : 2 : 0,2; α = 1,24) i **TR07** (Ψ(heksan, 2-PrOH) = 95 : 5; α = 2,02).[109] Pripravljene KNF opet pokazuju nešto niže vrijednosti faktora odjeljivanja. Međutim, treba istaknuti kako su vrijednosti faktora odjeljivanja navedene za kolone Whelk-O1 i ULMO optimirane. Vrijednosti za pripravljene kolone su dobivene samo u jednoj pokretnoj fazi i sastav pokretne faze nije optimiran tako da s pripravljenim KNF još ima prostora za poboljšanje.



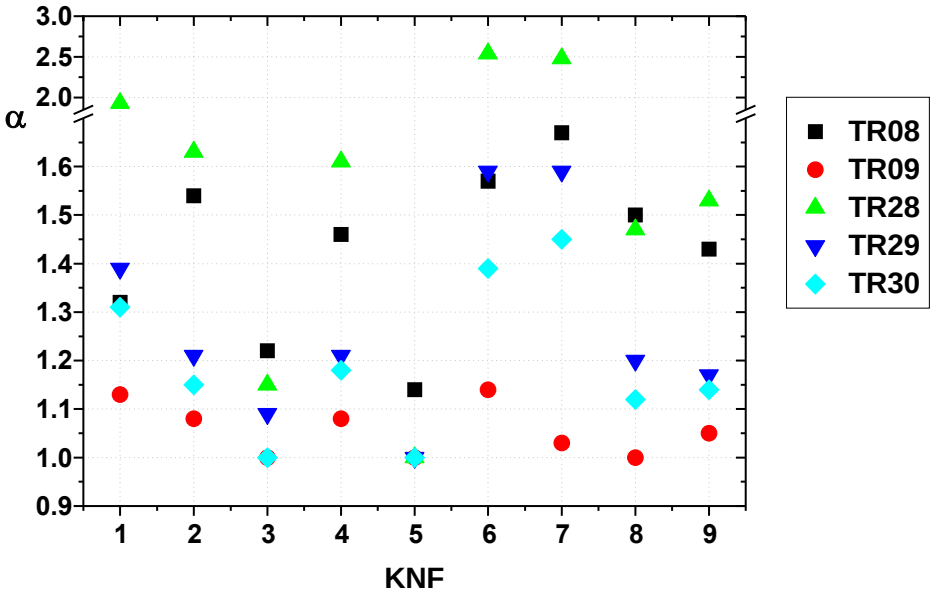
Slika 47. Faktor odjeljivanja enantiomera profena **TR22** – **TR27** na pripravljenim kolonama **KNF-1** – **KNF-9,** Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc

U odjeljivanju enantiomera NSAID spojeva ponovo su se najboljima pokazale **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7**, slika 47. S obzirom na važnost ovih spojeva u farmaceutskoj industriji, mogućnost odjeljivanja njihovih enantiomera je testirana na mnogim komercijalnim i novopripravljenim KNF. Na koloni Whelk-O1 pronađeni su uvjeti za odjeljivanje enantiomera profena **TR22** – **TR27**, tablica 17.[102,109] Usporedbom dobivenih vrijednosti faktora odjeljivanja, jasno je kako su se tri navedene kolone približile vrijednostima koje su dobivene na koloni Whelk-O1. Kolona **KNF-6** za neke NSAID spojeve pokazuje i veće vrijednosti faktora odjeljivanja od Whelk-O1.

Tablica 17. Uvjeti odjeljivanja enantiomera profena **TR22** – **TR27** na koloni Whelk-O1

	Pokretna faza	Protok/ mL min^{-1}	α
Ibuprofen	Ψ(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10 + 0,01 M NH_4OAc	1,5	1,72
Ketoprofen	Ψ(heksan, EtOH) = 90 : 10 + 0,01 M NH_4OAc	1,5	1,32
Naproksen	Ψ(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 60 : 40 : 0,1	1,0	2,03
Flurbiprofen	Ψ(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10 + 0,01 M NH_4OAc	1,5	1,76
Fenoprofen	Ψ(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 98 : 2 : 0,1	1,0	1,66
Suprofen	Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 0,01 M NH_4OAc	2,0	1,27

Za odjeljivanje enantiomera spojeva s benzodiazepinskom strukturom, navedene tri kolone i ovaj put pokazuju najbolje rezultate, slika 48. Kako su benzodiazepinski lijekovi također bitni za farmaceutsku industriju, mogućnost njihove enantioseparacije testirana je na komercijalno dostupnim kolonama. Tako su enantiomeri ova tri spoja razdvojeni na Whelk-O1 koloni i dobivene su vrijednosti: **TR28** (Ψ(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 70 : 30 : 0,1; α = 2,02), **TR29** (Ψ(heksan, 2-PrOH) = 75 : 25 + 0,01 M NH_4OAc; α = 1,56), **TR30** (Ψ(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 80 : 20 : 0,1; α = 1,34).[109] Usporedbom s rezultatima dobivenim na pripravljenim kolonama, može se vidjeti kako kolone **KNF-6** i **KNF-7** pokazuju i veće vrijednosti faktora odjeljivanja od kolone Whelk-O1.



Slika 48. Faktor odjeljivanja enantiomera spojeva s benzodiazepinskom strukturom na pripravljenim kolonama **KNF-1** – **KNF-9**, **TR08** (Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20), **TR09** (Ψ(heksan, 2-PrOH) = 90 : 10), **TR28** – **TR30** Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc

Obradom svih dobivenih rezultata može se zaključiti kako najbolje mogućnosti enantioseparacije testiranih spojeva pokazuju kolone **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7** koje sadrže redom (*S*)-*N*-[1-(1-naftil)propil]-3,5-dinitrobenzamidni, (*S*)-*N*-[1-(4-metil-1-naftil)propil]-3,5-dinitrobenzamidni i (*S*)-*N*-[1-(fenantren-9-il)propil]-3,5-dinitrobenzamidni selektor.

Iz literature su poznati različiti primjeri dobrog odjeljivanja enantiomera određenih racemata na posebno pripravljenim KNF sa specifično dizajniranim selektorima.[20,22,110] Međutim, cilj ovog rada je bila priprava što svestranije KNF. Stoga su rezultati uspoređeni s poznatim rezultatima za kolonu Whelk-O1, koja je općenito priznata kao najsvestranija i najbolja kiralna kolona četkolikog tipa[39,111], a komercijalizirala ju je američka tvrtka Regis Technologies, Inc. Kolone **KNF-1, KNF-6 i KNF-7** u principu odjeljuju iste spojeve kao i Whelk-O1, a u nekim slučajevima pokazuju i bolje rezultate enantioseparacije. Pri tome valja napomenuti da su rezultati za Whelk-O1 iz Regisovog kataloga[109] napravljeni s tehnološki optimiranim kolonama i u optimiranim uvjetima, a za **KNF-1, KNF-6 i KNF-7** to nije slučaj i sigurno se mogu postići bolji rezultati. Posebno se pri tome misli na izbor silikagela gdje postoji veliki izbor materijala različitih proizvođača koji se poprilično razlikuju u

karakteristikama.[112] Ovdje je korišten silikagel Separon SGX, veličine sferičnih čestica 5 μm i veličine pora od 80 Å, proizvođača češke tvrtke Tessek i nisu isprobani drugi materijali te tu postoji još mnogo prostora za poboljšanje.

Ovdje opisane kolone još imaju jednu značajnu prednost pred Whelk-O1. Poznato je da se za pripravu enantiomerno čistog selektora Whelk-O1 koristi kiralna kromatografija koja je male produktivnosti zbog slabe topljivosti spoja.[113] Odjeljivanje enantiomera kod priprave selektora za **KNF-1, KNF-6 i KNF-7** se odvija pomoću dostupne i relativno jeftine lipaze CAL-B pa je takav sintetski postupak mnogo povoljniji. Zbog svega navedenog može se tvrditi da su **KNF-1, KNF-6 i KNF-7** potpuno kompetitivne Whelk-O1 koloni.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Pripravljeno je devet kiralnih nepokretnih faza (**KNF-1** – **KNF-9**) sa (*S*)-*N*-(1-arilpropil)-3,5-dinitrobenzamidnom strukturom kiralnog selektora. Ključni međuprodukti sinteze su enantiomerno čisti alil-aril-amini.

- Racemični alil-aril-amini priređeni su iz odgovarajućih aromatskih aldehida **1** – **9** nizom reakcija koje uključuju: Knoevenagelovu reakciju kojom nastaju nezasićeni esteri **A1** – **A9**, redukciju nastalih estera do nezasićenih alkohola **B1** – **B9**, pripravu 2,2,2-trikloracetimidata **C1** – **C9**, njihovu pregradnju u odgovarajuće amide **D1** – **D9** čijom su hidrolizom dobiveni racemični alil-aril-amini **E1** – **E9**.

- Enzimska rezolucija racemičnih amina provedena je s lipazom B iz *Candide antarctice* u organskom otapalu. Amini kod kojih ne postoje steričke smetnje, 1-(1-naftil)prop-2-en-1-amin (**E1**), 1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-amin (**E2**), 1-(4-metil-1-naftil)prop-2-en-1-amin (**E6**), 1-(fenantren-9-il)prop-2-en-1-amin (**E7**) i 1-(2-Naftil)prop-2-en-1-amin (**E9**), dobiveni su uz izvrsne enantiomerne čistoće koristeći etil-metoksiacetat ili izopropil-acetat kao acilne donore u organskim otapalima metil-*tert*-butil-eteru ili heksanu pri 30 °C.

- Derivatizacijom enantiomerno čistih amina s 3,5-dinitrobenzoil-kloridom dobiveni su odgovarajući selektori (*S*)-*N*-(1-(1-naftil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-1**), (*S*)-*N*-(1-(4-metilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-2**), (*S*)-*N*-(1-(4-metil-1-naftil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-6**), (*S*)-*N*-(1-(fenantren-9-il)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-7**) i (*S*)-*N*-(1-(2-naftil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-9**), koji su kovalentno vezani na silikagel. Nakon silanizacije silikagela heksametildisilazanom dobivene su odgovarajuće kiralne nepokretne faze **KNF-1**, **KNF-2**, **KNF-6**, **KNF-7** i **KNF-9**.

- Amini koje nije bilo moguće dobiti u enantiomerno čistom obliku enzimskom rezolucijom, prevedeni su u odgovarajuće racemične 3,5-dinitrobenzoilne derivate.

Preparativnom kiralnom kromatografijom na četkolikoj kiralnoj koloni **KNF-A** dobiveni su enantiomerno čisti selektori (*S*)-*N*-(1-(3,5-dimetilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-3**), (*S*)-*N*-(1-(2-metilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-4**), (*S*)-*N*-(1-(2,4,6-trimetilfenil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-5**) i (*S*)-*N*-(1-(2-Metil-1-naftil)alil)-3,5-dinitrobenzamid (**KS-8**). Kiralne nepokretne faze **KNF-3**, **KNF-4**, **KNF-5** i **KNF-8** su pripremljene na isti način kao i prethodne.

- Na pripravljenim KNF prvo je analiziran set od 21-og racemičnog analita različitih struktura i funkcionalnih skupina u pokretnoj fazi koja sadrži heksan i 2-propanol (10 % ili 20 %). KNF koje sadrže različito supstituiran benzenski prsten pokazuju najlošije rezultate enantioselektivnog odjeljivanja. Od navedenih KNF, najlošiji rezultati su zabilježeni na **KNF-3** i **KNF-5** koje sadrže 3,5-dimetilfenilni, odnosno 2,4,6-trimetilfenilni prsten. Razlog tome su vjerojatno steričke prepreke koje onemogućuju povoljno smještanje jednog enantiomera i selektora u geometriju koja bi omogućila aromatske interakcije. Zbog toga se analiti ispiru brže i razlučivanje je slabije. KNF koje sadrže veći naftilni ili fenantrilni aromatski sustav pokazuju puno bolje rezultate enantioseparacije. To je u skladu s očekivanjima, budući da takvi aromatski sustavi mogu stvarati jače aromatske interakcije.

- 3,5-Dinitrobenzoilni derivati aminokiselina s izopropilnom zaštitom karboksilne skupine pokazuju nešto drugačije rezultate od ostalih spojeva. Naime, najslabiji rezultati su dobiveni s **KNF-4**, **KNF-5** i **KNF-8** čiji selektori na položaju 2 aromatskog sustava imaju metilni supstituent. Pretpostavka je kako su ove KNF zbog toga rigidnije te se molekule analita ne mogu približiti dovoljno kako bi ostvarile povoljne interakcije s jednim enantiomerom.

- Nesteroidni protuupalni lijekovi **TR22** – **TR27** su analizirani na pripravljenim kolonama u dvije pokretne faze – prva kao aditiv sadrži octenu kiselinu, dok druga sadrži neutralnu sol amonijev acetat. **KNF-3** i **KNF-5** ne pokazuju odjeljivanje enantiomera niti jednog od navedenih analita. Sve ostale KNF odjeljuju enantiomere naproksena (**TR24**), a **KNF-1** i **KNF-6** pokazuju barem djeomično odjeljivanje enantiomera i preostalih nesteroidnih protuupalnih lijekova. Rezultati dobiveni u pokretnoj fazi Ψ(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc su u velikoj mjeri

bolji nego rezultati enantioselektivne separacije u pokretnoj fazi *Ψ*(heksan, 2-PrOH, CH_3COOH) = 90 : 10 : 0,1. Na **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7** su dobivena dobra razlučivanja za gotovo sve spojeve iz serije.

- Pripremljene KNF vrlo dobro odjeljuju enantiomere 3-hidroksibenzodiazepinskih lijekova u pokretnoj fazi *Ψ*(heksan, 2-PrOH) = 80 : 20 + 1 g dm^{-3} NH_4OAc. Najlošije rezultate enantioseparacije pokazuje **KNF-5,** kao što je bio slučaj i u prethodnim analizama. Na preostalim kolonama najbolje se odjeljuje lorazepam (**TR28**) koji ima supstituent klora na položaju 2' aromatskog sustava. Na svim kolonama se najduže zadržava temazepam (**TR30**) koji ima metilni supstituent na položaju 1. Metilna skupina vjerojatno stvara CH-π interakcije koje utječu na duže zadržavanje analita na koloni.

- Od svih pripremljenih KNF, najbolje rezultate za gotovo sve testirane analite su pokazale **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7** koje sadrže redom 1-naftilni, 4-metil-1-naftilni i 9-fenantrilni supstituent. To su veći aromatski sustavi koji mogu stvarati jače aromatske π-π i CH-π interakcije, a ne sadrže supstituente koji bi mogli sterički ometati povoljno smještanje molekula analita i selektora KNF.

- Usporedbom rezultata odjeljivanja enantiomera testiranih analita na pripravljenim KNF s komercijalno dostupnom kolonom Whelk-O1 može se zaključiti kako **KNF-1**, **KNF-6** i **KNF-7** pokazuju sposobnost enantioseparacije usporedivu s tom najsvestranijom i najčešće korištenom KNF četkolikog tipa.

§ 6. POPIS KRATICA

AcOH	Octena kiselina
CAL-B	*Candida antarctica* lipaza B
CD	Cirkularni dikroizam
CDA	Kiralni derivatizirajući agens
CSA	Kiralni solvatirajući agens
DBU	1,8-Diazabiciklo[5.4.0]undeka-7-en
DCM	Diklormetan
DIBAL-H	Diizobutilamonijev hidrid
DKR	Dinamička kinetička rezolucija
DMAP	4-Dimetilaminopiridin
DMF	Dimetilformamid
DNB	Dinitrobenzoil
EMA	Etil-metoksiacetat
EtOAc	Etil-acetat
GC	Plinska kromatografija
HMDS	Heksametildisilazan
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
KNF	Kiralna nepokretna faza
KR	Kinetička rezolucija
MTBE	Metil-*tert*-butil-eter
NSAID	Nesteroidni protuupalni lijekovi
2-PrOH	2-Propanol
i-PrOAc	Izopropil-acetat
SMB	Metoda prividnog gibanja čestica
THF	Tetrahidrofuran
TMS	Tetrametilsilan
UHPLC	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. H. Y. Aboul-Enein, I. W. Wainer, *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1997.
2. D. T. Witte, K. Ensing, J.-P. Franke, R. A. De Zeeuw, *Pharm. World Sci.* **15** (1993) 10-16.
3. O. McConnell, A. Bach II, C. Balibar, N. Byrne, Y. Cai, G. Carter, M. Chlenov, L. Di, K. Fan, I. Goljer, Y. He, D. Herold, M. Kagan, E. Kerns, F. Koehn, C. Kraml, V. Marathias, B. Marquez, L. McDonald, L. Nogle, C. Petucci, G. Schlingmann, G. Tawa, M. Tischler, R.T. Williamson, A. Sutherland, W. Watts, M. Young, M.-Y. Zhang, Y. Zhang, D. Zhou, D. Ho, *Chirality* **19** (2007) 658-682.
4. M. Raban, K. Mislow, *Tetrahedron Lett*. (1965) 4249-4253.
5. W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner, B. C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc*. **103** (1981) 3964-3966.
6. T. J. Ward, K. D. Ward, *Anal. Chem.* **82** (2010) 4712-4722.
7. D. Kotoni, A. Ciogli, I. D'Acquarica, J. Kocergin, T. Szczerba, H. Ritchie, C. Villani, F. Gasparrini, *J. Chromatogr. A* **1269** (2012) 226-241.
8. C. J. Welch, *J. Chromatogr. A* **666** (1994) 3-26.
9. V. Šunjić, *Croat. Chem. Acta* **82** (2009) 503-530.
10. D. Moslavac Forjan, I. Gazić, V. Vinković, *Chirality* **19** (2007) 446-452.
11. E. Juaristi, *Introduction to Stereochemistry and Conformational Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.
12. R. S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, *Experientia* **12** (1956) 81-94.
13. J. M. Bijvoet, A. F. Peerdeman, A. J. Van Bommel, *Nature* **168** (1951) 271-272.
14. G.-Q. Lin, Y.-M. Li, A. S. C. Chan, *Principles and Applications of Asymmetric Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001.
15. J. D. Morrison, H. S. Mosher, *Asymmetric Organic Reactions*, Prentice-Hall, New Jersey, 1971.

16. A. Horeau, J. P. Guette, *Tetrahedron* **30** (1974) 1923-1931.
17. T. J. Wenzel, *Discrimination of Chiral Compounds Using NMR Spectroscopy*, Wiley Interscience, New York, 2007.
18. G. Carbonara, A. Carocci, G. Fracchiolla, C. Franchini, G. Lentini, F. Loiodice, P. Tortorella, *Arkivoc* **5** (2004) 5-25.
19. V. Schuring, *Trends Anal. Chem.* **21** (2002) 647-661.
20. S. Ahuja, *Chromatography and Separation Science*, Elsevier Science, San Diego, 2003.
21. A. J. Martin, R. L. Synge, *Biochem. J.* **35** (1941) 1358-1366.
22. S. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation*, Ellis Horwood, New York, 1991.
23. M. W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2006.
24. M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 814-856.
25. L. H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* **27** (1933) 1257-1266.
26. A. G. Ogston, *Nature* **162** (1948) 963.
27. C. E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* **132** (1952) 3940-3942.
28. W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky, *Chem. Rev.* **89** (1989) 347-362.
29. G. M. Henderson, H. G. Rule, *J. Chem. Soc.* (1939) 1568-1573.
30. F. Mikeš, G. Boshart, *J. Chromatogr. A* **149** (1978) 455-464.
31. W. H. Pirkle, D. W. House, *J. Org. Chem.* **44** (1979) 1957-1960.
32. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A.* **906** (2001) 35–50.
33. C. J. Welch, *J. Chromatogr. A* **666** (1994) 3-26.
34. Y. Dobashi, S. Hara, *J. Org. Chem.* **52** (1987) 2409-2496.
35. C. C. Sweeley, R. Bently, M. Makita, W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2497-2507.
36. R. O. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 1707-1710.
37. L. Birkofer, A. Ritter, *Angew. Chem. Int. Edit.* **4** (1965) 417-429.
38. V. Vinković, D. Kontrec, V. Šunjić, L. Navarini, F. Zanetti, O. Azzolina, *Chirality* **13** (2001) 581-587.
39. A. Del Rio, J. M. Hayes, M. Stein, P. Piras, C. Roussel, *Chirality* **16** (2004) S1-S11.

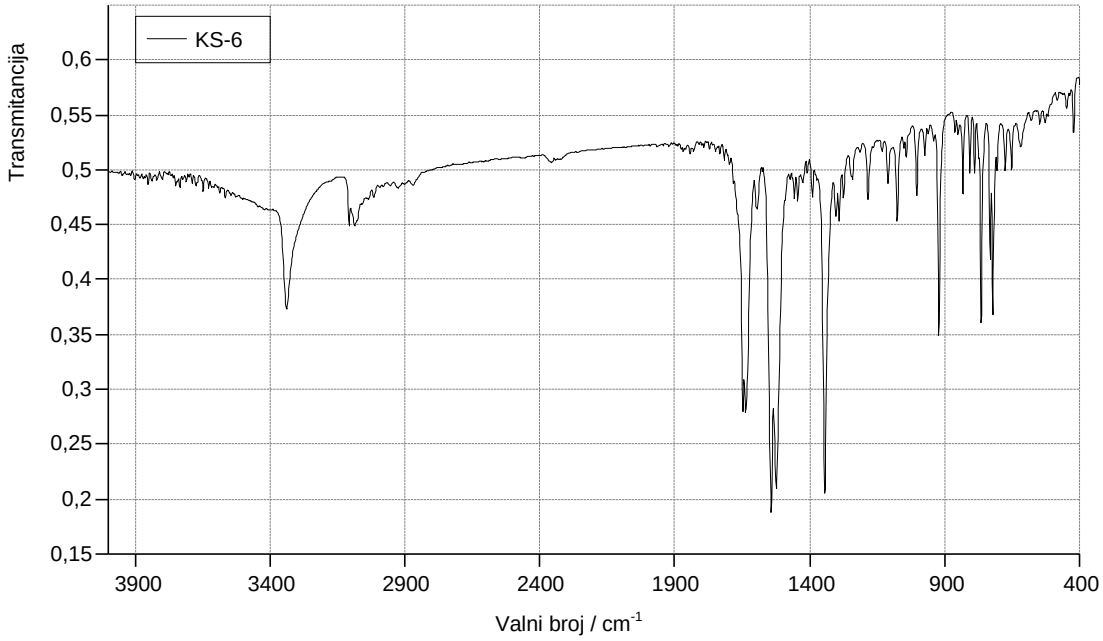
40. M. E. Koscho, W. H. Pirkle, *Tetrahedron: Asymmetry* **16** (2005) 3345-3351.
41. A. De Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gélébart, F. David, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* **1127** (2006) 60-69.
42. I. Halász, R. Endele, J. Asshauer, *J. Chromatogr.* **112** (1975) 37-60.
43. a) J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **69** (1997) 983-989.; b) N. Wu, J. A. Lippert, M. L. Lee *J. Chromatogr. A* **911** (2001) 1-12.
44. G. Cancelliere, A. Ciogli, I. D'Acquarica, F. Gasparrini, J. Kocergin, D. Misiti, M. Pierini, H. Ritchie, P. Simone, C. Villani, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 990-999.
45. D. Kotoni, A. Ciogli, I. D'Acquarica, J. Kocergin, T. Szczerba, H. Ritchie, C. Villani, F. Gasparrini, *J. Chromatogr A* **1269** (2012) 226-241.
46. T. Ikai, Y. Okamoto, *Chem. Rev.* **109** (2009) 6077-6101.
47. X. Chem, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Pure Appl. Chem.* **79** (2007) 1561-1573.
48. a) Y. Okamoto, R. Aburatani, S. Miura, K. Hatada, *J. Liq. Chromatogr.* **10** (1987) 1613-1628.; b) T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto, *Polym. J.* **38** (2006) 91-108.
49. I. Gazić, A. Bosak, G. Šinko, V. Vinković, Z. Kovarik, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006) 1513-1519.
50. P. Franco, M. Schaeffer, T. Zhang, D. Heckmann, *Chim. Oggi* (2004) 28-30.
51. H. Schmidt-Traub, *Preparative Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
52. D. B. Broughton, C. G. Gerhold, *US Patent* 2,985,589 (1961).
53. V. Šunjić, D. Franić, D. Kontrec, M. Roje, *Kem. Ind.* **59** (2010) 283-294.
54. M. Ahmed, T. Kelly, A. Ghanem, *Tetrahedron* **68** (2012) 6781-6802.
55. C. M. Clouthierz, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 1585-1605.
56. E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **27** (1894) 2985-2993.
57. *Enzyme Nomenclature,* International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, San Diego, 1992.
58. K. Drauz, H. Groger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, New York, 2012.
59. F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **60** (2004) 501-519.
60. V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **348** (2006) 797-812.
61. J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **2** (1994) 293-308.
62. I. Gill, R. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 705-709.

63. M. J. García, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **50** (1994) 6935-6940.
64. S. Conde, P. López-Serrano, A. Martínez, *Tetrahedron: Asymmetry* **11** (2000) 2537-2545.
65. O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun*. (2004) 1724-1725.
66. M. López-García, I. Alfonso, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **14** (2003) 603-609.
67. D. Rotticci, F. Hæffner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, *J. Mol. Catal. B: Enzym* **5** (1998) 267-272.
68. N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S. M. S. Chauhan, *Tetrahedron* **61** (2005) 1015-1060.
69. A. Luna, I. Alfonso, V. Gotor, *Org. Lett* **4** (2002) 3627-3629.
70. E. García-Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **11** (2000) 1459-1463.
71. J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* (2010) 999-1015.
72. A. N. Parvulescu, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, *Adv. Synth. Catal.* **350** (2008) 113-121.
73. A. Ranogajec, D. Kontrec, V. Vinković, V. Šunjić, *J. Liq Chromatogr., Relat. Technol.* **26** (2003) 63-83.
74. *European Pharmacopoeia*, European Directorate for the Quality of Medicines (*EDQM*) of the Council of Europe, Strasbourg, 2010.
75. a) E. Knoevenagel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **31** (1898) 2596-2619.; b) O. Doebner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **35** (1902) 1136-1174.
76. A. Galat, *J. Am. Chem. Soc*. **68** (1946) 376-377.
77. B. List, A. Doehring, M. T. Hechavarria Fonseca, A. Job, R. Rios Torres, *Tetrahedron* **62** (2006) 476-482.
78. L. E. Overman, N. E. Carpenter, *Organic Reactions*, Vol. 66, John Wiley & Sons Inc., New York, 2005.
79. L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc*. **96** (1974) 597-599.
80. T. K. Hollis, L. E. Overman, *J. Organomet. Chem.* **576** (1999) 290-299.
81. A. M. Stevens, C. J. Richards, *Organometallics* **18** (1999) 1346-1348.
82. C. E. Anderson, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 12412-12413.
83. G. Landek, Sveučilište u Zagrebu, Doktorska disertacija, 2008.

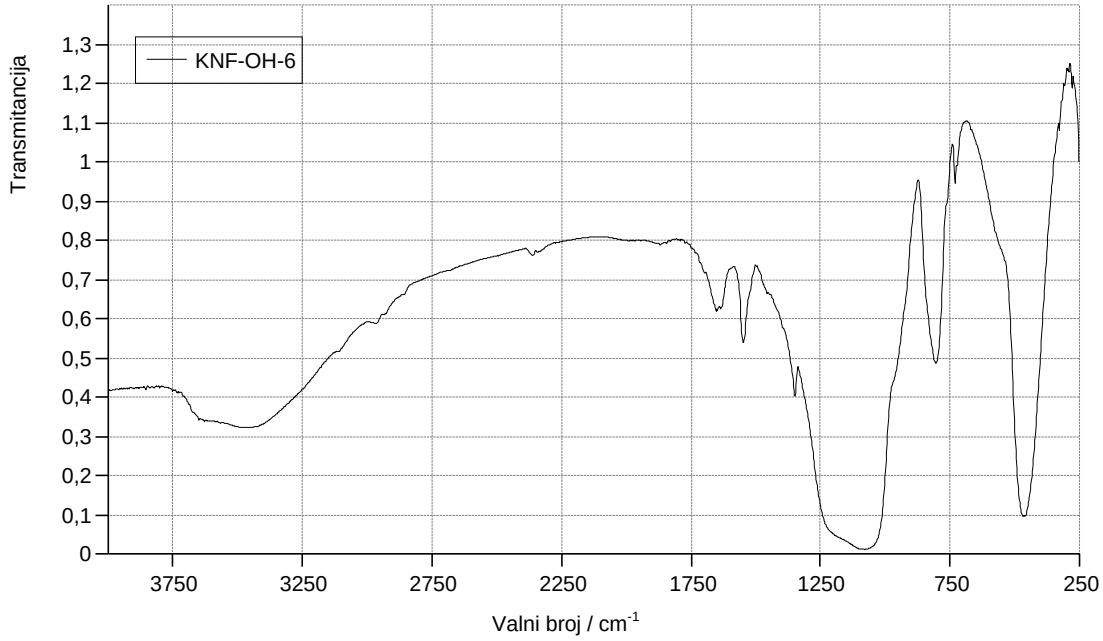
84. A. Knežević, G. Landek, I. Dokli, V. Vinković, *Tetrahedron: Asymmetry* **22** (2011) 936-941.
85. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
86. C. Wolf, L. Pranatharthiharan, E. C. Volpe, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 3287-3290.
87. T. Ihara, Y. Sugimoto, M. Asada, T. Nakagama, T. Hobo, Rebolledo, *J. Chromatogr. A* **694** (1995) 49-56.
88. J. L. Speier, J. A. Webster, G. H. Barnes, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 974-979.
89. M. H. Hyun, Y. J. Cho, J.-J. Ryoo, K. K. Jyung, G. S. Heo, *J. Chromatogr. A* **696** (1995) 173-183.
90. W. H. Pirkle, R. S. Readnour, *Chromatographia* **31** (1991) 129-132.
91. D. Kontrec, Sveučilište u Zagrebu, Doktorska disertacija, 1999.
92. M. O. Sinnokrot, C. D. Sherrill, *J. Phys. Chem. A* **108** (2004) 10200-10207.
93. M. Rubeš, O. Bludský, P. Nachtigall, *ChemPhysChem* **9** (2008) 1702-1708.
94. E. Yurtsever, *J. Phys. Chem. A* **113** (2009) 924-930.
95. A. Ghysels, M. Vandichel, T. Verstraelen, M. A. van der Veen, D. E. De Vos, M. Waroquier, V. Van Speybroeck, *Theor. Chem. Acc.* **131** (2012) 1234.
96. S. Tsuzuki, *Annu. Rep. Prog. Chem. C* **108** (2012) 69-95.
97. M. J. Plevin, D. L. Bryce, J. Boisbouvier, *Nature Chem.* **2** (2010) 466-471.
98. S. Morita, A. Fujii, N. Mikami, S. Tsuzuki, *J. Phys. Chem. A* **110** (2006) 10583-10590.
99. S. Tsuzuki, K. Honda, A. Fujii, T. Uchimaru, M. Mikami, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10** (2008) 2860-2865.
100. L. S. Santos, *Reactive Intermediates: MS Investigations in Solution*, Wiley-VCH, Weinheim, 2010.
101. *LC-MS Mobile Phase Additives – Tips & Tricks*, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, 2008.
102. T. J. Szczerba, Regis Technologies, Inc., neobjavljeni rezultati
103. K. Sarmini, E. Kenndler, *J. Biochem. Biophys. Methods* **38** (1999) 123-137.
104. N. Mohan, K. P. Vijayalakshmi, N. Koga, C. H. Suresh, *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 2874-2882.
105. J. M. Monti, S. R. Pandi-Perumal, H. Möhler, *GABA and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*, Springer, Basel, 2010.

106. G. P. Moss, *Pure Appl. Chem.* **70** (1998) 143-216.
107. J. Barrett, W. F. Smyth, I. E. Davidson, *J. Pharm. Pharmacol.* **25** (1973) 387-393.
108. E. L. Eliel, S. H. Wilen, L. N. Mander, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1994.
109. *Chiral Application Guide VI*, Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL, 2007.
110. D. Kontrec, V. Vinković, M. Šepelj, V. Šunjić, *Croat. Chem. Acta* **77** (2004) 31-51.
111. C. F. Zhao, N. M. Cann, *Anal. Chem.* **80** (2008) 2426-2438.
112. a) P. K. Jal, S. Patel, B. K. Mishra, *Talanta* **62** (2004) 1005-1028.; b) J. J. Kirkland, J. J. DeStefano, *J. Chromatogr. A* **1126** (2006) 50-57.
113. W. H. Pirkle, C. J. Welch, B. R. Lamm, *US Patent* 5,256,293 (1993).

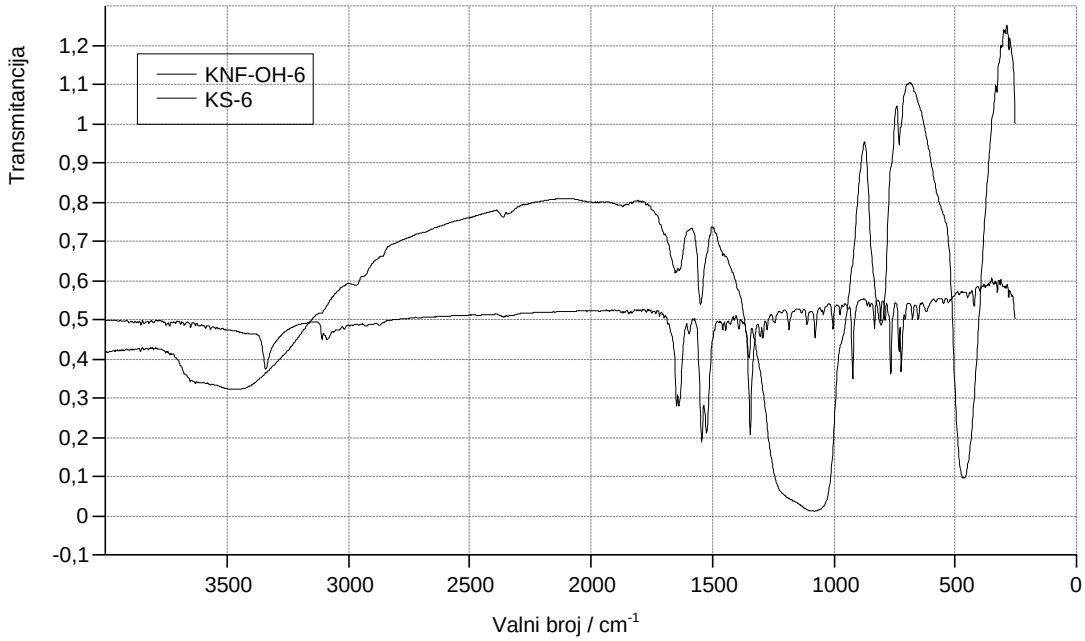
§ 8. DODATAK



Slika D1. IR spektar (*S*)-*N*-[1-(4-Metil-1-naftil)alil]-3,5-dinitrobenzamida (**KS-6**)



Slika D2. IR spektar **KNF-6-OH**



Slika D3. IR spektri **KS-6** i **KNF-OH-6**

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime	Anamarija Knežević
e-mail	amiskov@irb.hr
Adresa	Ulica grada Chicaga 19, 10000 Zagreb
Adresa (posao)	Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb
Telefon	091 8812 518
Telefon (posao)	+385 1 4561 029
Datum rođenja	24. rujna 1985.
Mjesto rođenja	Slavonski Brod

Obrazovanje:

2008 – 2013.	Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij kemije, Kemijski odsjek Prirodoslovno–matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu
2004 – 2008.	Dodiplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu Prosjek ocjena: 4,976 Diplomski rad: „Fotokemija nitrozobenzena u micelarnoj otopini SDS-a“, mentor: prof. dr. sc. Hrvoj Vančik
2000 – 2004.	Gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod

Radno iskustvo:

2009 -	Znanstveni novak, asistent u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković
27.03.2009.	*naslovno* suradničko zvanje asistent u Zavodu za organsku kemiju pri Kemijskom odsjeku PMF-a u trajanju od jedne godine *bez zasnivanja radnog odnosa*

Publikacije:

1. Knežević, Anamarija; Landek, Goran; Dokli, Irena; Vinković, Vladimir; **Efficient enzymatic approach to (S)-1-aryl-allylamines**, *Tetrahedron: asymmetry* **22** (2011) 936-941. (članak, znanstveni).
2. Knežević, Anamarija; Medančić, Tina; Milovac, Srđan; Biljan, Ivana; Halasz, Ivan; Vančik, Hrvoj; **Photothermal Reactions of Nitrosobenzene and Halonitrosobenzenes in Solid-state**, *Croatica chemica acta* **84** (2011) 21-24. (članak, znanstveni).

Konferencije:

1. Knežević, Anamarija; Vinković, Vladimir.
   Synthesis and evaluation of chiral stationary phases containing N-(1-arylpropyl)-3, 5-dinitrobenzamide selector
   23. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, postersko priopćenje, Osijek, 2013.
2. Maraković, Nikola; Knežević, Anamarija; Šinko, Goran; Vinković, Vladimir.
   New Method for Preparation of N-Substituted 2-(Hydroxyimino)Acetamides
   23. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, postersko priopćenje, Osijek, 2013.
3. Knežević, Anamarija; Landek, Goran; Vinković, Vladimir.
   Nove kiralne nepokretne faze temeljene na N-(1-arilpropil)-3,5-dinitrobenzamidnom selektoru
   22. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, postersko priopćenje, Zagreb, 2011.
4. Knežević, Anamarija; Vinković, Vladimir.
   Nove kiralne nepokretne faze s usavršenim enantioseparacijskim sposobnostima
   VIII. Susret mladih kemijskih inženjera, usmeno priopćenje, Zagreb, 2010.
5. Milovac, Srđan; Mišković, Anamarija; Medančić, Tina; Vančik, Hrvoj.
   Foto-termičke reakcije derivata nitrozobenzena u čvrstom stanju
   XXI. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, postersko priopćenje, Trogir, 2009.