

NMR studija izotopnih H/D izmjena kod 1,1-dimetilpropargilnog alkohola

Brajčić, Tonka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:679167>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Tonka Brajčić

**NMR studija izotopnih H/D izmjena
kod 1,1-dimetil-propargilnog alkohola**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Organska kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Institutu za fiziku u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada u području organske kemije.

Zahvale na gostoprimstvu Institutu za fiziku (IF) u Zagrebu u čijim se prostorijama trenutno nalazi NMR instrument (Varian INOVA 400 spektrometar), posebice Kriogenom centru IF-a koji osigurava podršku u recikliranju i ukapljivanju helija.

Rad je dio projekta „Kemijska sudbina zabrinjavajućih farmaceutika u okolišu: eksperimentalno i računalno istraživanje produkata razgradnje i njihovih ekotoksikoloških svojstava“ (HRZZ-IP-2022-10-2634 Pharma-Eco) i „Jačanje znanstveno-istraživačkih i inovacijskih kapaciteta Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (FarmInova)“ te je financiran iz Europskoga fonda za regionalni razvoj (KK.01.1.1.02.0021).

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i vjeri u mene sve ove godine.

Posebno hvala mojoj majci na svemu.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
3. MATERIJALI I METODE	9
4. REZULTATI I RASPRAVA	11
5. ZAKLJUČCI	22
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	22
7. LITERATURA	24
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	26
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	29
10. BASIC DOCUMENTATION CARD	30

1. UVOD

Deuterij (^2H) je stabilan, neradioaktivan izotop vodika koji u usporedbi s običnim vodikom (^1H) ima dvostruko veću atomsku masu i manju frekvenciju vibracijskog rastezanja C–D veze. Posljedično tome, deuterij ima nižu energiju osnovnog stanja te veću energiju disocijacije veze u odnosu na vodik (Li i sur., 2022). Zbog ovih svojstava C–D veze, molekule obilježene deuterijem primarno su se koristile u istraživanjima kinetičkih izotopskih učinaka (KIE) s ciljem razjašnjavanja reakcijskih mehanizama, no kasnije je otkriveno značenje deuteriranja u farmaceutskoj kemiji (Li i sur., 2022; Prakash i sur., 2022). Ugradnjom atoma deuterija u molekule lijeka može doći do promjene svojstava apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja tog lijeka, stoga su brojni kandidati za lijekove s deuterijem ušli u faze kliničkih ispitivanja (Li i sur., 2022).

Deuterirani spojevi često pokazuju poboljšane farmakokinetičke profile i manju toksičnost uz zadržavanje svojih farmakodinamičkih svojstava (Tarrach i sur., 2023). Spojevi koje karakteriziraju C–H veze sklone su biološkoj razgradnji koja se uglavnom odvija u jetri (Prakash i sur., 2022). Zbog jačih C–D veza u usporedbi s C–H vezama, deuteriranje može značajno usporiti metabolizam spojeva. Zahvaljujući saznanju da bi se ugradnjom ^2H mogla povećati bioraspoloživost lijekova i odgoditi metabolička razgradnja, razvijeni su različiti deuterirani farmakofori s poboljšanom biostabilnošću i farmakokinetikom (Tarrach i sur., 2023; Prakash i sur., 2022).

S vremenom su deuterirane kemikalije postale nezamjenjive u farmaceutskom inženjerstvu, znanosti o materijalima i sintetskoj kemiji (Li i sur., 2022). Mehanistička istraživanja reakcijskih putova i medicinska kemija ključna su područja koja zahtijevaju deuterirane spojeve. Izotopna izmjena također igra ključnu ulogu u karakterizaciji organskih struktura spektroskopskim tehnikama kao što su NMR, IR i masena spektroskopija (Prakash i sur., 2022).

2017. godine FDA (Food and Drug Administration) je odobrila prvi deuterirani lijek, deutetrabenazin, indiciran za liječenje odraslih pacijenata s tardivnom diskinezijom povezanom s Huntingtonovom bolešću (Li i sur., 2022; Prakash i sur., 2022). Ovaj lijek ima

poboljšana farmakokinetička svojstva u usporedbi sa svojim nedeuteriranim izotopomerom (Prakash i sur., 2022).

Također, razvijeni su i deuterirani analozi prazikvantela, antihelmintika, koji imaju visoku učinkovitost u liječenju zaraznih bolesti uzrokovanih šistosomama i jetrenim metiljima (Prakash i sur., 2022).

Deuteriranje molekula ciklosporina dovodi do promijenjenih fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava u vidu povećanja potencije i stabilnosti, smanjenja toksičnosti te sporijeg metabolizma lijeka, što je korisno u liječenju psorijatičnog artritisa, aplastične anemije i relapsirajućeg polihondritisa (Prakash i sur., 2022).

Nadalje, deuterirani pioglitazon koristi se za liječenje bolesti poput šećerne bolesti tipa 2 ili nealkoholnog steatohepatitisa, a deuterirani triazolopiridazin koristan je u liječenju ili prevenciji bolesti i poremećaja središnjeg živčanog sustava uključujući anksioznost, konvulzije, kao i bol povezanu s migrenom (Prakash i sur., 2022).

Privučeni važnošću deuteriranih spojeva, kemičari su proteklih nekoliko desetljeća uložili mnogo truda u funkcionalizaciju organskih supstrata u rasponu od jednostavnih aminokiselina do složenih prirodnih proizvoda (Prakash i sur., 2022). Razvijeni su različiti načini ugradnje deuterija poput reakcija u kojima se kao katalizatori upotrebljavaju jake kiseline i baze te reakcija u kojima izotopsku izmjenu kataliziraju prijelazni metali (Li i sur., 2022; Kumar i sur., 2021). Također, razvijen je širok raspon organometalnih katalizatora koji omogućuju jednostavno stvaranje C–D veze (Prakash i sur., 2022).

Spojevi obilježeni deuterijem također se mogu sintetizirati korištenjem klasičnih transformacija u višestupanjskoj sintezi kao što je obrada s D₂ plinom ili reakcija s metalnim deuteridom. Međutim, takve strategije zahtijevaju složene pripreme početnih materijala zbog čega nerijetko dolazi do suvišnih reakcijskih koraka i lošeg iskorištenja (Prakash i sur., 2022).

Deuterirani terminalni alkini posebno su vrijedni jer je riječ o prekursorima niza deuteriranih molekula (Tarrach i sur., 2023). Upotreba acetilenske (etinilne) skupine u medicinskoj kemiji započela je 1959. godine, a od tada se naširoko iskorištava u otkrivanju i razvoju lijekova, te kao struktura širokog raspona terapijski ciljnih proteina kao što su MAO, tirozin kinaze, beta sekretaza 1, steroidni receptori, HIV-1 RT i drugi. Nadalje, spomenuta funkcionalna skupina

uspješno je korištena za oponašanje strukturnih i funkcionalnih svojstava širokog raspona skupina, uključujući klor, jod, karbonil, karboksamid, eten, ciklopropil i fenil. Acetilen je pronašao svoju primjenu i u razvoju biokonjugata, biosenzora te za ispitivanje ciljnih proteina, nukleotida ili in situ cijelog organizma. Zbog relativne lakoće umetanja acetilenske skupine u složene molekule, sve je raširenije njezino uključivanje u biološke sonde i terapijske agense. (Talele, 2020).

Broj klinički korisnih molekula koje sadrže alkine je u porastu, a zbog mnogih komercijalno dostupnih gradivnih blokova, lakih metoda za njihovu konstrukciju i njihove korisnosti u kemijskoj biologiji, očekuje se da će njihova upotreba rasti (Talele, 2020).

Tablica 1 prikazuje neke od prethodnih načina deuteriranja alkina opisanih u nastavku (**A – F**), ali i reakciju kojom se bavi ovaj rad (**G**).

Cintrat i sur., (2001) predložili su metodologiju za izotopsku izmjenu terminalnog alkina u prisutnosti jake baze BuLi i THF te 9-[²H]-9-fenilfluorena (9-[²H]-9-PhFl) kao donora deuterija pri temperaturi od -78°C (Tablica 1, **A**).

Potom, Sabot i sur., (2007) opisali su učinkovitu metodu H/D izmjene za kisele supstrate u CDCl₃ kao izvoru deuterija i kao otapalu, uz dodatak 10 mol % triazabiciklodecena (TBD) kao katalizatora pri sobnoj temperaturi (Tablica 1, **B**). Optimizirani, blagi uvjeti bili su kompatibilni s osjetljivim funkcionalnim skupinama i omogućili su kemoselektivno deuteriranje ketona preko estera. Uz to, TBD je pokazao pogodna svojstva zahvaljujući njegovoj visokoj pK_a vrijednosti i prisutnosti labilnog protona u strukturi (Sabot i sur., 2007).

Bew i sur., (2012) razvili su metodu blagog deuteriranja terminalnih alkina pod bazičnim reakcijskim uvjetima u prisutnosti K₂CO₃ u miješanom otapalu D₂O/CH₃CN (Tablica 1, **C**). Terminalno deuteriranje alkina odvija se brzo i potpuno kroz nekoliko minuta pri sobnoj temperaturi (Bew i sur., 2012).

Nadalje, Yamada i sur., (2015) proveli su blago i učinkovito deuteriranje terminalnih monosupstituiranih alkina u prisutnosti bazične anionske izmjenjivačke smole, WA30, u teškoj vodi na 25°C (Tablica 1, **D**). WA30 polistirenski je polimer koji nosi tercijarni aaminski ostatak na aromatskim jezgrama te se može jednostavno ukloniti jednostavnim filtriranjem i opetovano koristiti bez gubitka aktivnosti katalizatora. Korišteni uljasti supstrati uspješno su

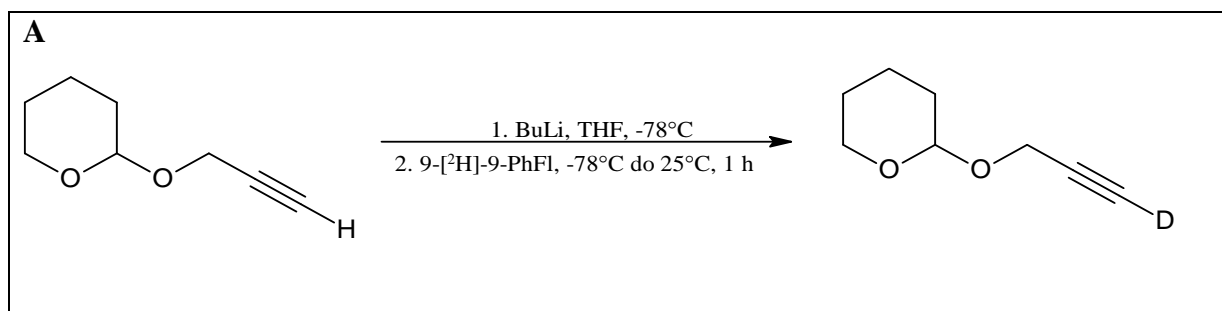
deuterirani u D₂O, dok se deuteriranje ubrzalo dodatkom male količine suotapala, poput toluena i AcOEt (Yamada i sur., 2015).

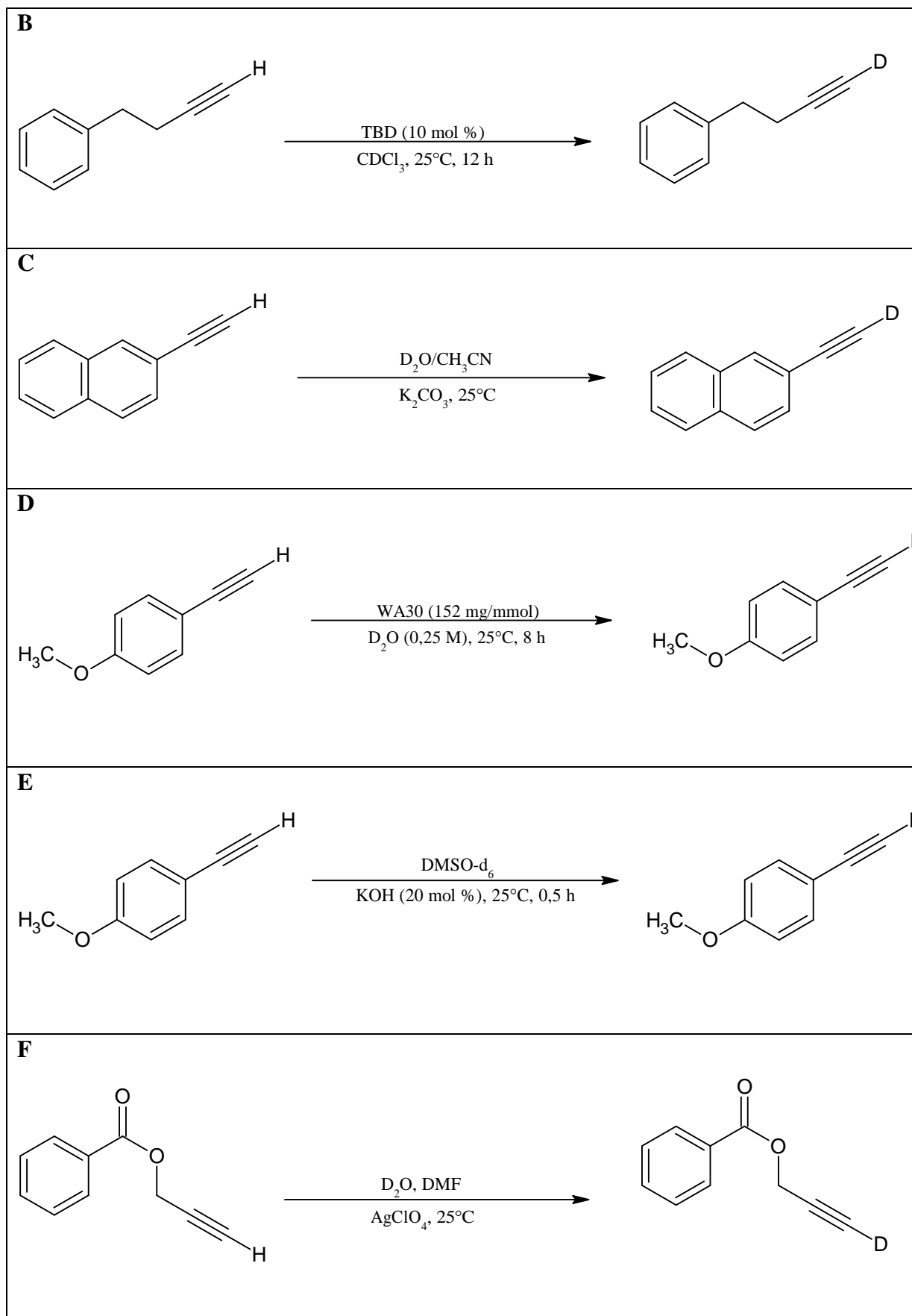
Godinu kasnije, Chatterjee i Gunanathan (2016) demonstrirali su učinkovitu katalitičku metodu za sintezu monodeuteriranih terminalnih alkina korištenjem deuterijevog oksida, najjeftinijeg izotopskog izvora, te rutenija kao katalizatora. Spomenuta transformacija koristila je nisko opterećenje komercijalno dostupnog Ru(II) katalizatora, stoga se pokazala jednostavnom i ekološki prihvatljivom (Chatterjee i Gunanathan, 2016).

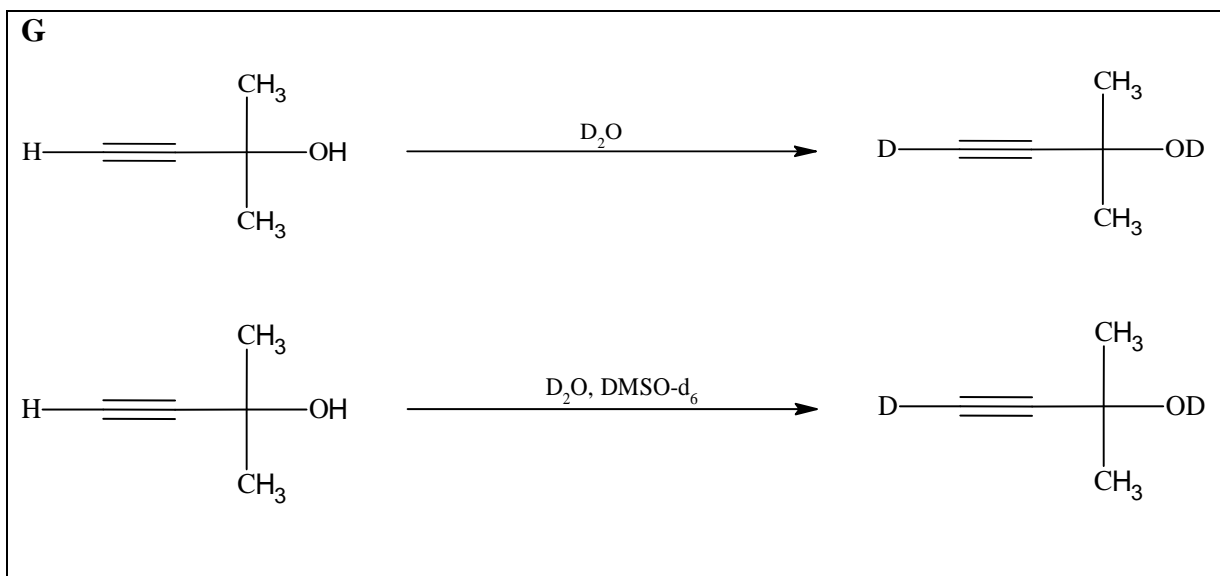
Jednostavnu, ekonomičnu, selektivnu i isplativu strategiju ugradnje ²H u razne terminalne alkine, Kumar i sur., (2021) razvili su u jeftinoj smjesi otapala KOH-DMSO-d₆ s visokom razinom ugradnje teškog vodika pri uvjetima sobne temperature (Tablica 1, E). Supstratima poput aromatskih i alifatskih dialkina i alkina supstituiranih alkoholom ili aminom uspješno je izvršena zamjena vodika za deuterij u jednostavnim reakcijskim uvjetima te ekološki prihvatljivom protokolu uz izbjegavanje uporabe skupih katalizatora prijelaznih metala (Kumar i sur., 2021).

Također, Chan i sur., (2022) koristili su jake baze poput natrijevog hidroksida, kalcijevog oksida ili *N,N,N,N*-tetrametilguanidina za bazom katalizirano deuteriranje alkina stabilnih na jaku bazu. DMSO-d₆ se pokazao kao prikladan donor deuterija u kombinaciji s krutim natrijevim hidroksidom kao baznim katalizatorom, dok su za reakcije izmjene u kojima je deuterijev oksid donor deuterija kao katalizatori korišteni kalcijev oksid ili *N,N,N,N*-tetrametilguanidin. Za deuteriranje alkina osjetljivih na baze kao katalizator je umjesto jake baze korišten srebrov perklorat (AgClO₄) u deuterijevom oksidu uz dimetilformamid (DMF) kao suotapalo (Tablica 1, F) (Chan i sur., 2022).

Tablica 1. Različiti protokoli deuteriranja terminalnih alkina (A – F) i način deuteriranja kojim se bavi ovaj rad (G).







2. OBRAZLOŽENJE TEME

Deuterirani terminalni alkini su vrijedni, sintetski korisni supstrati koji se mogu koristiti za sintezu drugih deuteriranih molekula (Kumar i sur., 2021; Bew i sur., 2012). Primjerice, među svim deuteriranim molekulama, upravo su alkini najčešće korišteni supstrati za sintezu deuteriranih alkena procesom hidrogenacije (Kumar i sur., 2021).

Većina deuteriranih spojeva komercijalno je nedostupna zbog svoje visoke cijene (Kumar i sur., 2021). Blaga i učinkovita priprema deuteriranih organskih spojeva aktivno je područje istraživanja s obzirom da je korisnost spomenutih spojeva naširoko prepoznata u raznim znanstvenim područjima (Tarrach i sur., 2023; Yamada i sur., 2015). U posljednjih nekoliko desetljeća, razvoj selektivnog i troškovno učinkovitog procesa za spojeve obilježene deuterijem bio je izazovan zadatak (Kumar i sur., 2021).

Dokumentirane su različite reakcije povezane s izotopskom izmjenom terminalnih alkina s deuteriranim otapalima koje uključuju ili povišene ili niske reakcijske temperature, produženo vrijeme reakcije koje često traje i sat vremena, jake baze poput n-BuLi, Grignardovih reagensa ili LDA ili skupu sol prijelaznog metala. Također, mnogi protokoli uključuju subkvantitativne prinose proizvoda sa smanjenim razinama ugradnje deuterija (Kumar i sur.,

2021; Bew i sur., 2012). Unatoč postojećim metodama, ekonomičan i ekološki prihvatljiv pristup za deuteriranje organskih molekula vrlo je poželjan (Kumar i sur., 2021).

Spomenutom problematikom bavi se i ovaj rad koji za cilj ima razvoj jednostavne metode koja bi primjenom blagih reakcijskih uvjeta bez korištenja katalizatora omogućila deuteriranje terminalnih alkina u relativno kratkom vremenu, uz visoku ugradnju ^2H izotopa.

3. MATERIJALI I METODE

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) spektroskopska je metoda korištena za snimanje ^1H , ^2H i ^{13}C spektara u ovom radu. Korišten je instrument Varian INOVA 400 privremeno smješten na Institutu za fiziku u Zagrebu (https://sestar.irb.hr:8443/instrumenti_show.php?ID=1804&page=0). Opremljen je supravodljivim magnetom (Oxford) gustoće magnetskog toka 9,4 Tesla, te s dvokanalnom (širokopojasni kanal i kanal 1H te referentni kanal 2H) probom OneNMR (Agilent). Snimanja su provedena u NMR cjevčicama promjera 5 mm uz termostatiranje pri odgovarajućoj temperaturi. Snimanja različitih jezgara provedena su pri frekvencijama 399,902 MHz (^1H), 61,387 MHz (^2H) i 100,565 MHz (^{13}C).

Reakcija deuteriranja praćena je na uzorku 1,1-dimetil-propargilnog alkohola ($\rho(\text{ROH}) = 0,8637 \text{ g/mL}$; $M_w = 84,118 \text{ g/mol}$) u teškoj vodi ($\rho(\text{D}_2\text{O}) = 1,11 \text{ g/mL}$; $M_w = 20,0276 \text{ g/mol}$) te u smjesi otapala teške vode i deuteriranog dimetil sulfoksida ($\rho(\text{DMSO-d}_6) = 1,19 \text{ g/mL}$; $M_w = 84,13 \text{ g/mol}$) pri različitim temperaturama (25°C , 30°C , 35°C , 40°C). U provedenim eksperimentima teška voda korištena je kao donor deuterija. Uzorci za analizu priređivani su pipetiranjem $20 \mu\text{L}$ 1,1-dimetil-propargilnog alkohola uz dodatak spomenutih otapala do ukupnog volumena od $650 \mu\text{L}$ kao što je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Volumeni reagensa (V) uzetih za pripremu uzoraka različitih volumnih (φ) i masenih udjela (w) DMSO- d_6 i D_2O .

$V(R-OH)$	20 μL	20 μL	20 μL
$V(DMSO-d_6)$	/	40 μL	580 μL
$V(D_2O)$	630 μL	590 μL	50 μL
$\varphi(DMSO-d_6)$	0%	6,35%	92,06%
$w(DMSO-d_6)$	0%	6,78%	92,56%
$\varphi(D_2O)$	100%	93,65%	7,94%
$w(D_2O)$	100%	93,22%	7,27%

Dimetil sulfoksid (DMSO) bezbojna je, u vodi topljiva, higroskopna, netoksična, blago alkalna organska tekućina blagog mirisa koja vrije na 189°C, a tali se na 18,5°C. DMSO ima jak afinitet prema vodi te se može s njom miješati u svim omjerima (LeBel i Goring, 1962).

Osim reakcija izotopne izmjene s 1,1-dimetil-propargilnim alkoholom kao analitom, provedena je i reakcija deuteriranja etinil estradiola u teškoj vodi. Pripremljena je zasićena otopina etinil estradiola koncentracije 5 mg/L otapanjem etinil estradiola u 650 μL teške vode kao glavnog donora deuterija.

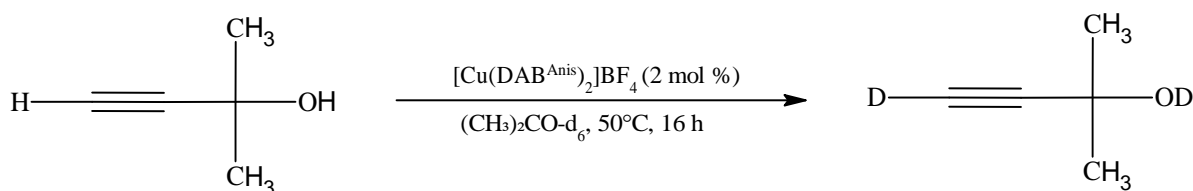
Nakon provedenih snimanja, podatci relaksacije magnetizacije (FID) obrađeni su korištenjem računalnog programa MestReNova (Willcott, 2009). Promjena, točnije pad koncentracije 1,1-dimetil propargilnog alkohola određena je promjenom omjera integrala 1H NMR signala metilne skupine na $\delta = 1,33$ ppm i signala alkinske skupine na $\delta = 2,67$ ppm u vremenu. Budući da se metilni signal ne mijenja s vremenom, nestanak alkinskog signala odgovara brzini reakcije H/D izmjene.

Reakcija H/D izmjene u teškoj vodi odgovara reakciji pseudo-prvog reda. Izraz za brzinu reakcije $v = k[ROH][D_2O]$ svodi se na $v = k_{obs}[ROH]$, gdje vrijedi da je izmjerena konstanta brzine reakcije pseudo-prvog reda $k_{obs} = k[D_2O]$ s obzirom da je deuterijev oksid u velikom

suvišku, pa postaje dio konstante. Također, koristan pokazatelj brzine kemijske reakcije je vrijeme polureakcije ($t_{1/2}$) što je vrijeme potrebno da se koncentracija određenog reaktanta smanji na polovicu svoje početne vrijednosti. Vrijedi izraz $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$.

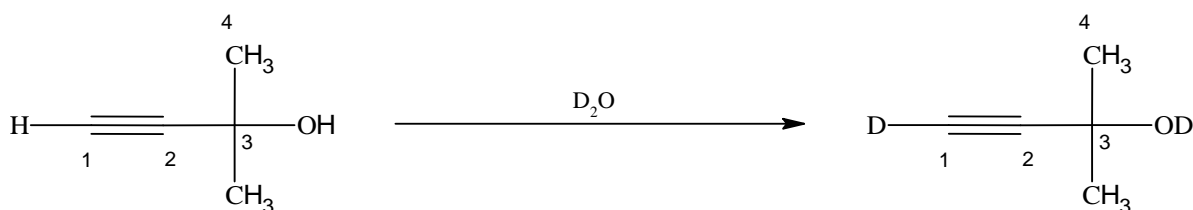
4. REZULTATI I RASPRAVA

Tarrach i sur., (2023) proveli su deuteriranje 1,1-dimetil-propargilnog alkohola koristeći aceton- d_6 kao izvor deuterija uz $[\text{Cu}(\text{DAB}^{\text{Anis}})_2]\text{BF}_4$ kao katalizator pri temperaturi od 50°C (Slika 1). U tim uvjetima ugradnja deuterija 16 sati nakon početka reakcije iznosila je samo 48% (Tarrach i sur., 2023).



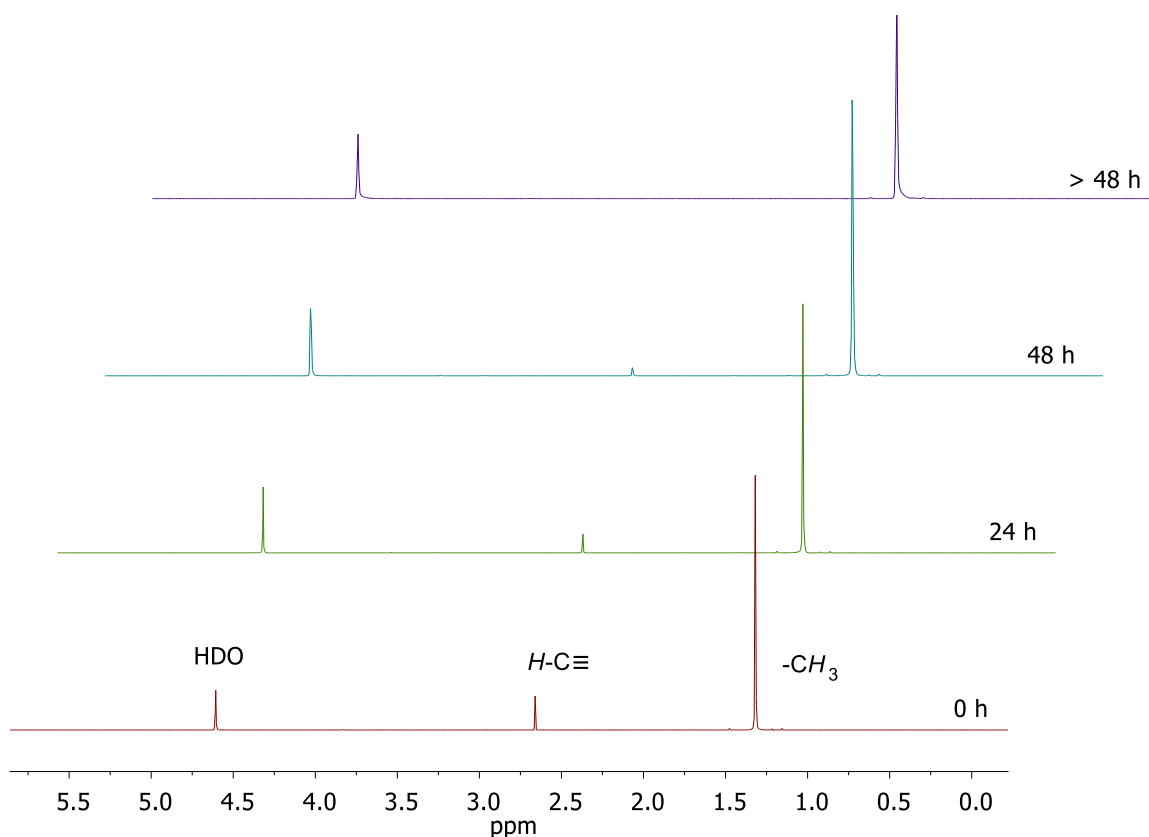
Slika 1. Deuteriranje 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u acetonu uz katalizator $[\text{Cu}(\text{DAB}^{\text{Anis}})_2]\text{BF}_4$ pri 50°C (Tarrach i sur., 2023).

Međutim, ista se H/D izmjena propargilnog alkohola može provesti u teškoj vodi pri sobnoj temperaturi, bez uporabe ikakvog katalizatora (Slika 2). Reakcija je uspješno provedena uz ugradnju deuterija od $>99\%$ (C1 i C3-O).



Slika 2. Deuteriranje 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u teškoj vodi pri 25°C .

Slika 3 prikazuje ^1H NMR signale 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u teškoj vodi pri 25°C . Signal dviju ekvivalentnih metilnih skupina ima kemijski pomak $\delta = 1,33$ ppm, dok signal alkinske skupine ima kemijski pomak $\delta = 2,67$ ppm. S vremenom se taj signal smanjuje kako reakcija deuteriranja napreduje, što ukazuje na izmjenu vodika za deuterij.

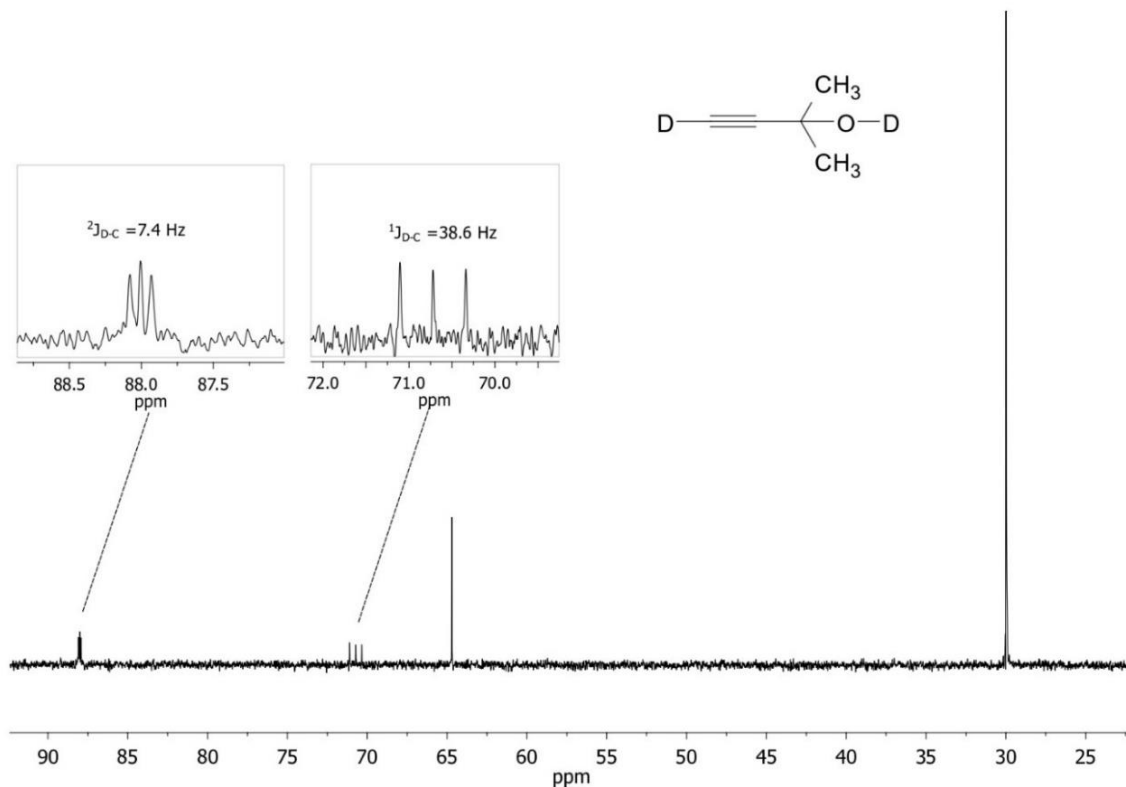


Slika 3. ^1H NMR spektri 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u teškoj vodi pri 25°C snimljeni u različitim vremenima.

Nakon provedene reakcije deuteriranja, snimljen je ^{13}C NMR spektar krajnjeg, deuteriranog produkta na kojem su vidljiva 4 signala (Slika 4). Na $\delta = 30,0$ ppm je signal metilnih skupina (C4), a na $\delta = 64,7$ ppm je C3-O signal. S obzirom da se radi o nespregnutom (decoupled) spektru, C–H sprege nisu vidljive, pa su oba signala singleti.

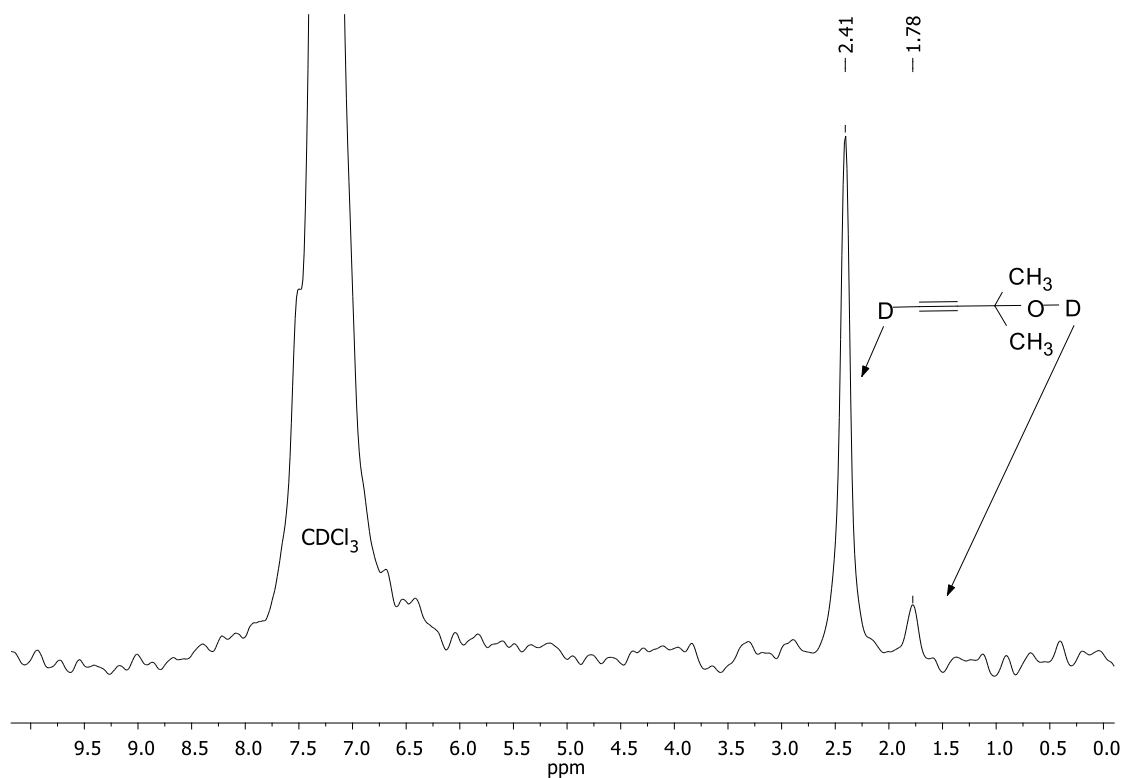
Međutim, C–D sprezanja nisu eliminirana pa su vidljiva u ^{13}C NMR spektru. Za C–D cijepanja vrijedi pravilo $2n+1$, gdje je spinski kvantni broj deuterija $n = 1$. Upravo zbog cijepanja s deuterijem, ugljik terminalnog alkina (C1) na $\delta = 70,7$ ppm daje triplet.

^2H cijepa terminalni C1 atom kroz jednu vezu konstantom sprege J koja iznosi $^1J_{\text{D-C}} = 38,6$ Hz. Zanimljivo je da deuterij cijepa i susjedni ugljikov atom C2 u triplet na $\delta = 88,0$ ppm, ali kroz dvije veze. S obzirom da je udaljenost između tog ugljika i deuterija veća, konstanta sprege manja je nego u prvom slučaju te iznosi $^2J_{\text{D-C}} = 7,4$ Hz.



Slika 4. ^{13}C NMR spektar deuteriranog propargilnog alkohola u teškoj vodi.

Kao dodatna potvrda ugradnje deuterija u strukturi produkta, snimljen je ^2H NMR spektar izoliranog produkta (ekstrakcijom vodene reakcijske smjese u CDCl_3) (Slika 5). Osim signala deuteriranog otapala, u spektru se nalaze dva signala, jedan na $\delta = 2,41$ ppm (deuterij terminalnog alkina) i prošireni signal na $\delta = 1,78$ ppm (deuterij hidroksilne skupine).



Slika 5. ^2H NMR spektar izoliranog deuteriranog produkta.

Reakcija H/D izmjene 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u D_2O provedena je na višim temperaturama, 30°C , 35°C i 40°C , kako bi se odredila ovisnost brzine kemijske reakcije o temperaturi.

Na temelju izračunatih konstanti brzine (k) i vremena polureakcije ($t_{1/2}$) očigledno je da se s povećanjem temperature povećava i brzina H/D izmjene (Tablica 3).

Tablica 3. Konstante brzine (k) i vremena polureakcije ($t_{1/2}$) deuteriranja 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u D_2O pri različitim temperaturama. Koncentracija $[\text{ROH}]$ iznosi $0,3160 \text{ mol/L}$.

$t/^\circ\text{C}$	T/K	$k \cdot 10^{-5}/\text{s}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
25	298,15	2,27	508,7
30	303,15	7,45	155,0
35	308,15	21,62	53,4
40	313,15	61,02	18,9

Usporedbom konstanti brzine (k) i vremena polureakcije ($t_{1/2}$) pri različitim temperaturama (25°C, 30°C, 35°C, 40°C), zaključak je isti – s povećanjem temperature povećava se i brzina H/D izmjene (Tablica 4).

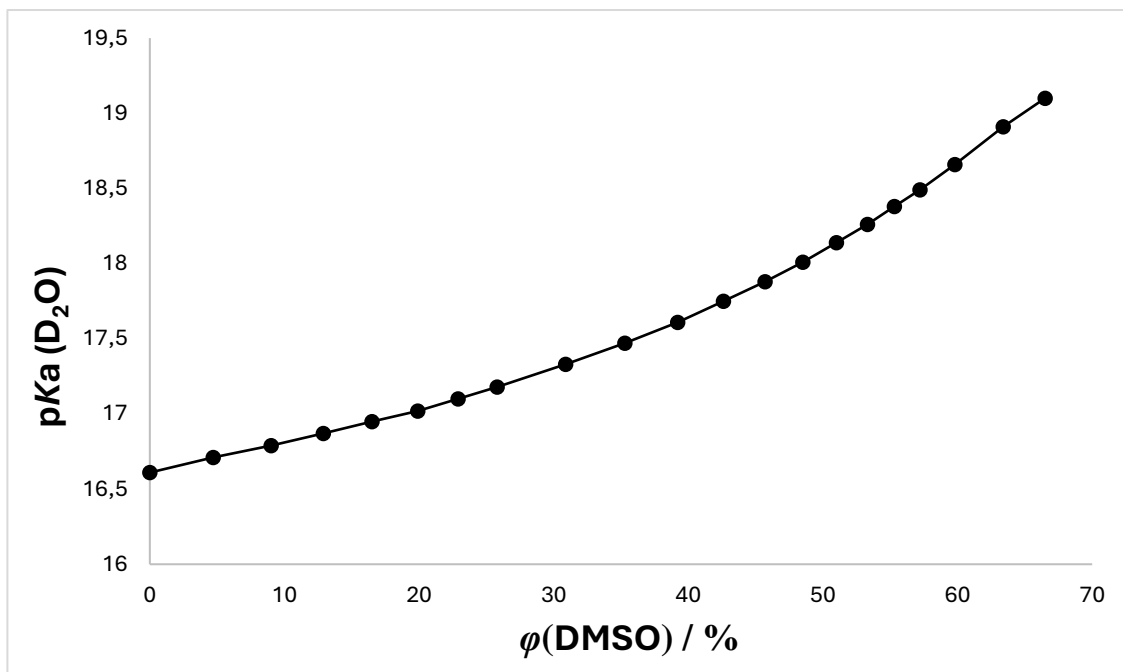
Tablica 4. Konstante brzine (k) i vremena polureakcije ($t_{1/2}$) deuteriranja 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u smjesi otapala DMSO- d_6 -D₂O (φ (DMSO- d_6) = 6,78%) pri različitim temperaturama. Koncentracija [ROH] iznosi 0,3160 mol/L.

$t/^\circ\text{C}$	T/K	$k \cdot 10^{-5}/\text{s}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$
25	298,15	1,50	770,0
30	303,15	3,76	307,2
35	308,15	11,10	104,1
40	313,15	34,31	33,7

Međutim, dodatkom DMSO- d_6 masenog udjela od 6,78% uočeno je smanjenje brzine izotopne izmjene 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u odnosu na reakciju provedenu u D₂O. To je očekivani efekt dodatka organskog otapala koji povisuje pKa vrijednost teške vode i smanjuje konstantu autoionizacije teške vode (George i Woolley, 1972).

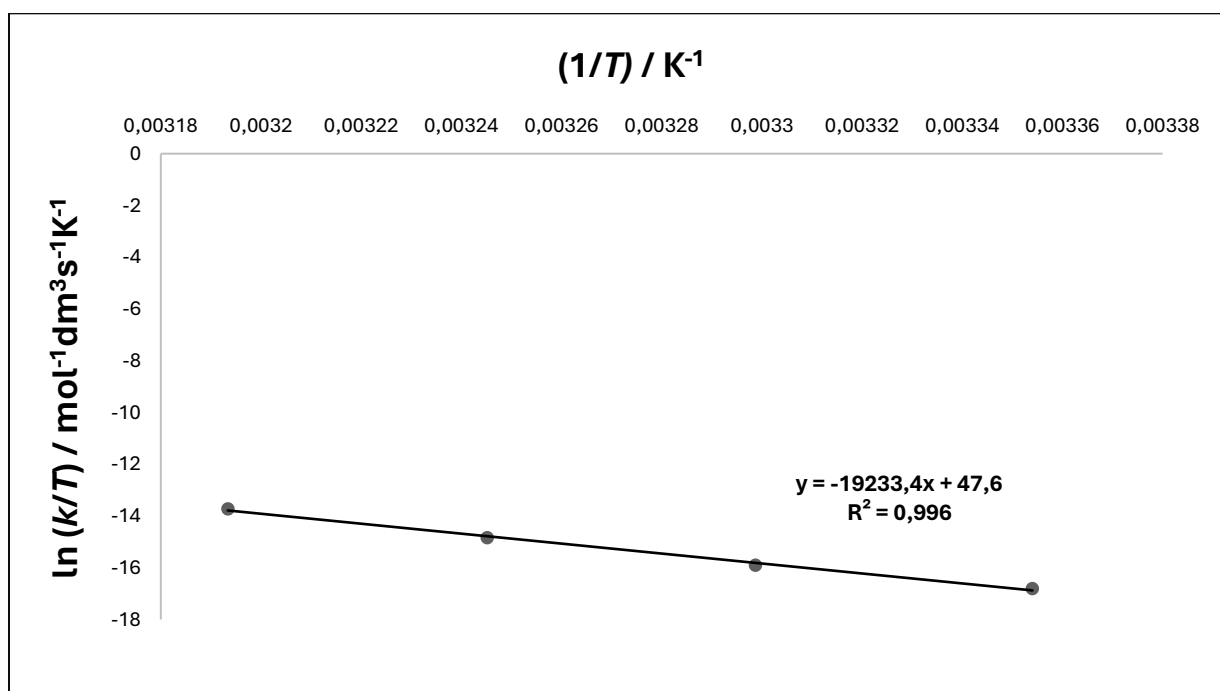
Kako bi se odredile ionizacijske konstante za deuterijev oksid u binarnoj smjesi s dimetil sulfoksidom, George i Woolley (1972) su primijenili potenciometrijsku metodu.

S povećanjem masenog udjela (φ) DMSO dolazi do povećanja pKa vrijednosti teške vode (Slika 8), odnosno ona postaje slabija kiselina, te se smanjuje brzina autoionizacije teške vode koja je važan proces za reakciju deuteriranja (George i Woolley, 1972). Autoionizacijom vode, naime, nastaju D⁺ i OD⁻ ioni koji mogu imati katalitičku ulogu u procesu H/D izmjene.



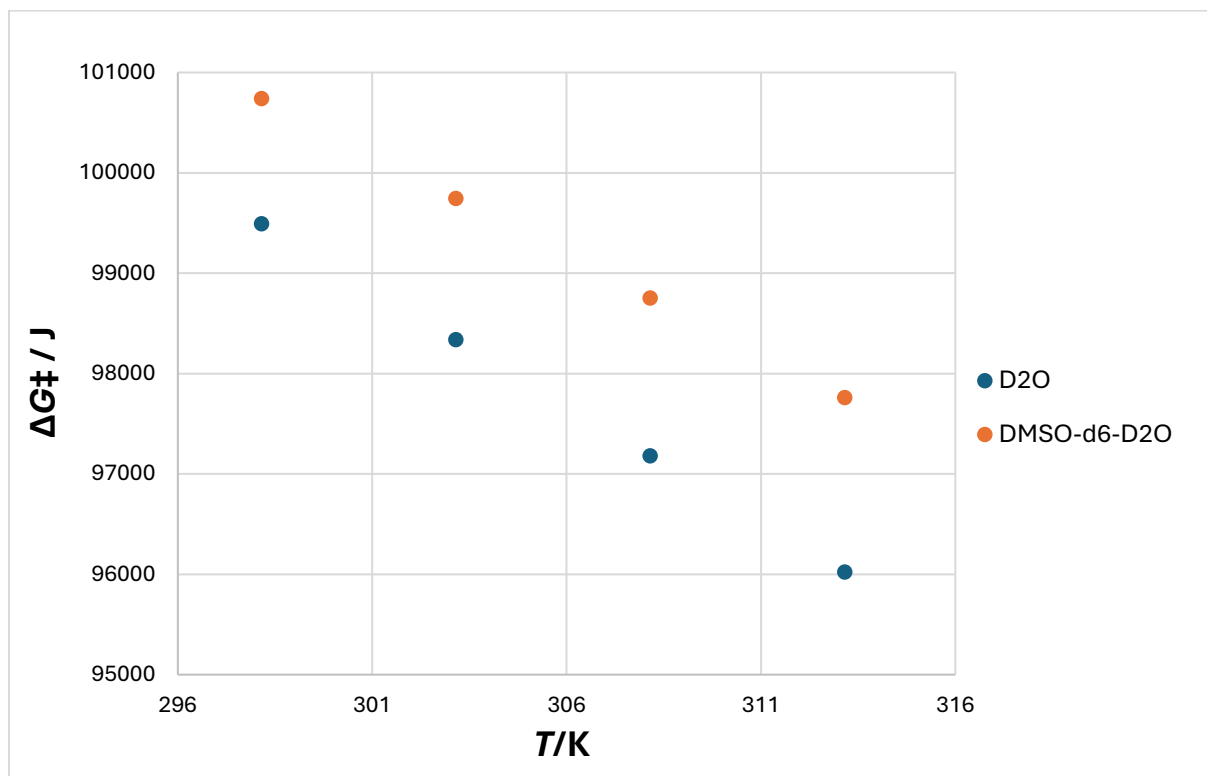
Slika 8. Ovisnost pKa teške vode (D_2O) o masenom udjelu dimetil sulfoksida (DMSO) pri 25°C (George i Woolley, 1972).

Ovisnost konstante brzine o temperaturi prikazana Eyringovom jednadžbom (Slika 9) daje očekivani linearni pravac iz kojeg je moguće odrediti termodinamičke aktivacijske parametre.



Slika 9. Eyringov graf reakcije deuteriranja provedene u smjesi otapala $\text{DMSO-d}_6\text{-D}_2\text{O}$ ($\phi(\text{DMSO-d}_6) = 6,78\%$) pri različitim temperaturama (25°C , 30°C , 35°C , 40°C).

Usporedbom izračunatih Gibbsovih aktivacijskih energija za procese H/D izmjene u D₂O i smjesi DMSO-d₆-D₂O vidljivo je da je energijska barijera niža za reakciju koja se odvija u teškoj vodi (Slika 10). Dodatak DMSO u tešku vodu, dakle, povisuje vrijednost ΔG^\ddagger .

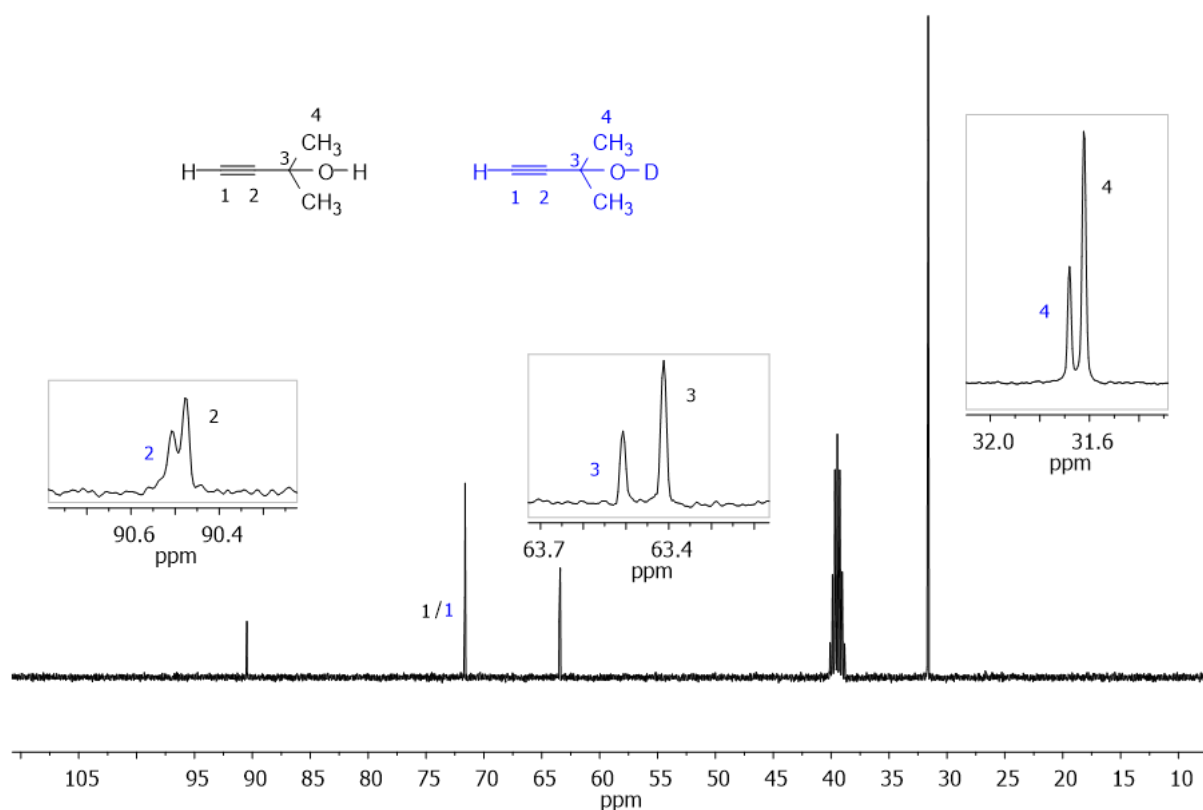


Slika 10. Usporedba Gibbsove aktivacijske energije (ΔG^\ddagger) deuteriranja 1,1-dimetilpropargilnog alkohola u D₂O i u smjesi otapala DMSO-d₆-D₂O ($\varphi(\text{DMSO-d}_6) = 6,78\%$) pri različitim temperaturama (25°C, 30°C, 35°C, 40°C).

Što je udio DMSO-d₆ veći to je reakcija H/D izmjene na terminalnom alkinu sporija (neobjavljeni podaci). Maseni udio DMSO veći od 30% čini postupak deuteriranja alkinske skupine propargilnog alkohola neprikladnim za laboratorijsku primjenu. Kada je DMSO-d₆ većinsko otapalo ($\varphi(\text{DMSO-d}_6) > 90\%$) dolazi do snažnog usporavanja H/D izmjene i na alkoholnoj skupini propargilnog alkohola.

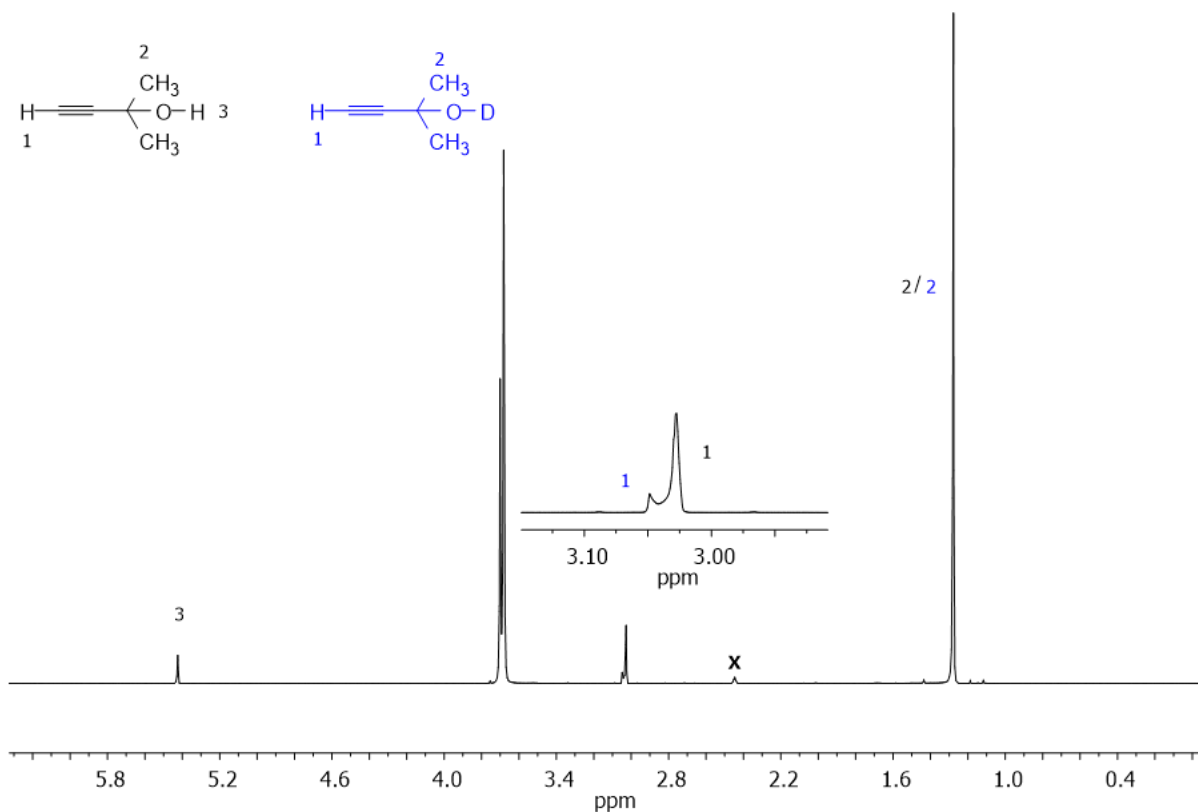
Tako je, primjerice, pri volumnom udjelu teške vode od 8% u dimetil sulfoksidu, reakcija H/D izmjene na alkoholnoj skupini dovoljno spora da je moguće snimiti oba izotopomera, HCCC(OH)(CH₃)₂ i HCCC(OD)(CH₃)₂, u reakcijskoj smjesi.

Na Slici 11 prikazan je ^{13}C NMR spektar reakcijske smjese izotopomera, pri čemu je udio deuteriranog spoja (ROD) manji od nedeuteriranog (ROH). Deuterijski izotopni efekt na kemijske pomake vidljiv je i mjerljiv za sve ugljikove atome propargilnog alkohola, osim za C atom terminalnog alkina, koji je najudaljeniji od mjesta izotopne izmjene. S obzirom da je u reakcijskoj smjesi $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO} = 8\%$ udio DMSO prevelik, ne dolazi do H/D izmjene na terminalnom alkinu jer DMSO potpuno inhibira tu reakciju izmjene.



Slika 11. ^{13}C NMR spektar reakcijske smjese izotopomera 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u smjesi 8% D_2O i DMSO.

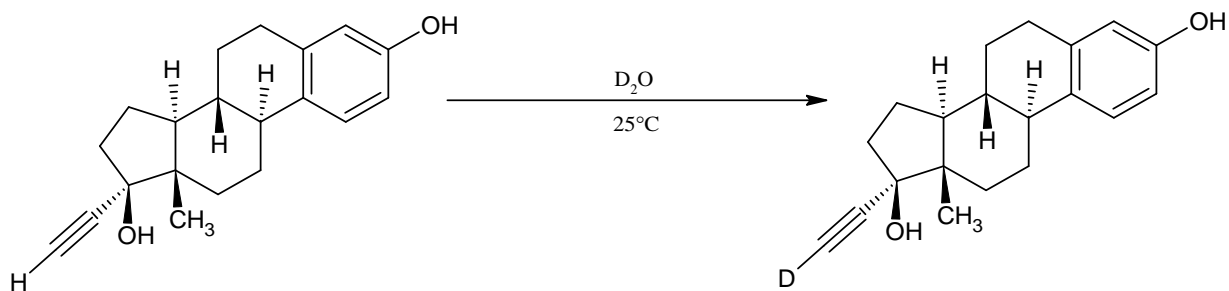
U ^1H NMR spektru vidljiva su 3 signala nedeuteriranog izotopomera, dok su kod deuteriranog izotopomera prisutna samo 2 signala, s obzirom da je na hidroksilnoj skupini došlo do izmjene vodika za deuterij. Kod terminalnog C atoma može se uočiti deuterijski izotopni efekt dugoga dosega (kroz 4 veze) (Slika 12).



Slika 12. ^1H NMR spektar reakcijske smjese izotopomera 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u smjesi 8% D_2O i DMSO.

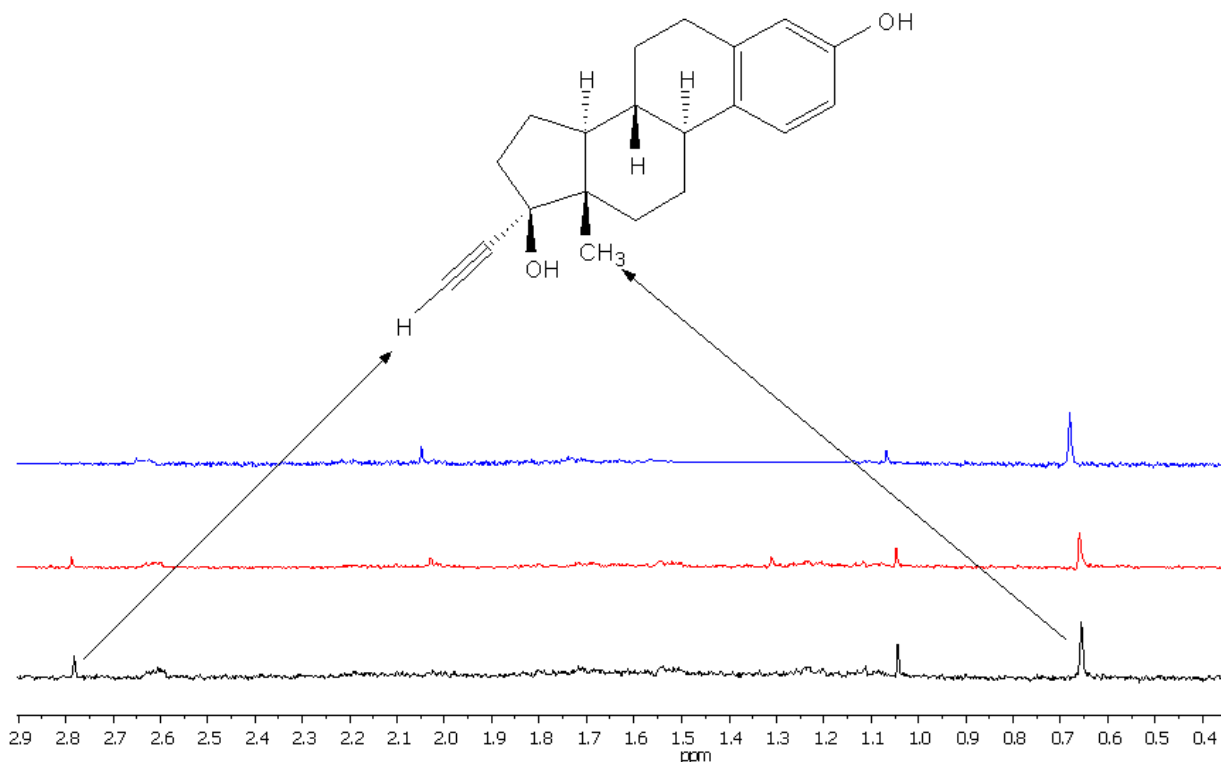
Prema tome, u DMSO ili u DMSO s malim udjelom teške vode reakcija H/D izmjene je vrlo spora ili potpuno inhibirana, pa se na vremenskoj skali NMR snimanja mogu vidjeti specije (izotopomeri) u reakcijskoj smjesi.

Koristeći 1,1-dimetil-propargilni alkohol kao model za istraživanje reakcije deuteriranja terminalne alkinske skupine, otkriveno je da je jednostavno otapanje supstrata u teškoj vodi dovoljno za potpunu H/D izmjenu. Isti se postupak primijenio za deuteriranje etinil estradiola (EE) koji, kao i brojni drugi sintetski hormoni, sadrži terminalnu alkinsku skupinu (Slika 13).



Slika 13. Deuteriranje etinil estradiola (EE) u teškoj vodi pri 25°C. Koncentracija [EE] iznosi 5 mg/L.

U ¹H NMR spektru etinil estradiola vidljiva su dva singleta; metilni signal s kemijskim pomaku $\delta = 0,65$ ppm te alkinski signal na $\delta = 2,78$ ppm. Nakon otapanja EE u teškoj vodi, s vremenom se signal na $\delta = 2,78$ ppm smanjuje, do potpunog nestanka, dok signal metilnog vodika ostaje nepromijenjen, što je dokaz uspješne izmjene vodika za njegov izotop u farmaceutski važnome derivatu (Slika 14).



Slika 14. ¹H NMR signali etinil estradiola (c(EE) = 5 mg/L) u teškoj vodi pri 25°C.

5. ZAKLJUČCI

1. Deuteriranje 1,1-dimetil-propargilnog alkohola može se uspješno provesti u deuterijevom oksidu (D_2O) i u smjesi otapala $DMSO-d_6-D_2O$ ($\varphi(DMSO-d_6) = 6,78\%$), dakle, u jednostavnim reakcijskim uvjetima, pri sobnoj temperaturi, u relativno kratkom vremenu te uz visoki postotak ($>99\%$) ugradnje deuterija.
2. Povećanjem temperature povećava se brzina H/D izmjene.
3. Dodatkom dimetil sulfoksida u reakcijsku smjesu s teškom vodom smanjuje se brzina H/D izmjene.
4. Izmjereni su aktivacijski parametri za reakcije deuteriranja alkinske skupine u D_2O i u smjesi $D_2O-DMSO$. Pokazano je da dodatak organskog otapala povisuje Gibbsovu aktivacijsku energiju (ΔG^\ddagger).
5. U prikladnim uvjetima (visoki udio DMSO, $>90\%$) moguće je usporiti reakciju H/D izmjene te u reakcijskoj smjesi odrediti udjele izotopomera.
6. Deuteriranje terminalne alkinske skupine etinil estradiola ($c(EE) = 5 \text{ mg/L}$) može se uspješno provesti u deuterijevom oksidu pri sobnoj temperaturi (25°C).

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

9- $[^2\text{H}]$ -9-PhFl – 9- $[^2\text{H}]$ -9-fenilfluoren

AcOEt – etil acetat

AgClO₄ – srebrov perklorat

BuLi – butil-litij

c – koncentracija

CDCl_3 – deuterirani kloroform

CH_3CN – acetonitril (metil cijanid)

D_2O – teška voda

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetil sulfoksid

DMSO-d_6 – deuterirani dimetil sulfoksid

EE – etinil estradiol

EM zračenje – elektromagnetsko zračenje

FDA – Food and Drug Administration; Američka agencija za hranu i lijekove

HIV-1 RT – reverzna transkriptaza virusa HIV tipa 1

J – konstanta sprege

k – konstanta brzine reakcije

K_2CO_3 – kalijev karbonat

KIE – kinetic isotope effects; kinetički izotopski učinci

k_{obs} – eksperimentalno izmjerena efektivna konstanta brzine reakcije

KOH – kalijev hidroksid

MAO – monoamin-oksidaza

M_w – molarna masa

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

$\text{p}K_a$ – ionizacijska konstanta

R-OH – 1,1-dimetil-propargilni alkohol

Ru(II) – rutenij

$t_{1/2}$ – vrijeme polureakcije

TBD – triazabiciklodecen

THF – tetrahidrofuran

V – volumen

v – brzina reakcije

w – maseni udio

ΔG^\ddagger – Gibbsova aktivacijska energija

ΔH^\ddagger – aktivacijska entalpija

ΔS^\ddagger – aktivacijska entropija

ρ – gustoća

δ – kemijski pomak

φ – volumni udio

7. LITERATURA

Bew, S.P., Hiatt-Gipson, G.D., Lovell, J.A. i Poullain, C. (2012). Mild Reaction Conditions for the Terminal Deuteration of Alkynes. *Org. Lett.*, 14(2), 456–459. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/ol2029178> [pristupljeno 10. veljače 2024.]

Chan, M.Y.T., Anwar, A. i Lockley, W.J.S. (2022). Practical approaches to labelling terminal alkynes with deuterium. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, [online] 65(4), 101–111. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/jlcr.3963> [pristupljeno 11. veljače 2024.]

Chatterjee, B. i Gunanathan, C. (2016). The ruthenium-catalysed selective synthesis of mono-deuterated terminal alkynes. *Chem. Commun.*, 52(24), 4509–4512. Dostupno na: <https://doi.org/10.1039/C6CC01401A> [pristupljeno 15. travnja 2024.]

Cintrat, J.-C., Pillon, F. i Rousseau, B. (2001). 9-Phenylfluorene: a powerful labeling agent. *Tetrahedron Lett.*, 42(30), 5001–5003. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)00903-0](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)00903-0) [pristupljeno 13. travnja 2024.]

George, R.E. i Woolley, E.M. (1972). Ionization constants for deuterium oxide in deuterium oxide-organic mixtures. *J. Solution Chem.*, 1(3), 279–289. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/bf00645107> [pristupljeno 22. veljače 2024.]

Kumar, S., Patel, M. i Verma, A.K. (2021). Base-Catalyzed Selective Deuteration of Alkynes. *Asian J. Org. Chem.*, 10(9), 2365–2369. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/ajoc.202100405> [pristupljeno 10. veljače 2024.]

LeBel, R.G. i Goring, D.A.I. (1962). Density, Viscosity, Refractive Index, and Hygroscopicity of Mixtures of Water and Dimethyl Sulfoxide. *J. Chem. Eng. Data*, 7(1), 100–101. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/je60012a032> [pristupljeno 22. veljače 2024.]

Li, N., Li, Y., Wu, X., Zhu, C. i Xie, J. (2022). Radical deuteration. *Chem. Soc. Rev.*, 51(15), 6291–6306. Dostupno na: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/cs/d1cs00907a> [pristupljeno 10. travnja 2024.]

Prakash, G., Paul, N., Oliver, G.A., Werz, D.B. i Debabrata Maiti (2022). C–H deuteration of organic compounds and potential drug candidates. *Chem. Soc. Rev.*, 51(8), 3123–3163. Dostupno na: <https://doi.org/10.1039/d0cs01496f> [pristupljeno 11. veljače 2024.]

Sabot, C., Kanduluru Ananda Kumar, Antheaume, C. i Mioskowski, C. (2007). Triazabicyclodecene: An Effective Isotope Exchange Catalyst in CDCl₃. *J. Org. Chem.*, 72(13), 5001–5004. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/jo070307h> [pristupljeno 15. travnja 2024.]

Talele, T.T. (2020). Acetylene Group, Friend or Foe in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.*, 63(11), 5625–5663. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01617> [pristupljeno 11. veljače 2024.]

Tarrach, X., Yang, J., Soleiman-Beigi, M. i Díez-González, S. (2023). Straightforward and Efficient Deuteration of Terminal Alkynes with Copper Catalysis. *Catalysts*, [online] 13(4), 648. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/catal13040648> [pristupljeno 21. veljače 2024.]

Willcott, M. R. (2009). MestReNova. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 13180–13180. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja906709t> [pristupljeno 09. travnja 2024.]

Yamada, T., Park, K., Monguchi, Y., Sawama, Y. i Sajiki, H. (2015). Mild deuteration method of terminal alkynes in heavy water using reusable basic resin. *RSC Adv.*, [online] 5(113), 92954–92957. Dostupno na: <https://doi.org/10.1039/C5RA18921G> [pristupljeno 10. veljače 2024.]

8. SAŽETAK/SUMMARY

Proces deuteriranja podrazumijeva izmjenu vodika (^1H) u strukturi različitih spojeva za atom deuterija (^2H), stabilnog, neradioaktivnog vodikovog izotopa. Ugradnjom atoma deuterija u molekule lijeka može doći do promjene svojstava apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja tog lijeka. Deuterirani spojevi često pokazuju poboljšane farmakokinetičke profile i manju toksičnost uz zadržavanje svojih farmakodinamičkih svojstava. S obzirom da su C–D veze jače od C–H veza, H/D izmjena može značajno usporiti metabolizam spojeva, a time i povećati bioraspoloživost lijekova.

Deuterirani terminalni alkini posebno su važni jer je riječ o prekursorima niza deuteriranih molekula. Znanstvenici su dugi niz godina pokušavali razviti jednostavnu, selektivnu, ekonomičnu i ekološki prihvatljivu metodu izotopske izmjene.

Ovaj rad usmjeren je razvoju jednostavnog protokola koji bi primjenom blagih reakcijskih uvjeta bez korištenja katalizatora omogućio deuteriranje terminalnih alkina u relativno kratkom vremenu, uz visoku ugradnju ^2H izotopa. S tim ciljem, uspješno je provedena H/D izmjena 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u teškoj vodi kao donoru deuterija te u smjesi otapala DMSO- d_6 - D_2O ($\varphi(\text{DMSO-}d_6) = 6,78\%$) pri sobnoj temperaturi, u relativno kratkom vremenu, uz visoku ugradnju izotopa ($>99\%$). Također je izmjereno da dodatak DMSO u D_2O neznatno usporava reakciju H/D izmjene, odnosno povisuje Gibbsovu aktivacijsku energiju.

Svi rezultati dobiveni su uporabom NMR spektroskopije, te daju dobar temelj za nastavak istraživanja reakcije deuteriranja različitih spojeva, pa tako i lijekova, koji u strukturi imaju terminalne alkine, uz primjenu D_2O te smjese otapala DMSO- D_2O ili smjese teške vode s drugim organskim otapalima.

The deuteration process implies the exchange of hydrogen (^1H) in the structure of various compounds for an atom of deuterium (^2H), a stable, non-radioactive hydrogen isotope. The incorporation of deuterium atoms into drug molecules can change the properties of absorption, distribution, metabolism and excretion of that drug. Deuterated compounds often show improved pharmacokinetic profiles and lower toxicity while retaining their pharmacodynamic properties. Given that C–D bonds are stronger than C–H bonds, H/D exchange can significantly slow down the metabolism of compounds, and thus increase the bioavailability of drugs.

Deuterated terminal alkynes are particularly important because they are the precursors of a number of deuterated molecules. For many years, scientists have been trying to develop a simple, selective, economical and environmentally friendly method of isotopic exchange.

This work is aimed at the development of a simple protocol that would enable the deuteration of terminal alkynes in a relatively short time, with a high incorporation of ^2H isotopes, by applying mild reaction conditions without the use of catalysts. With this aim, the H/D exchange of 1,1-dimethyl-propargyl alcohol was successfully carried out in heavy water as a deuterium donor and in the solvent mixture DMSO- d_6 - D_2O ($\varphi(\text{DMSO-}d_6) = 6.78\%$) at room temperature, in a relatively short time, with high isotope incorporation ($>99\%$). It was also measured that the addition of DMSO to D_2O slightly slows down the H/D exchange reaction, i.e. increases the Gibbs activation energy.

All results were obtained using NMR spectroscopy, and they provide a good basis for continuing research on the deuteration reaction of various compounds, including drugs, which have terminal alkynes in their structure, with the use of D₂O and the solvent mixture DMSO-D₂O or the mixture of heavy water with other organic solvents.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Organsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

NMR studija izotopnih H/D izmjena kod 1,1-dimetil-propargilnog alkohola

Tonka Brajčić

SAŽETAK

Proces deuteriranja podrazumijeva izmjenu vodika (^1H) u strukturi različitih spojeva za atom deuterija (^2H), stabilnog, neradioaktivnog vodikovog izotopa. Ugradnjom atoma deuterija u molekule lijeka može doći do promjene svojstava apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja tog lijeka. Deuterirani spojevi često pokazuju poboljšane farmakokinetičke profile i manju toksičnost uz zadržavanje svojih farmakodinamičkih svojstava. S obzirom da su C–D veze jače od C–H veza, H/D izmjena može značajno usporiti metabolizam spojeva, a time i povećati bioraspoloživost lijekova. Deuterirani terminalni alkini posebno su važni jer je riječ o prekursorima niza deuteriranih molekula. Znanstvenici su dugi niz godina pokušavali razviti jednostavnu, selektivnu, ekonomičnu i ekološki prihvatljivu metodu izotopske izmjene. Ovaj rad usmjeren je razvoju jednostavnog protokola koji bi primjenom blagih reakcijskih uvjeta bez korištenja katalizatora omogućio deuteriranje terminalnih alkina u relativno kratkom vremenu, uz visoku ugradnju ^2H izotopa. S tim ciljem, uspješno je provedena H/D izmjena 1,1-dimetil-propargilnog alkohola u teškoj vodi kao donoru deuterija te u smjesi otapala DMSO- d_6 - D_2O ($\phi(\text{DMSO-}d_6) = 6,78\%$) pri sobnoj temperaturi, u relativno kratkom vremenu, uz visoku ugradnju izotopa ($>99\%$). Također je izmjereno da dodatak DMSO u D_2O neznatno usporava reakciju H/D izmjene, odnosno povisuje Gibbsovu aktivacijsku energiju. Svi rezultati dobiveni su uporabom NMR spektroskopije, te daju dobar temelj za nastavak istraživanja reakcije deuteriranja različitih spojeva, pa tako i lijekova, koji u strukturi imaju terminalne alkine, uz primjenu D_2O te smjese otapala DMSO- D_2O ili smjese teške vode s drugim organskim otapalima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 28 stranica, 14 grafičkih prikaza, 4 tablica i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: deuteriranje, H/D izmjena, NMR, 1,1-dimetil-propargilni alkohol, deuterijev oksid (D_2O), dimetil sulfoksid (DMSO)

Mentor: **Dr. sc. Valerije Vrček**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Valerije Vrček**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Viktor Pilepić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Organic Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

NMR study of isotopic H/D exchanges in 1,1-dimethyl-propargyl alcohol

Tonka Brajčić

SUMMARY

The deuteration process implies the exchange of hydrogen (^1H) in the structure of various compounds for an atom of deuterium (^2H), a stable, non-radioactive hydrogen isotope. The incorporation of deuterium atoms into drug molecules can change the properties of absorption, distribution, metabolism and excretion of that drug. Deuterated compounds often show improved pharmacokinetic profiles and lower toxicity while retaining their pharmacodynamic properties. Given that C–D bonds are stronger than C–H bonds, H/D exchange can significantly slow down the metabolism of compounds, and thus increase the bioavailability of drugs. Deuterated terminal alkynes are particularly important because they are the precursors of a number of deuterated molecules. For many years, scientists have been trying to develop a simple, selective, economical and environmentally friendly method of isotopic exchange. This work is aimed at the development of a simple protocol that would enable the deuteration of terminal alkynes in a relatively short time, with a high incorporation of ^2H isotopes, by applying mild reaction conditions without the use of catalysts. With this aim, the H/D exchange of 1,1-dimethyl-propargyl alcohol was successfully carried out in heavy water as a deuterium donor and in the solvent mixture DMSO- d_6 - D_2O ($\varphi(\text{DMSO-}d_6) = 6.78\%$) at room temperature, in a relatively short time, with high isotope incorporation (>99%). It was also measured that the addition of DMSO to D_2O slightly slows down the H/D exchange reaction, i.e. increases the Gibbs activation energy. All results were obtained using NMR spectroscopy, and they provide a good basis for continuing research on the deuteration reaction of various compounds, including drugs, which have terminal alkynes in their structure, with the use of D_2O and the solvent mixture DMSO- D_2O or the mixture of heavy water with other organic solvents.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 28 pages, 14 figures, 4 tables and 14 references. Original is in Croatian language.

Keywords: deuteration, H/D exchange, NMR, 1,1-dimethyl-propargyl alcohol, deuterium oxide (D_2O), dimethyl sulfoxide (DMSO)

Mentor: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Viktor Pilepić, Ph.D. *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Davor Šakić, Ph.D. *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: June 2024.