

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Petra Mišetić

**ODREĐIVANJE LIPOFILNOSTI
MAKROCIKLIČKIH SPOJEVA
TEKUĆINSKOM KROMATOGRFIJOM
VISOKE DJELOTVORNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Petra Mišetić

**ODREĐIVANJE LIPOFILNOSTI
MAKROCIKLIČKIH SPOJEVA
TEKUĆINSKOM KROMATOGRFIJOM
VISOKE DJELOTVORNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Vesna Gabelica Marković

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG
DEVELOPMENT

Petra Mišetić

**LIPOPHILICITY DETERMINATION
OF MACROCYCLIC COMPOUNDS BY
HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2024.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.) u sklopu doktorskog studija „Medicinska kemija“ na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci. CAMDIS metoda korištena u ovom radu za određivanje log *D* vrijednosti uvedena je i prilagođena u suradnji s F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Gabelica Marković

Doktorski rad obranjen je dana dd mm 2024. god. na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____, predsjednik
2. _____, član
3. _____, član
4. Izv. prof. dr. sc. Vesna Gabelica Marković (mentorica)

ZAHVALE

SAŽETAK

Makrociklički spojevi pružaju mogućnost moduliranja kompleksnih meta, a da pritom zadržavaju dobra farmakokinetička svojstva. Lipofilnost se smatra jednim od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava te je izuzetno važno u ranim faza istraživanja imati pouzdanu metodu za lipofilno profiliranje novih makrocikličkih spojeva. U okviru ove doktorske disertacije istražena je primjenjivost literaturne CHI metode koja koristi tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti za određivanje lipofilnosti makrocikala. Analizirana je početna skupina makrocikličkih spojeva pri čemu je utvrđeno da je ova metoda manje precizna pri analizama makrocikala u usporedbi s malim molekulama zbog širenja i asimetričnosti kromatografskih pikova.

Proučavanjem utjecaja promjena eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja makrocikala, nađeno je da temperatura kromatografske kolone, brzina primjerenog gradijentnog programa te protok pokretne faze nemaju značajan utjecaj na relativne odnose u vremenima zadržavanja makrocikličkih spojeva. Promjena kromatografske kolone unutar iste USP klasifikacije ne utječe na relativni odnos vremena zadržavanja istraživanih spojeva, ali poboljšava učinkovitost analiza. Značajan utjecaj na analize makrocikličkih spojeva primijećen je smanjenjem koncentracije amonijevog acetata korištenog kao vodeni dio pokretne faze, kao i zamjena amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom. Također, upotreba metanola umjesto acetonitrila kao organskog otapala u pokretnoj fazi, značajno mijenja relativni odnos vremena zadržavanja istraživanih spojeva.

Na temelju slaganja pokazatelja lipofilnosti dobivenih primjenom istraživanih kromatografskih uvjeta s vrijednostima dobivenim metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode, odabrani su najprikladniji kromatografski uvjeti za lipofilno profiliranje spojeva iz klase makrocikala. Vrijednosti lipofilnosti dobivene metodom izmućkivanja za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva uspoređene su s onima dobivenima CHI metodom, optimiranom metodom i *in silico* izračunatim vrijednostima. Najbolja korelacija dobivena je između vrijednosti dobivenih metodom izmućkivanja i metodom za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva razvijenom u ovom radu.

Ključne riječi: lipofilnost, makrociklički spojevi, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

SUMMARY

Macrocyclic compounds give the opportunity to modulate difficult targets while maintaining good pharmacokinetic properties. Lipophilicity is considered to be one of the most important physio-chemical properties so it is of utmost importance to have a reliable and precise method for lipophilic profiling of new macrocyclic compounds in the early phases of drug discovery process. In this dissertation, the applicability of the literature CHI method that uses high-performance liquid chromatography for lipophilicity determination was investigated. An initial set of macrocyclic compounds was analyzed and it was discovered that the method is less precise for macrocyclic lipophilicity determination due to chromatographic peak broadening and severe tailing.

Investigation of the influence of experimental chromatographic changes showed that the chromatographic column temperature, gradient speed and mobile phase flow rate do not influence the relative relationships between retention times of the macrocyclic compounds. The use of a different chromatographic column from the same USP classification does not change the relative ratios between the retention times of analytes but results in enhanced efficiency of analyses. Significant influence on the analyses was observed when the concentration of ammonium acetate used as the aqueous part of the mobile phase was decreased, but also when it was replaced with ammonium hydrogencarbonate. Also, switching from acetonitrile to methanol as the organic part of the mobile phase resulted in different elution order of macrocyclic compounds.

Based on the correlation of lipophilicity parameters obtained with investigated chromatographic conditions with the values obtained with the shake-flask method, the most suitable chromatographic conditions for lipophilic profiling of macrocycles were selected. The lipophilicity values obtained with the shake-flask method were compared with the values obtained with the CHI method, the optimized method as well as *in silico* calculated lipophilicity. The best correlation was obtained between the shake-flask method and the chromatographic method developed in this thesis.

Keywords: lipophilicity, macrocyclic compounds, high-performance liquid chromatography

SADRŽAJ

ZAHVALE.....	IX
SAŽETAK.....	XI
SUMMARY.....	XIII
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Lipofilnost.....	7
2.2. Važnost lipofilnosti u istraživanju lijekova	9
2.3. Metode za određivanje lipofilnosti	12
2.3.1. Metoda izmućkivanja.....	12
2.3.2. Minijaturizirane metode izmućkivanja u pločicama s 96 jažica	14
2.3.3. Minijaturizirana metoda izmućkivanja upotrebom nosača za n-oktanol.....	15
2.3.4. Određivanje lipofilnosti upotrebom RP-HPLC metoda	17
2.3.4.1. Izokratne RP-HPLC metode za određivanje lipofilnosti.....	19
2.3.4.2. Gradijentne RP-HPLC metode za određivanje lipofilnosti.....	22
2.3.4.3. Utjecaj ionizacije na vrijeme zadržavanja spoja te određivanje kiselo-baznih svojstava	25
2.3.5. Računalno određivanje lipofilnosti	26
2.4. Makrociklički spojevi	27
2.4.1. Makrociklički spojevi prisutni na tržištu lijekova i u kliničkim fazama istraživanja	29
2.4.2. FideltaMacro™ – biblioteka makrocikličkih spojeva	31
2.4.3. Strukturne karakteristike te fizikalno-kemijska i ADME svojstva makrocikličkih spojeva	32
2.4.4. Određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva	35
3. SVRHA, CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	44
4. EKSPERIMENTALNI DIO	45
4.1. Materijali	45
4.1.1. Spojevi korišteni pri kromatografskim analizama	45

4.1.2.	Spojevi korišteni pri određivanju lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	56
4.1.3.	Kemikalije korištene pri kromatografskim analizama	56
4.1.4.	Kemikalije korištene pri određivanju lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	57
4.2.	Priprava otopina	58
4.2.1.	Priprava otopina korištenih pri kromatografskim analizama	58
4.2.2.	Priprava otopina za određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	61
4.3.	Oprema	62
4.3.1.	Pribor i uređaji	62
4.3.2.	Instrumenti	63
4.3.3.	Kromatografske kolone	64
4.3.4.	Programi korišteni za upravljanje RP-HPLC-DAD-MS i UPLC-MS/MS sustavima te za obradu podataka	64
4.4.	Metode	65
4.4.1.	Određivanje log <i>D</i> vrijednosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	65
4.4.1.1.	Provedba pokusa za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	65
4.4.1.2.	UPLC-MS/MS analize uzoraka iz pokusa za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	66
4.4.1.3.	Računanje log <i>D</i> vrijednosti upotrebom CAMDIS metode	67
4.4.2.	Kromatografsko određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode	68
4.4.2.1.	RP-HPLC-DAD-MS uvjeti za određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode	68
4.4.2.2.	Računanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) i Chrom log <i>D</i> vrijednosti istraživanih spojeva upotrebom CHI metode	69
4.4.3.	Istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova istraživanih spojeva	70
4.4.3.1.	Utjecaj temperature kromatografske kolone	70

4.4.3.2.	Utjecaj brzine gradijenta.....	70
4.4.3.3.	Utjecaj protoka pokretne faze.....	70
4.4.3.4.	Utjecaj vrste kromatografske kolone	71
4.4.3.5.	Utjecaj koncentracije i vrste puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze	71
4.4.3.6.	Utjecaj vrste organskog otapala u pokretnoj fazi.....	71
5.	REZULTATI I RASPRAVA.....	73
5.1.	Određivanje lipofilnosti početne skupine makrocikličkih spojeva metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode.....	75
5.2.	Kromatografsko određivanje lipofilnosti početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom CHI metode	77
5.3.	Istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na određivanje lipofilnosti malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva	82
5.3.1.	Utjecaj temperature kromatografske kolone na vremena zadržavanja istraživanih spojeva	83
5.3.2.	Utjecaj brzine gradijenta na vremena zadržavanja istraživanih spojeva	84
5.3.3.	Utjecaj protoka pokretne faze na vremena zadržavanja istraživanih spojeva	86
5.3.4.	Utjecaj vrste kromatografske kolone na vremena zadržavanja istraživanih spojeva	87
5.3.5.	Utjecaj koncentracije puferske otopine amonijevog acetata na vremena zadržavanja istraživanih spojeva.....	91
5.3.5.1.	Utjecaj koncentracije puferske otopine amonijevog acetata upotrebom Luna C18 kromatografske kolone.....	92
5.3.5.2.	Utjecaj koncentracije puferske otopine amonijevog acetata upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone.....	96
5.3.6.	Utjecaj vrste puferske otopine na vremena zadržavanja istraživanih spojeva	98
5.3.6.1.	Provjera stabilnosti otopine amonijevog hidrogenkarbonata	99
5.3.6.2.	Zamjena amonijevog acetata koncentracije 50 mM s amonijevim hidrogenkarbonatom koncentracije 50 mM odnosno 10 mM upotrebom Luna C18 kromatografske kolone.....	101

5.3.6.3.	Zamjena amonijevog acetata koncentracije 50 mM s amonijevim hidrogenkarbonatom koncentracije 50 mM odnosno 10 mM upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone.....	102
5.3.7.	Utjecaj vrste organskog otapala u pokretnoj fazi na vremena zadržavanja istraživanih spojeva	103
5.3.7.1.	Zamjena acetonitrila metanolom upotrebom Luna C18 kromatografske kolone	104
5.3.7.2.	Zamjena acetonitrila metanolom upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone	108
5.3.8.	Usporedba kromatografskih uvjeta za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva za predviđanje log <i>D</i> vrijednosti	111
5.4.	Određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom optimizirane kromatografske metode.....	114
5.4.1.	Optimizirani kromatografski uvjeti za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva	114
5.4.2.	Provjera primjene Macro log <i>D</i> kromatografske metode na proširenu skupinu makrocikličkih spojeva	116
5.4.3.	Odabir makrocikličkih spojeva kao kalibracijskih standarda i prijedlog jednadžbe za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log <i>D</i> metode	118
5.4.4.	Određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log <i>D</i> kromatografske metode grupiranjem spojeva u skupine od tri člana	121
5.5.	Usporedba pokazatelja lipofilnosti dobivenih različitim metodama	122
6.	ZAKLJUČAK	127
7.	LITERATURNI IZVORI	133
8.	DODACI	147
8.1.	Popis slika	149
8.2.	Popis tablica.....	151
8.3.	Popis jednadžbi	152
8.4.	Popis oznaka, simbola i kratica	152
8.5.	Kalibracijski standardi koji se koriste za kalibraciju RP-HPLC sustava za određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode.....	155

8.6.	Makrociklički spojevi početne skupine korištenih za istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja te oblik i simetriju kromatografskih pikova.....	157
8.7.	MRM prijelazi unutarnjeg i vanjskog standarda, kontrolnih spojeva i spojeva testiranih u pokusu od određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode	159
8.8.	Rezultati istraživanja utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta	165
8.8.1.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim temperaturama kromatografske kolone: 25 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C	165
8.8.2.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva primjenom dvominutnog, trominutnog, petominutnog i sedmominutnog linearnog gradijenta.....	166
8.8.3.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim protocima pokretne faze: 0,5 ml min ⁻¹ , 1 ml min ⁻¹ , 1,5 ml min ⁻¹ te 2 ml min ⁻¹	167
8.8.4.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri upotrebi CHI metode s Luna C18 i XSelect CSH kromatografskim kolonama.....	168
8.8.5.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim koncentracijama amonijevog acetata: 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM i 70 mM	170
8.8.6.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim koncentracijama amonijevog acetata: 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM i 70 mM na XSelect CSH kromatografskoj koloni	171
8.8.7.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i 10 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze.....	172
8.8.8.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i 10 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni	174

8.8.9.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila, amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola, zatim amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM, odnosno 10 mM i metanola kao pokretnih faza	175
8.8.10.	Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila, amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola, zatim amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola te 10 mM amonijevog hidrogenkarbonata i metanola kao pokretnih faza na XSelect CSH kromatografskoj koloni	176
8.9.	Rezultati određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode te vremena zadržavanja upotrebom Macro log <i>D</i> metode za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.....	178
8.10.	Vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log <i>D</i> kromatografske metode pri pH vrijednostima puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze od 7,30, 7,40 i 7,50	185
8.11.	Vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log <i>D</i> kromatografske metode analizirajući spojeve samostalno i grupiranjem spojeva u skupine od tri člana	186
8.12.	<i>In silico</i> clog <i>D</i> _{7,40} vrijednosti dobivene upotrebom ACD/Labs Percepta računalnog programa, Chrom log <i>D</i> vrijednosti dobivene upotrebom CHI metode te Macro log <i>D</i> vrijednosti dobivene upotrebom Macro log <i>D</i> metode za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva	192
9.	ŽIVOTOPIS.....	199

1. UVOD

Istraživanje i razvoj novog lijeka je dugotrajan, složen i skup proces s visokom mogućnošću neuspjeha. Procjenjuje se da traje između 10 i 15 godina te da se pritom potroši i do 2,8 milijardi američkih dolara (1,2). Poznavanje fizikalno-kemijskih svojstava kemijskih spojeva koji se razvijaju kao novi potencijalni lijekovi izuzetno je važno jer se na temelju njih radi rani probir molekula za daljnje profiliranje i razvoj (3) čime se povećava vjerojatnost za njihov uspjeh u kasnijim fazama istraživanja. Pritom je lipofilnost odavno prepoznata kao jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava u istraživanju lijekova jer izravno utječe na sve procese apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja (engl. *absorption, distribution, metabolism, and excretion, ADME*), kao i na farmakokinetička svojstva te toksičnost potencijalnog novog lijeka (4–6). Prijenos lijeka kroz biološku membranu kao i njegova biološka aktivnost prema farmakološkoj meti su u direktnoj vezi s lipofilnošću lijeka (7,8). O lipofilnosti ovise topljivost, vezanje lijeka na proteine plazme kao i njegova toksičnost (9). Oralna bioraspodjelivost je također povezana s lipofilnošću lijeka (10). Zbog značajnog utjecaja na mnoge važne parametre u istraživanju novih lijekova, lipofilnost je važno odrediti u ranijim fazama istraživanja kako bi se dovoljno rano napravio optimalan farmaceutski probir spojeva koji imaju najveću vjerojatnost za uspješan daljnji razvoj.

Kromatografske metode koriste se za određivanje lipofilnosti od 80-ih godina prošlog stoljeća (11). Istraživanja su pokazala da je kromatografska tehnika dobar model za interakcije do kojih dolazi u biološkim sustavima te se može koristiti za predviđanje bioloških procesa (12). Kromatografske metode za određivanje lipofilnosti kao alternativa klasičnoj metodi izmućivanja istaknule su se zbog mogućnosti automatizacije, većeg broja uzoraka koji se mogu profilirati u kratkom vremenskom razdoblju te jednostavnosti pripreme uzoraka (13,14). Pritom se najčešće koriste metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza (engl. *reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC*) (15,16) pa je tako Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organization for Economic Cooperation and Development, OECD*) propisala standardnu proceduru za mjerenje lipofilnosti upotrebom RP-HPLC tehnike (17).

Makrociklički spojevi privlače velik interes farmaceutske industrije zbog sposobnosti moduliranja kompleksnih farmakoloških meta (18). Njihova veličina i strukturna kompleksnost su glavne karakteristike koje ih razlikuju od malih molekula, a unatoč tome posjeduju povoljna fizikalno-kemijska, ADME i farmakokinetička svojstva kao što su dobra topljivost, optimalna lipofilnost, visoka metabolička stabilnost i povoljna bioraspodjelivost (19). Ipak, riječ je o premalo istraženom i nedovoljno iskorištenom klasi molekula unutar koje leži veliki potencijal za razvoj novih lijekova u različitim terapijskim područjima (20). Zbog trodimenzionalne kompleksnosti makrocikličkih spojeva predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava računalnim metodama je prilično

izazovno (21) stoga je eksperimentalno određivanje fizikalno-kemijskih svojstava makrocikličkih spojeva vrlo važno već u ranim fazama istraživanja.

Kromatografsko određivanje lipofilnosti spojeva iz klase makrocikala u literaturi uglavnom se temelji na primjeni metode koja je razvijena za lipofilno profiliranje malih molekula, a kojom se kao mjera lipofilnosti određuje kromatografski indeks hidrofobnosti (engl. *chromatographic hydrophobicity index*, CHI) (22). Do sada u literaturi nije pronađeno istraživanje koje na sustavan način istražuje pouzdanost i promjenjivost CHI metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva.

2. LITERATURNI PREGLED

Glavni cilj razvoja novog lijeka je pronaći učinkovitu i sigurnu molekulu koja mijenja tijek bolesti za koju je namijenjena. Kako bi se novi kemijski entitet razvio u novi lijek, mora ispunjavati niz uvjeta. Prvenstveno, mora imati biološku aktivnost prema farmakološkoj meti, odnosno imati povoljan farmakodinamički odgovor. Iako najvažniji, to je tek prvi zahtjev koji novi potencijalni lijek mora zadovoljiti. Uz visok afinitet prema odgovarajućoj farmakološkoj meti, ispitivana molekula mora biti neškodljiva i sigurna, ali i posjedovati niz povoljnih fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih karakteristika (23,24).

Djelovanje lijeka u organizmu uvjetovano je brojnim kemijskim i biološkim procesima od kojih je najvažniji njegovo vezanje na receptor odnosno farmakološku metu. Međutim, farmakokinetički procesi koji se odvijaju u organizmu su jednako važni kao i farmakodinamički odgovor. Tako se lijek najprije mora otopiti u tjelesnim tekućinama, čime postaje dostupan za prolazak kroz biološke membrane. Nakon toga dopijeva u krv gdje se veže za proteine krvne plazme i tim putem prenosi do mjesta djelovanja, gdje dolazi do, najčešće reverzibilnog, vezanja na farmakološku metu. Nakon što se lijek otpusti natrag u krvotok, slijede procesi metabolizma i izlučivanja iz tijela. Usporedno s ovim procesima, lijek se, osim u krvotok, u određenoj mjeri distribuira i u tkiva. Također, prilikom interakcije s metaboličkim enzimima može doći do lijek-lijek interakcija kao i do nespecifičnih vezanja na druge receptore prisutne u organizmu te posljedično i do toksičnih efekata (25,26). Sva navedena ADME svojstva kao i toksičnost direktno ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima novog kemijskog entiteta (27,28).

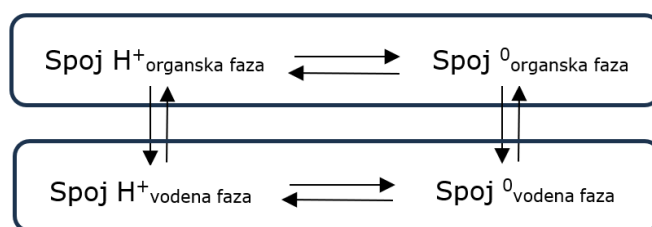
U prošlosti je razvoj novih lijekova bio usmjeren na postizanje što bolje farmakološke aktivnosti, dok se u ranijim fazama istraživanja potpuno zanemarivao farmakokinetički profil. Upravo su loša farmakokinetička svojstva bila glavni razlog zašto je tijekom 90-tih godina prošlog stoljeća razvoj oko 40 % novih lijekova zaustavljen u kliničkim fazama istraživanja (29). Kako bi se povećala vjerojatnost za uspjeh budućeg lijeka, od ključne je važnosti usporedno s poboljšavanjem aktivnosti molekule optimizirati i njezina fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva. Fizikalno-kemijska svojstva koja su važna u ranijim fazama istraživanja novih kemijskih entiteta su lipofilnost, topljivost, stabilnost, konstanta ionizacije te integritet spoja (30,31). Lipofilnost je specifično svojstvo jer je jedino o kojem ovise druga fizikalno-kemijska svojstva, ali i farmakodinamičke odnosno farmakokinetičke karakteristike molekula.

2.1. Lipofilnost

Lipofilnost se definira kao afinitet molekule ili dijela molekule prema lipidnom okruženju. Eksperimentalno se određuje kao raspodjela spoja u sustavu dviju faza koje se ne miješaju (32). Iako se pojmovi lipofilnosti i hidrofobnosti često koriste kao sinonimi, treba naglasiti kako postoji bitna razlika. Lipofilnost proizlazi iz svojstva spoja, odnosno njegove

tendencije prema lipidnom okruženju, dok je hidrofobnost širi pojam koji uključuje zbroj lipofilnosti i polarnosti molekule (33). Smatra se da je upravo hidrofobnost odgovorna za farmakodinamička i farmakokinetička svojstva koja posjeduje lijek (34). Međutim, lipofilnost je fizikalno kemijsko svojstvo koje je moguće eksperimentalno odrediti, a kako je u direktnoj vezi s hidrofobnošću, koristi se za probir molekula u istraživanju novih lijekova.

Vrijednost lipofilnosti izražava se kao koeficijent raspodjele (engl. *partition coefficient, P*) u sustavu organske i vodene faze te predstavlja raspodjelu molekulske vrste u neioniziranom obliku (23,35). Međutim, većina molekula s kojima se susrećemo u istraživanju lijekova su spojevi s jednim ili više mjesta moguće ionizacije. Stoga je uveden pojam koeficijenta distribucije (engl. *distribution coefficient, D*) koji opisuje raspodjelu neioniziranog, ali i svih ioniziranih vrsta pri određenoj pH vrijednosti (23) (Slika 2.1).



Slika 2.1 Shema raspodjele spoja između organske i vodene faze.

Uvriježeno je da se lipofilnost izražava preko logaritamskih vrijednosti pa se tako logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele definira kao omjer koncentracije neutralnog spoja u organskoj i vodenoj fazi u ravnotežnom stanju (Jednadžba 2.1).

$$\log P = \log \frac{c(\text{Spoj}^0_{\text{organsko otapalo}})}{c(\text{Spoj}^0_{\text{vodena faza}})}$$

Jednadžba 2.1 Logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele.

gdje je:

- P – koeficijent raspodjele;
- c – koncentracija spoja.

S druge strane, koeficijent distribucije izražava se na isti način kao i koeficijent raspodjele, ali uzima u obzir sve moguće ionizirane oblike spoja i njihovu raspodjelu u ravnotežnom stanju pri određenoj pH vrijednosti (Jednadžba 2.2).

$$\log D = \log \frac{c(\text{Spoj}^0_{\text{organsko otapalo}}) + c(\text{Spoj H}^+_{\text{organsko otapalo}})}{c(\text{Spoj}^0_{\text{vodena faza}}) + c(\text{Spoj H}^+_{\text{vodena faza}})}$$

Jednadžba 2.2 Logaritamska vrijednost koeficijenta distribucije.

gdje je:

- D – koeficijent distribucije;
- c – koncentracija spoja.

Udio neionizirane i ionizirane vrste ovisi o pH vrijednosti puferne otopine koja se koristi te o konstanti ionizacije kiselih odnosno bazičnih skupina spoja. Tako će pri niskim pH vrijednostima kiseli spojevi biti dominantno u neutralnom obliku te će se povećanjem pH vrijednosti povećavati udio ionizirane forme. Zato će raspodjela u organsku fazu, a samim time i $\log D$ vrijednost kiselih spojeva, biti najviša pri niskim pH vrijednostima. S druge strane, spojevi s bazičnim funkcionalnim skupinama najveću raspodjelu u organsku fazu, a posljedično i $\log D$ vrijednost, imat će pri visokim pH vrijednostima vodene faze, dok će snižavanjem pH vrijednosti spoj postepeno prelaziti u ioniziranu formu čime dolazi do pada njegove $\log D$ vrijednosti. Kod neutralnih molekula koje nemaju mogućnost ionizacije, $\log D$ i $\log P$ vrijednosti su jednake i nepromjenjive bez obzira na pH vrijednost vodene faze.

Kako mnogi lijekovi i novi kemijski entiteti koji se razvijaju kao potencijalni novi lijekovi imaju funkcionalne skupine koje mogu ionizirati (36), prije određivanja lipofilnosti treba definirati pokazatelj koji je relevantan za potrebe projekta i specifičnu upotrebu. Pritom se odabire između određivanja particijskog koeficijenta raspodjele $\log P$ ili koeficijenta distribucije $\log D$ pri određenoj pH vrijednosti, ovisno o tome je li relevantna raspodjela neutralne formule spoja ili je pak važno promotriti distribuciju svih prisutnih oblika spoja pri određenoj pH vrijednosti. Velika većina projekata za razvoj novih lijekova kao relevantnu mjeru lipofilnosti upotrebljava koeficijent distribucije $\log D$ pri fiziološkoj pH vrijednosti od 7,40.

2.2. Važnost lipofilnosti u istraživanju lijekova

Lipofilnost je odavno prepoznata kao jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava u istraživanju novih lijekova. Jedan od razloga je činjenica da lipofilnost molekule izravno utječe na njezina farmakodinamička svojstva, odnosno na vezanje spoja na farmakološku metu (4,7). Poznavanje vrijednosti lipofilnosti doprinosi razumijevanju interakcija između liganda i mete jer aktivna mjesta mete često sadrže hidrofobna vezna područja koja imaju mogućnost stvaranja intermolekulskih interakcija s ligandom što doprinosi višoj aktivnosti (37). Stoga je lipofilnost jedan od glavnih svojstava koje se koristi pri studijama

kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti spoja (engl. *quantitative structure-activity relationship*, QSAR).

Poznato je da lipofilnost utječe na druga fizikalno-kemijska svojstva molekule pa se tako topljivost spoja može direktno izračunati uzimajući u obzir njegovu točku tališta i log P vrijednost (5). Najčešće su spojevi s nižom log P vrijednošću dobro topljivi u vodenom mediju, dok oni s višim vrijednostima imaju nisku topljivost.

Lipofilnost je fizikalno-kemijsko svojstvo koje direktno utječe na sve ADME procese, a povezana je i s toksičnošću potencijalnog budućeg lijeka (5,23). Apsorpcija spoja u gastrointestinalnom traktu ovisi o njegovoj permeabilnosti, koja je zbroj pasivne difuzije, međustaničnog prolaska te aktivnog prijenosa spoja (23). Pasivna difuzija ovisi o lipofilnosti i može se raščlaniti na dva procesa. Prvi je ulazak spoja u lipidnu membranu, a drugi izlazak iz membrane u vodeni unutarstanični okoliš (8). Korak koji određuje permeabilnost za hidrofilne spojeve je ulazak u membranu, dok je u slučaju lipofilnih spojeva izlazak iz membrane ograničavajući čimbenik ukupne permeabilnosti (38). Zato je pri razvoju novih lijekova važno održati lipofilnost u optimalnom području kako bi permeabilnost spoja bila zadovoljavajuća. U ovom kontekstu nije povoljna ni previsoka lipofilnost, jer spojevi visoke lipofilnosti imaju povećan rizik vezanja za prijenosnike u membranama (engl. *efflux pumps*), kao što je P-glikoprotein (engl. *P-glycoprotein*, P-gp) (5). Vezanje na P-gp može smanjiti ukupni prolazak spoja kroz membranu. Nadalje, lipofilnost je važan čimbenik u distribuciji lijeka u organizmu. Zadržavanje spoja u tkivima, izraženo preko njegovog volumena distribucije, najčešće je visoko za spojeve s višom vrijednosti lipofilnosti (5,39). Uz to, viša lipofilnost pogoduje i većem udjelu spoja vezanog na proteine plazme (40,41) što rezultira nižom slobodnom frakcijom spoja koja je dostupna za vezanje na farmakološku metu. Male molekule najlakše prolaze kroz krvno-moždanu barijeru, a vjerojatnost prolaska se povećava s povećanjem lipofilnosti spoja (42). Nadalje, spojevi s višim vrijednostima lipofilnosti su podložniji biotransformaciji jer pokazuju povećan afinitet prema aktivnim mjestima metaboličkih enzima. Iz istog razloga takvi spojevi imaju veću vjerojatnost za neželjene lijek-lijek interakcije (43). Spojevi s višim vrijednostima lipofilnosti češće se vežu na različite receptore prisutne u organizmu, što povećava njihovu neselektivnost, a time i moguću toksičnost (44,45).

Ovisno o log D vrijednosti pri pH 7,40, odnosno log $D_{7,40}$, molekule se mogu podijeliti u četiri skupine s tipičnim fizikalno-kemijskim i farmakokinetičkim svojstvima, kako je prikazano u Tablica 2.1. (23,46–48).

Tablica 2.1 Ovisnost fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava o log $D_{7,40}$ vrijednosti spoja.

	log $D_{7,40}$			
	<1	1 do 3	3 do 5	>5
Topljivost	Visoka	Umjerena	Niska	Niska
Permeabilnost	Niska (pasivni prijenos); moguća međustanična difuzija kad je $M_w^a < 200 \text{ Da}^b$	Umjerena	Visoka	Visoka (uz visoku mogućnost zadržavanja u membranama)
Prolazak kroz krvno-moždanu barijeru	Nizak	Umjeren	Visok	Visok
Metabolička stabilnost	Visoka	Visoka	Umjerena do niska	Niska
Volumen distribucije	Nizak	Umjeren	Visok	Visok (posebno za amine)
Oralna bioraspoloživost	Niska	Dobra	Umjerena do niska; varijabilna	Niska; varijabilna
Izlučivanje	Visoko, putem bubrega	Umjereno, metaboličkim putevima i/ili putem bubrega	Visoko, putem metaboličkih puteva	Visoko, putem metaboličkih puteva
Toksičnost	Niska	Niska	Potencijalno visoka	Visoka

^a Da – Dalton

^b M_w –molekulaska masa (engl. *molecular weight*)

Promatrajući farmakokinetičke profile ovisno o log $D_{7,40}$ vrijednostima spojeva prikazane u Tablica 2.1, može se zaključiti da optimalno područje lipofilnosti za potencijalni budući lijek pripada log $D_{7,40}$ vrijednostima između 0 i 3. Ovakvi spojevi najčešće imaju optimalne karakteristike u smislu dobre topljivosti i permeabilnosti te visoke metaboličke stabilnosti, a posljedično imaju i dobru bioraspoloživost. Također, često su umjereno distribuirani u tkivima te imaju mogućnost prelaska krvno moždane barijere. Uz to, zbog umjerene lipofilnosti nemaju nespecifičan afinitet za vezanje na široku lepezu različitih receptora pa je time smanjen rizik za toksičnost.

U posebnim slučajevima moguća su odstupanja od farmakokinetičkih parametara očekivanih na temelju log $D_{7,40}$ vrijednosti spoja. Tako se očekivane vrijednosti permeabilnosti ili prolaska kroz krvno-moždanu barijeru mogu promijeniti ovisno o tome je li molekula koja se istražuje pogodan supstrat za aktivni prijenos (49) ili inhibiciju P-gp-a (50). Dakle, lipofilnost, odnosno log $D_{7,40}$, može dati uvid u kategorizaciju istraživanog spoja, ali za racionalni dizajn novih kemijskih entiteta svakako treba potvrditi postoji li korelacija između lipofilnosti i farmakokinetičkog parametra koji se optimira. U tu svrhu se

često razvijaju modeli kvantitativnog odnosa strukture i svojstva spoja (engl. *quantitative structure-property relationship*, QSPR), u ovom slučaju to svojstvo je lipofilnost (15).

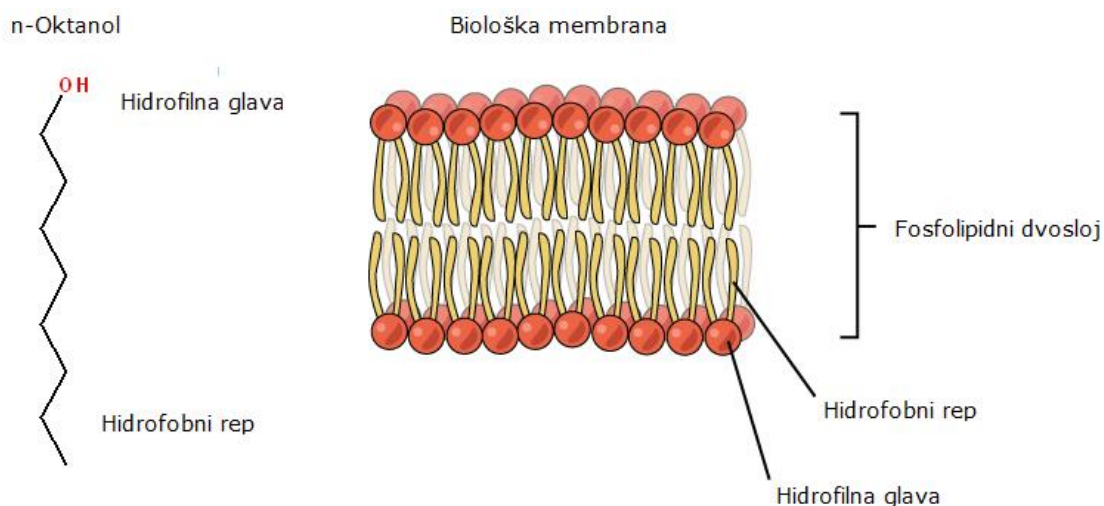
Lipofilnost je fizikalno-kemijsko svojstvo koje daje najviše informacija jer o njoj ovise farmakološki i ADME procesi. Povećanjem lipofilnosti mogu se generirati vrlo aktivni spojevi s lošim farmakokinetičkim profilom (38) i povećanim rizikom za toksične efekte (44). Zato je ključno održavanje optimalnog raspona lipofilnosti već u ranijim fazama probira novog kemijskog entiteta za daljnje profiliranje (37), pritom vodeći računa i o ostalim važnim svojstvima koji molekulu čine sličnu lijeku (engl. *drug-like properties*) (51).

2.3. Metode za određivanje lipofilnosti

Lipofilnost je fizikalno-kemijsko svojstvo koje se jako dugo koristi u istraživanju lijekova pa tako postoje brojne dobro poznate i uhodane eksperimentalne metode za njezino određivanje (5,16,47,52). Metode određivanja lipofilnosti mogu se podijeliti na direktne i indirektne (15,53). Upotrebom direktnih metoda, log P ili log D vrijednost se dobije izravno iz izmjerenih podataka. Primjeri takvih metoda su metoda izmućkivanja, metoda miješanja i potenciometrijska metoda. U slučaju indirektnih metoda za određivanje lipofilnosti, određuje se pokazatelj lipofilnosti koji je u korelaciji s log P ili log D vrijednosti pa tako u indirektno metoda spadaju kromatografske metode i metode kapilarne elektroforeze (26). Postoji i cijeli niz računalnih programa za *in silico* računanje pokazatelja lipofilnosti koji se često koriste za predviđanje lipofilnosti u ranim fazama istraživanja (54). U daljnjem tekstu ovog poglavlja prikazan je pregled metoda koje se najčešće koriste u istraživanju lijekova te njihove glavne prednosti i nedostaci.

2.3.1. Metoda izmućkivanja

Metoda izmućkivanja (engl. *shake-flask method*) je najstarija metoda za određivanje lipofilnosti. Riječ je o direktnoj metodi koja se smatra zlatnim standardom za određivanje lipofilnosti (55). Ova metoda se temelji na raspodjeli spoja između dvofaznog sustava čije se komponente ne miješaju. Kao vodena faza koristi se fosfatni pufer pri određenoj pH vrijednosti, dok se kao organska faza najčešće upotrebljava n -oktanol čija je uloga oponašati fosfolipidne dvosloje koji su glavni građevni elementi bioloških membrana (8). N -oktanol je odabran zbog svojih amfifilnih svojstava te zbog dielektrične konstante od $\epsilon = 10$ (56) koja je slična dielektričnoj konstanti hidrofilne glave koja gradi biološke membrane. Stoga je n -oktanol prikladan model za raspodjelu u biološkim sustavima (57). Slika 2.2 prikazuje kemijsku strukturu n -oktanola i pojednostavljeni prikaz biološke membrane.



Slika 2.2 Usporedba n-oktanola i fosfolipidnog dvosloja. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (58).

Uobičajena procedura određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja sastoji se od otapanja spoja u vodenoj otopini pufera, dodavanju n-oktanola te izmućkivanju do ravnotežnog stanja. Nakon toga slijedi proces odvajanja slojeva te kvantifikacija spoja u oba sloja (35). Metoda izmućkivanja zahtjeva kvantifikaciju spoja u vodenom i organskom sloju kako bi se mogla izračunati distribucija spoja i odrediti lipofilnost. U tu svrhu se najčešće koriste metode ultraljubičaste/vidljive (engl. *ultraviolet/visible light*, UV/Vis) spektroskopije ili tekućinske kromatografije s detektorom s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD) (59). Također, za kvantifikaciju spoja se može koristiti i spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS). Iako je moguće kvantificirati spoj u n-oktanolnom sloju, najčešći pristup uključuje mjerenje koncentracije u vodenoj fazi, dok se koncentracija u n-oktanolu određuje kao razlika izmjerene vrijednosti koncentracije u vodenoj fazi prije i nakon eksperimenta (26). Razlog tome su poteškoće prilikom rukovanja n-oktanolom i izazovi pri analizama takvih uzoraka. Naime, velika mogućnost kontaminacije MS detektora n-oktanolom može dovesti do supresije signala te pogrešaka u određivanju točnih koncentracija. Također, jako lipofilni spojevi zahtijevaju upotrebu mikrolitarskih količina n-oktanola za pouzdano određivanje lipofilnosti, što dodatno onemogućava direktnu analizu (60).

Najveća prednost metode izmućkivanja je to što je riječ o direktnoj metodi gdje se izravno određuje lipofilnost. Metoda je vrlo točna za mjerenje lipofilnosti u rasponu vrijednosti od -2 do 4. Međutim, ima i niz nedostataka. Vrlo je dugotrajna i potrebna je relativno visoka količina čistog uzorka za njezinu provedbu, što je često nemoguć zahtjev, osobito u ranim fazama istraživanja potencijalnog novog lijeka. Nadalje, vremenski je zahtjevnija jer je ponekad potrebno i do 24 sata da se postigne ravnotežno stanje raspodjele između dviju faza. Također, nije prikladna za testiranje spojeva slabe topljivosti u otopini pufera u kojoj

se eksperiment provodi (35,61). Nadalje, kako bi dobiveni rezultati bili precizni, potrebna je stroga kontrola velikog broja eksperimentalnih parametara jer promjenom eksperimentalnih uvjeta dolazi do drugačijeg rezultata lipofilnosti za isti analit (62). Također, metoda nije pogodna za testiranje spojeva sklonih degradaciji, kao ni površinski aktivnih molekula jer može doći do stvaranja emulzije i nemogućnosti odvajanja vodenog sloja od n-oktanola (60,63).

2.3.2. Minijaturizirane metode izmućkivanja u pločicama s 96 jažica

Mnoga istraživanja su provedena u svrhu uklanjanja ili minimiziranja nedostataka koje ima klasična metoda izmućkivanja. Glavni cilj je bio smanjenje količine uzorka potrebnog za provedbu eksperimenta, povećanje broja uzoraka koji se mogu testirati u jednom eksperimentu te usavršavanje razdvajanja n-oktanolnog i vodenog sloja nakon eksperimenta. Strategije za nadilaženje ovih poteškoća temelje se na minijaturizaciji metode provedbom eksperimenta u pločici s 96 jažica (55,64–68).

Jedan od primjera minijaturizacije klasične metode izmućkivanja je metoda zamrznute vodene faze koju su razvili Yamashita i suradnici (64). Eksperiment se provodi u pločici s 96 jažica te se u svakoj jažici provodi testiranje jednog spoja. Nakon miješanja n-oktanolne i vodene faze, slojevi se odvajaju na način da se vodena faza zamrzne te se s vrha ukloni sloj n-oktanola. Rezultati log $D_{7,4}$ vrijednosti dobiveni ovom metodom pokazuju izvrsnu korelaciju s rezultatima dobivenima klasičnom metodom, međutim metoda ima nekoliko nedostataka. Točke ledišta vode i n-oktanola (0 °C za vodi i -15 °C za n-oktanol (69)) vrlo su bliske pa je vremenski prozor zamrzavanja vodenog sloja, dok je n-oktanolni još u tekućoj fazi, dosta uzak. Također, zbog zaostajanja n-oktanola u vodenoj fazi potrebni su dodatni koraci njegovog uklanjanja što produžuje i otežava provedbu eksperimenta.

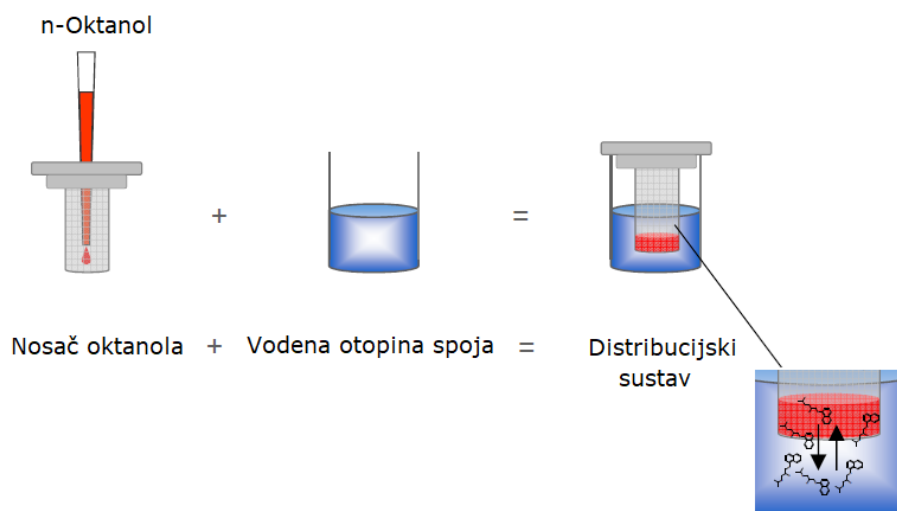
Drugi pristup minijaturizaciji temelji se na injektiranju uzoraka iz pločice s 96 jažica u kojoj se provodi eksperiment, bez prethodnog odvajanja vodene i n-oktanolne faze (65–67). Dodatno ubrzanje uključuje testiranje smjese spojeva, pri čemu se u svakoj jažici testira 10 spojeva istovremeno (55). Iako ovaj pristup omogućava značajno ubrzanje i mogućnost profiliranja puno većeg broja spojeva u usporedbi s klasičnom metodom izmućkivanja, postoji velika mogućnost da se uzorak kontaminira n-oktanolom prilikom injektiranja. Ovo može značajno utjecati na rezultate za spojeve više lipofilnosti čija je koncentracija u n-oktanolu značajno viša od one u vodenoj fazi. Iako je razvijen poseban način injektiranja u kojem se prije injektiranja vodene faze injektira mali vodeni čep koji služi kao repelent pri prolasku kroz n-oktanolni sloj (65), kontaminacija vrha igle za injektiranje i dalje može biti značajna (68).

2.3.3. Minijaturizirana metoda izmućkivanja upotrebom nosača za n-oktanol

Najznačajniji pomak za rješavanje problema odvajanja slojeva nakon eksperimenta nastao je uvođenjem dodatne pločice s 96 jažica koja služi kao nosač n-oktanola i koja se tijekom eksperimenta postavlja na pločicu s 96 jažica u kojoj je vodena faza. Ideja o upotrebi nosača za n-oktanol proizašla je iz prijašnjih istraživanja u kojima je n-oktanol imobiliziran na nosač korišten za mjerenje koeficijenta distribucije klasičnom metodom na velikoj skali (70,71). Također, pri provedbi testa permeabilnosti upotrebom paralelne umjetne membrane (engl. *parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA) n-oktanol se imobilizira na poliviniliden fluoridni (PVDF) filter te ima ulogu umjetne membrane, a log D koeficijent se može izračunati iz zadržavanja spoja u tako pripremljenoj umjetnoj membrani (72).

Distribucijski sustav uz pomoć nosača n-oktanola

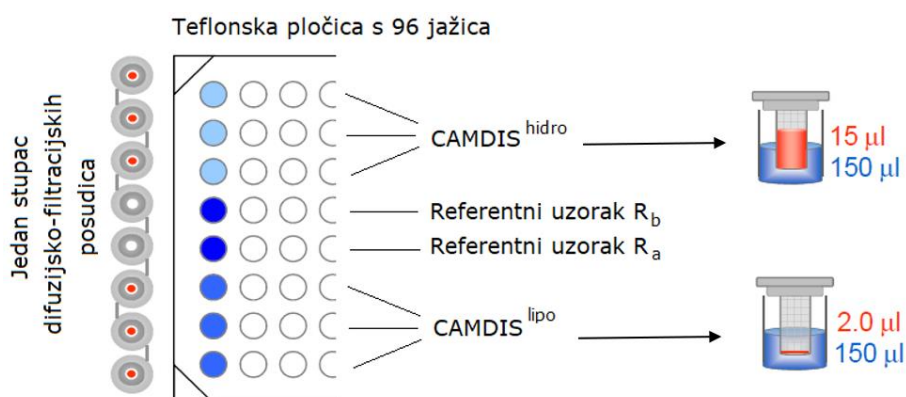
Ideja o upotrebi pločice s posudicama s PVDF filterima koja služi kao nosač n-oktanola primijenjena je na klasičnu metodu izmućkivanja. Riječ je o termodinamičkom mjerenju lipofilnosti u sustavu n-oktanola i vodene otopine pufera pri pH vrijednosti od 7,40 pri čemu se eksperiment provodi u formatu s 96 jažica. Na ovaj način je razvijena visokoprotočna (engl. *high-throughput*) metoda izmućkivanja za određivanje lipofilnosti, koja se naziva distribucijski sustav uz pomoć nosača (engl. *carrier mediated distribution system*, CAMDIS) (73). Uloga nosača je ukloniti probleme vezane za razdvajanje slojeva nakon eksperimenta što značajno olakšava provedbu eksperimenta. Shematski prikaz distribucijskog sustava prikazan je na Slika 2.3.



Slika 2.3 Shematski prikaz distribucijskog sustava uz pomoć nosača.

Eksperimentalne postavke CAMDIS metode

CAMDIS je eksperiment kojim se mjeri koncentracijski omjer spoja u n-oktanolnom i vodenom sustavu (73). Shematski prikaz aparature koja se koristi u ovom eksperimentu je prikazan na Slika 2.4.



Slika 2.4 Shematski prikaz eksperimentalne postavke za provedbu CAMDIS eksperimenta.

Kao nosač n-oktanola koristi se difuzijsko-filtracijska (engl. *diffusion-filtration*, DIFI) pločica. Pločica se sastoji od 12 međusobno povezanih stupaca, od kojih svaki sadrži 8 DIFI posudica. Na dnu svake DIFI posudice nalazi se PVDF filter. Prije eksperimenta prve tri posudice u stupcu napune se s 15 µl n-oktanola, sljedeće dvije ostave se prazne i služe za referentne uzorke, dok se na zadnje tri nanese 2 µl n-oktanola. Uzorci dobiveni iz jažica s 15 µl n-oktanola nazivaju se CAMDIS^{hidro}, dok se uzorci iz jažica s 2 µl n-oktanola zovu CAMDIS^{lipo} uzorci. Odabiru se ovi volumeni n-oktanola jer je na taj način pokriven širok raspon log D vrijednosti koji se može pouzdano odrediti ovom metodom. Stoga se iz CAMDIS^{hidro} uzoraka dominantno određuju log D vrijednosti u rasponu lipofilnosti od -0,2 do 2,5. S druge strane, CAMDIS^{lipo} uzorci koriste se za određivanje lipofilnosti za spojeve s log D vrijednostima u rasponu od 0,9 do 3,8 (73). Treba naglasiti da su ove granice okvirne te da ovise o karakteristikama samog spoja koji se profilira.

Vodeni dio distribucijskog sustava se priprema u posebno dizajniranoj teflonskoj pločici s 96 jažica. U svaki stupac pločice se raspoređi 150 µl vodene otopine spoja u puferu pri pH 7,40 za po tri CAMDIS^{hidro} i tri CAMDIS^{lipo} replike, čije pozicije odgovaraju onima u stupcu DIFI pločice. Četvrta i peta pozicija u stupcu teflonske pločice služe za referentne uzorke. Na četvrtoj poziciji nalazi se referentni uzorak R_b koji predstavlja početnu koncentraciju spoja od 28,5 mM (mM = 10⁻³ mol l⁻¹). Upotrebom tako visoke koncentracije minimizira se efekt zadržavanja spoja na PVDF filteru. Naime, PVDF filter ima negativni površinski potencijal pa djeluje kao stupica za pozitivno nabijene bazične spojeve pa zbog toga dobivene log D vrijednosti mogu biti precijenjene za tu klasu spojeva. Peta pozicija u stupcu je namijenjena za referentni uzorak R_a, koji je dobiven razrjeđenjem referentnog R_b uzorka fosfatnim puferom (1:5, V / V). Omjer između referentnih uzoraka R_a i R_b daje informaciju

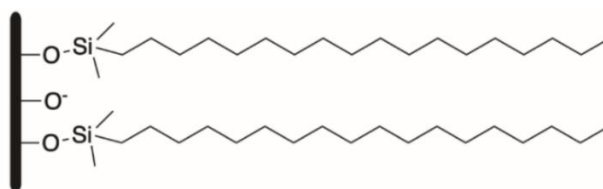
o potencijalnoj precipitaciji spoja tijekom eksperimenta (izrazito visoka vrijednost omjera) ili visokog afiniteta za vezanje na plastični nosač PVDF filtera (visoka vrijednost omjera pri formiranju agregata ili niska vrijednosti omjera pri jednoslojnoj adsorpciji na plastičnu površinu).

CAMDIS metoda je visokoprotočna automatizirana metoda koja omogućava određivanje lipofilnosti velikog broja spojeva u relativno kratkom roku jer za provedbu eksperimenta koristi pločice s 96 jažica. Uz opisane eksperimentalne postavke moguće je testirati širok raspon lipofilnosti jer se u eksperimentu koriste dva različita volumena *n*-oktanola. Upotrebom nosača *n*-oktanola spriječen je često dugotrajan korak razdvajanja slojeva nakon eksperimenta. Literaturno je pokazana izvrsna korelacija između CAMDIS log *D* vrijednosti i log *D* vrijednosti dobivenih klasičnom metodom izmućkivanja za skupinu od 52 strukturno različita komercijalna spoja, koja je sadržavala kiseline, bazične i neutralne spojeve, kao i dipolarne ione (engl. *zwitterion*).

2.3.4. Određivanje lipofilnosti upotrebom RP-HPLC metoda

Tekućinska kromatografija ima važnu ulogu u direktnim metodama određivanja lipofilnosti gdje se koristi za kvantifikaciju količine analita u organskoj i vodenoj fazi. Prikladna je za analize spojeva veće strukturne raznolikosti u usporedbi s plinskom kromatografijom i pruža bolju osjetljivost od UV/Vis spektroskopije, što je posebno važno za spojeve visoke lipofilnosti čije su koncentracije u vodenom sloju izrazito niske (16).

Indirektne metode određivanja lipofilnosti se, uz iznimku kapilarne elektroforeze, oslanjaju isključivo na različite kromatografske tehnike (16,26). Najčešće korištena kromatografska tehnika za određivanje lipofilnosti je RP-HPLC (14,16,74). Kao vodeni dio pokretne faze koristi se puferska otopina pri određenoj pH vrijednosti, najčešće fiziološkoj od 7,40. Kao organsko otapalo u pokretnoj fazi može se koristiti metanol ili acetonitril. Prednost metanola je u tome što može stvarati vodikovih veza pa time minimalno narušava trodimenzionalnu strukturu vode (75,76). S druge strane, pri upotrebi acetonitrila dobiva se bolja korelacija s podacima dobivenima metodom izmućkivanja (77). Što se tiče nepokretne faze, postoji vrlo veliki broj komercijalno dostupnih reverzno faznih kromatografskih kolona, a u svrhu određivanja lipofilnosti najčešće se koriste kolone s oktadecil (C18) alkilnim skupinama vezanima na silikagel (Slika 2.5) (35,15,16,78,79).



Slika 2.5 Oktadecil (C18) nepokretna faza vezana na silikagel. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (16).

U usporedbi s klasičnom metodom izmućkivanja, RP-HPLC metode nude niz značajnih prednosti. Ponovljivost takvih metoda vrlo je visoka, a provedba mjerenja je relativno brza jer se kao mjera lipofilnosti određuje vrijeme zadržavanja, koje je neovisno o koncentraciji analita. Pritom prisutnost eventualnih nečistoća u uzorku ne utječe na dobiveni rezultat. Za provedbu mjerenja je potrebna mala količina uzorka što je osobito važno u ranim fazama istraživanja kad je količina spoja ograničena (15,35,79).

Ni jedna RP-HPLC metoda za određivanje lipofilnosti kao rezultat ne daje koeficijent raspodjele, nego se mjeri pokazatelj lipofilnosti koji je u korelaciji s istim. Naime, razdjeljivanje analita između polarne pokretne i nepolarne nepokretne faze je u direktnoj vezi s njegovom lipofilnošću pa se tako hidrofilni spojevi s kolone ispiru prvi, dok se spojevi više lipofilnosti duže zadržavaju na nepokretnoj fazi. Vrijeme zadržavanja spoja je prava mjera raspodjele između nepokretne i pokretne faze, a izražava se preko faktora zadržavanja k prema Jednadžba 2.3 (35,63).

$$\log k = \log \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$$

Jednadžba 2.3 Računanje faktora zadržavanja, k .

gdje je:

- $\log k$ – logaritamska vrijednost faktora zadržavanja;
- t_0 – vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja (engl. *dead retention time*);
- t_R – vrijeme zadržavanja analita.

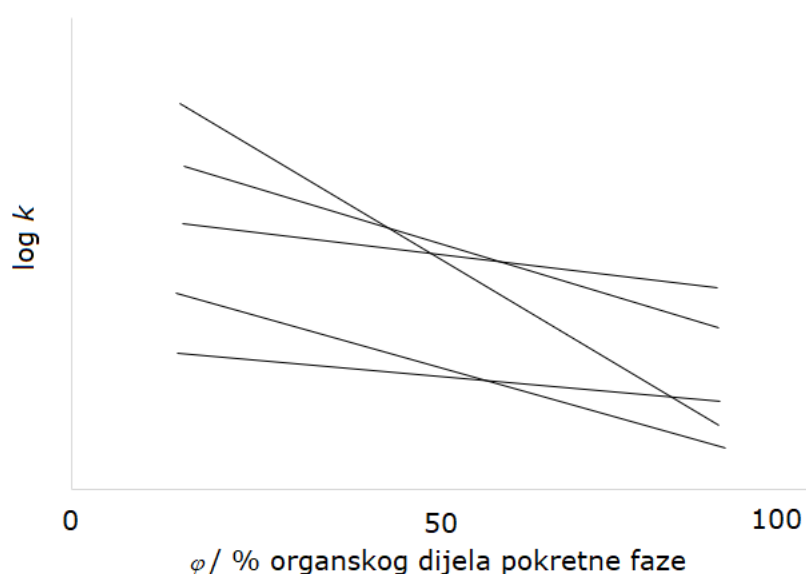
Važno je naglasiti da se faktor zadržavanja ne može promatrati kao univerzalni pokazatelj lipofilnosti jer ovisi o primijenjenim eksperimentalnim uvjetima. Glavni parametri koji utječu na vrijeme zadržavanja analita, a time i na njegov faktor zadržavanja, su vrsta punila kromatografske kolone, njezina duljina i promjer, ali i sastav i protok pokretne faze (80). Također, iz Jednadžba 2.3 može se zaključiti da faktor zadržavanja ovisi i o vremenu zadržavanja nezadržanog analita t_0 , koje, osim o eksperimentalnim uvjetima, ovisi i o karakteristikama instrumenta na kojem se analize provode. S obzirom na to da pouzdanost određivanja lipofilnosti kromatografskom metodom ovisi isključivo o mogućnosti točnog određivanja vremena zadržavanja analita, javlja se potreba za standardizacijom pokazatelja lipofilnosti koji se dobije upotrebom RP-HPLC sustava. Time bi određivanje

lipofilnosti bilo pouzdanije te bi se pokazatelji dobiveni na različitim sustavima mogli međusobno uspoređivati.

RP-HPLC analize mogu se provoditi u izokratnom načinu ispiranja, pri čemu je sastav pokretne faze konstantan tijekom cijelog trajanja analize, ili u gradijentnom načinu ispiranja, pri čemu se volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi tijekom analize povećava.

2.3.4.1. Izokratne RP-HPLC metode za određivanje lipofilnosti

Jedan od pristupa određivanja lipofilnosti pomoću RP-HPLC tehnike je provedba polikratne metode (81–83). Za ovakav pristup potrebno je provesti više izokratnih ispiranja pri različitim volumnim udjelima organskog otapala u pokretnoj fazi. Pritom se određuje faktor zadržavanja $\log k$ za svaku provedenu analizu, koji se za ovu primjenu naziva izokratni indeks lipofilnosti. Pri određenim izokratnim uvjetima analize, $\log k$ vrijednost različitih spojeva može biti ista. Kako je $\log k$ vrijednost pokazatelj lipofilnosti spoja, ista $\log k$ vrijednost bi značila da oni imaju istu lipofilnost, ali to ne mora nužno biti točno (84). Ako se u ovisnost dovedu $\log k$ vrijednosti i volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi, dobije se pravac za svaki ispitivani spoj (Slika 2.6).



Slika 2.6 Ovisnost izokratnog indeksa lipofilnosti $\log k$ o volumnom udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi φ za strukturno različite spojeve.

Tako dobiveni pravci za strukturno različite spojeve imaju značajno različite nagibe i odsječke na ordinati, što proizlazi iz njihove različite lipofilnosti. Zbog toga se kao mjera lipofilnosti umjesto $\log k$ češće koristi polikratni indeks lipofilnosti $\log k_w$, koji predstavlja faktor zadržavanja za određeni spoj kad bi se kao pokretna faza koristila samo vodena otopina bez organskog otapala. Kako u praksi za većinu spojeva nije moguće direktno

izmjeriti $\log k_w$, procedura računanja $\log k_w$ vrijednosti uključuje višestruka mjerenja $\log k$ vrijednosti pri različitim volumnim udjelima organskog otapala u pokretnoj fazi, nakon čega slijedi linearna regresija njihove ovisnosti (15,26). Ekstrapolacijom dobivenog pravca može se očitati odsječak na ordinati koji predstavlja $\log k_w$ vrijednost ispitivanog spoja. Pri provođenju ovakve ekstrapolacije, koristi se Jednadžba 2.4 (85,86).

$$\log k = S \times \varphi + \log k_w$$

Jednadžba 2.4 Ovisnost logaritamske vrijednosti izokratnog indeksa lipofilnosti $\log k$ o volumnom udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi.

gdje je:

- $\log k$ – izokratni indeks lipofilnosti, logaritamska vrijednost faktora zadržavanja pri određenom volumnom udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi;
- S – nagib pravca;
- φ - volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi;
- $\log k_w$ – polikratni indeks lipofilnosti, odnosno logaritamska vrijednost faktora zadržavanja pri 100 % vodene otopine u pokretnoj fazi.

Polikratna metoda određivanja lipofilnosti je relativno pouzdana kad se određuju $\log k$ vrijednosti u rasponu od 0 do 1 (87), odnosno -0,5 do 1,5 (14). Za $\log k$ vrijednosti izvan ovog raspona, korelacija između $\log k$ i volumnog udjela organskog otapala u pokretnoj fazi nije uvijek linearna, zbog čega je moguće dobiti različite $\log k_w$ vrijednosti ovisno o volumnim udjelima organskog otapala koji se koriste za analize (88). Također, upotrebom različite vrste organskog otapala dobivaju se različite $\log k_w$ vrijednosti. Vrijednosti dobivene za strukturno različite spojeve često ne koreliraju dobro s podacima dobivenima metodom izmućkivanja (14).

Ukoliko se želi postići bolja korelacija pokazatelja lipofilnosti dobivenih metodom izmućkivanja, u Jednadžba 2.4 potrebno je uvesti nagib S kao drugu neovisnu varijablu (14), kako je prikazano Jednadžba 2.5.

$$\log P = a \times S + b \times \log k_w + c$$

Jednadžba 2.5 Ovisnost logaritamske vrijednosti koeficijenta raspodjele $\log P$ o nagibu S i polikratnom indeksu lipofilnosti $\log k_w$.

gdje je:

- $\log P$ – logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele;
- S – nagib pravca;
- $\log k_w$ – polikratni indeks lipofilnosti, odnosno logaritamska vrijednost faktora zadržavanja pri 100 % vodene otopine u pokretnoj fazi.

Vrijednost $\log k_w$ može se očitati kao odsječak na ordinati, a iz omjera regresijskih koeficijenata a i b može se odrediti volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi pri kojem treba ekstrapolirati $\log k$ vrijednost kako bi se dobila najbolja korelacija s $\log P$ vrijednošću (89).

Dobru korelaciju s $\log P$ vrijednostima strukturno različitih spojeva daje i kvocijent nagiba S i odsječka $\log k_w$ iz Jednadžba 2.4. Dobivena vrijednost naziva se izokratni indeks hidrofobnosti φ_0 (Jednadžba 2.6) (90,91).

$$\varphi_0 = - \frac{\log k_w}{S}$$

Jednadžba 2.6 Računanje izokratnog indeksa hidrofobnosti φ_0 .

gdje je:

- φ_0 – izokratni indeks hidrofobnosti;
- $\log k_w$ – polikratni indeks lipofilnosti, odnosno logaritamska vrijednost faktora zadržavanja pri 100 % vodene otopine u pokretnoj fazi;
- S – nagib pravca.

Vrijednost izokratnog indeksa hidrofobnosti φ_0 predstavlja volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi pri kojem je zadržavanje analita točno dvostruko duže od vremena zadržavanja spoja koji se ne zadržava na kromatografskoj koloni, odnosno kad je $\log k$ vrijednost ispitivanog spoja jednaka nuli. To znači da φ_0 predstavlja iznos volumnog udjela organskog dijela pokretne faze pri kojem je raspodjela analita između pokretne i nepokretne faze jednaka. Za razliku od prethodno opisanih pokazatelja lipofilnosti, vrijednost izokratnog indeksa hidrofobnosti φ_0 ovisna je samo o vrsti organskog otapala koje se koristi tijekom analize, dok je neovisna o ostalim eksperimentalnim uvjetima (90).

Izokratni načini određivanja bilo kojeg od opisanih pokazatelja lipofilnosti su dugotrajni jer je za dobivanje podataka za jedan spoj najprije potrebno provesti preliminarne analize. Razlog tome je što vrijeme zadržavanja spojeva na kromatografskoj koloni može biti vrlo različito pa tako neki spojevi uopće ne ostvaruju interakciju s nepokretnom fazom, dok se drugi zadržavaju jako dugo. Na temelju preliminarnih analiza određuju se volumni udjeli organskog otapala u pokretnoj fazi koji su prikladni za određeni spoj, nakon čega se provode višestruke izokratne analize za određivanje $\log k$ vrijednosti (92). Nadalje, za spojeve koji ostvaruju jaku interakciju s nepokretnom fazom određivanje faktora zadržavanja može biti zahtjevno zbog širenja kromatografskih pikova pri izokratnim analizama.

2.3.4.2. Gradijentne RP-HPLC metode za određivanje lipofilnosti

Kako bi se izbjegle poteškoće do kojih dolazi pri provedbi izokratnih mjerenja, lipofilnost se može određivati RP-HPLC metodom uz gradijentno ispiranje (22). Prilikom ovakvih analiza, sastav pokretne faze se mijenja na način da analiza počinje s visokim udjelom vodene otopine u pokretnoj fazi, dok se tijekom analize udio organskog otapala u pokretnoj fazi povećava. Prednost gradijentnih metoda nad izokratnim leži u tome što se jednom analitičkom metodom može pokriti širok raspon lipofilnosti zbog postepenog povećanja volumnog udjela organskog otapala u pokretnoj fazi, što omogućava analizu vrlo hidrofilnih i vrlo lipofilnih spojeva istom kromatografskom metodom. Pri analizama za određivanje lipofilnosti, najčešće se koristi kromatografska metoda u trajanju do pet minuta (26,77). Upotrebom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) te kraćih kromatografskih kolona s manjim promjerom punila moguće je dodatno skratiti metodu na oko dvije minute (93).

Postoji niz literaturno opisanih gradijentnih metoda za određivanje lipofilnosti (15,94–96), a jedna od najjednostavnijih i najčešće primjenjivanih je CHI metoda koju su razvili Valko i suradnici (14,22,26,77,93). Upotrebom CHI metode, kao pokazatelj lipofilnosti određuje se kromatografski indeks hidrofobnosti istraživog spoja, CHI. Ovaj parametar predstavlja poveznicu između izokratnih i gradijentnih mjerenja. Naime, u prethodnom poglavlju je opisano kako je nađena vrlo dobra korelacija između log P vrijednosti dobivenih metodom izmućkivanja i izokratnog indeksa hidrofobnosti φ_0 pri kojem je raspodjela analita između pokretne i nepokretne faze jednaka (90). Također, pokazano je da je za određeni analit vrijednost φ_0 , koja se određuje izokratnim mjerenjima, u linearnoj ovisnosti s njegovim gradijentnim vremenom zadržavanja te je isto nađeno i za odabranu kalibracijsku skupinu od 10 spojeva (22). Zato je φ_0 vrijednostima koje pripadaju kalibracijskim spojevima pripisan naziv kromatografskog indeksa hidrofobnosti, CHI. Korištenjem gradijentnih vremena zadržavanja kalibracijske skupine spojeva i njihovih CHI vrijednosti moguće dobiti jednadžbu s nagibom A i odsječkom B (Jednadžba 2.7) koja se koristi za prevođenje gradijentnog vremena zadržavanja bilo kojeg analita u njegovu CHI vrijednost.

$$\text{CHI} = A \times t_R + B$$

Jednadžba 2.7 Kalibracijska jednadžba za računanje CHI vrijednosti.

gdje je:

- CHI – vrijednost kromatografskog indeksa hidrofobnosti kalibracijskog standarda;
- t_R – vrijeme zadržavanja kalibracijskog standarda.

Mjerenje CHI vrijednosti provodi se upotrebom C18 kromatografske kolone te primjenom gradijentnog načina ispiranja s otopinom amonijevog acetata pri pH 7,40 kao vodenim

dijelom te acetonitrilom kao organskim dijelom pokretne faze. Pri gradijentnim analizama, kad volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi dostigne određenu vrijednost, spoj se ispire s kromatografske kolone brzinom približno jednakoj brzini pokretne faze. Pri kojem udjelu organskog dijela pokretne faze će doći do ispiranja analita ovisi o prirodi samog analita. Upravo CHI vrijednost predstavlja približni volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi koji je potreban da se spoj ispere s kromatografske kolone (77). Skupina od 10 kalibracijskih standarda s poznatim CHI vrijednostima koristi se za kalibraciju RP-HPLC sustava prije mjerenja za određivanje lipofilnosti ispitivanih spojeva (22,26,77) što omogućava usporedbu rezultata između laboratorija.

Vrijednosti CHI kreću se u rasponu od 0 do 100. Što je vrijednosti viša, viša je i lipofilnost spoja te je potreban viši udio organskog otapala u pokretnoj fazi za ispiranje spoja s kromatografske kolone. Kako skala od 0 do 100 nije uobičajena za izražavanje lipofilnosti, CHI vrijednosti se mogu prevesti na $\log D$ skalu. U tu svrhu je provedena korelacija $\log D$ vrijednosti pri pH 7,40 i CHI vrijednosti za oko 40 000 spojeva kako bi se dobila jednadžba za računanje Chrom $\log D$ vrijednosti (Jednadžba 2.8) (38).

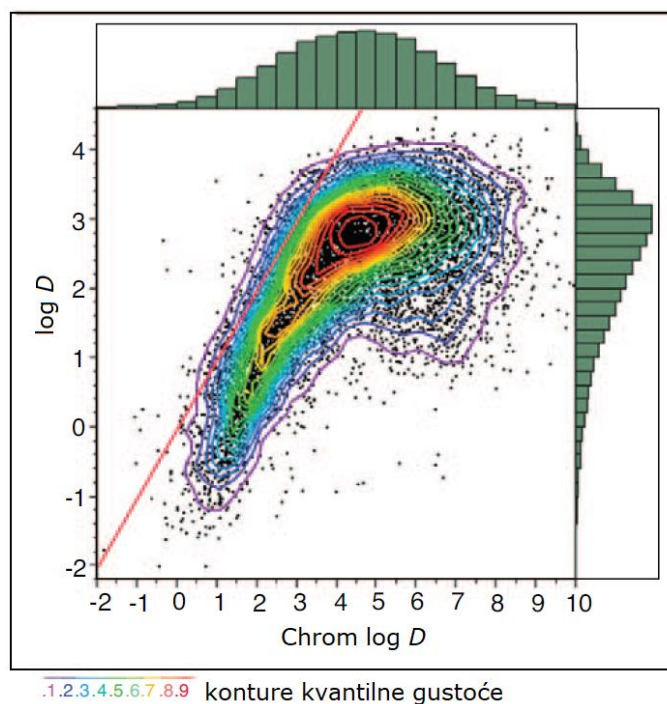
$$\text{Chrom } \log D = 0,0857 \times \text{CHI} - 2$$

Jednadžba 2.8 Računanje Chrom $\log D$ vrijednosti.

gdje je:

- Chrom $\log D$ – kromatografski pokazatelj lipofilnosti istraživanog spoja;
- CHI – vrijednost kromatografskog indeksa hidrofobnosti ispitivanog spoja.

Chrom $\log D$ vrijednost je u linearnoj ovisnosti s CHI vrijednosti te daje u prosjeku dvije logaritamske jedinice višu vrijednost lipofilnosti u usporedbi se $\log D$ vrijednostima dobivenim metodom izmućkivanja. Pokazno je da Chrom $\log D$ vrijednosti za spojeve s nižim vrijednostima lipofilnosti dobro koreliraju s $\log D$ vrijednostima dobivenima metodom izmućkivanja, dok je na hidrofobnijem dijelu skale korelacija slabija (Slika 2.7) (38). Razlog tome je što kromatografska metoda ima širi linearni raspon te nije ograničena topljivošću spoja kao što je slučaj s metodom izmućkivanja.



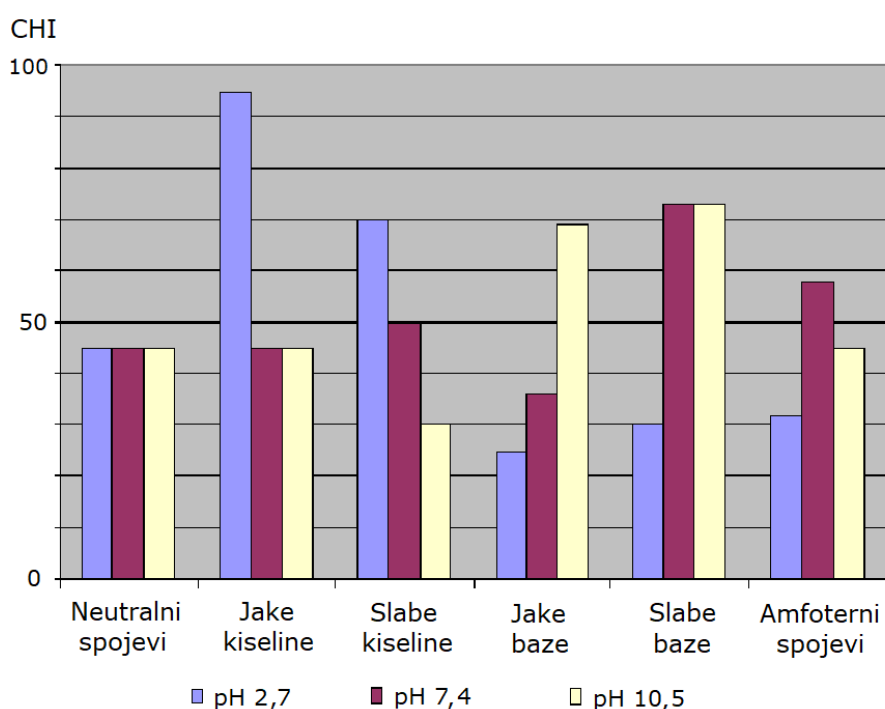
Slika 2.7 Ovisnost log D vrijednosti dobivene metodom izmućkivanja o Chrom log D vrijednosti. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (38).

Uz već prethodno opisane prednosti koje kromatografske metode za određivanje lipofilnosti imaju ispred metode izmućkivanja, u smislu jednostavnosti i ponovljivosti, najveća prednost gradijentne CHI metode je što se u kratkom vremenskom roku može profilirati jako velik broj spojeva, što ovu metodu svrstava u skupinu visokoprotčnih metoda. Kromatografski određena lipofilnost bi u usporedbi s klasičnom metodom izmućkivanja trebala biti bolji model za procese *in vivo* distribucije jer su oba procesa dinamična i događaju se na velikim površinama (nepokretna faza kod kromatografske metode odnosno protein/fosfolipidna membrana u biološkom sustavu) (97).

Važni procesi kojima podliježe lijek u organizmu su pasivna difuzija kroz biološke membrane te vezanje na proteine krvne plazme. Jedna od najvećih prednosti HPLC tehnike za mjerenje svojstava spojeva leži u velikoj raznolikosti dostupnih nepokretnih faza, uključujući i one koje oponašaju biološki važne komponente, kao što su proteini ili membrane. Upotrebom biomimetičkih kolona mogu se odrediti pokazatelji lipofilnosti koji opisuju raspodjelu spoja u biološkim sustavima. Molekule koje se istražuju kao novi lijekovi mogu se profilirati pomoću kromatografske kolone s imobiliziranom umjetnom membranom (engl. *immobilized artificial membrane*, IAM) pri čemu se određuje pokazatelj lipofilnosti koji opisuje interakciju spoja s biološkom membranom (98,99). Uz IAM kolone, važne su i kolone s vezanim ljudskim serumskim albuminom (engl. *human serum albumin*, HSA) i s α -1-kiselim glikoproteinom (engl. *α -1-acid glycoprotein*, AGP) koje se koriste za proučavanje interakcija lijeka s proteinima krvne plazme (93,100–102).

2.3.4.3. Utjecaj ionizacije na vrijeme zadržavanja spoja te određivanje kiselobaznih svojstava

Raspodjela spoja u sustavu n-oktanol-voda ovisi o pH vrijednosti pufera koji se koristi u eksperimentu pa tako i vrijeme zadržavanja analita na kromatografskoj koloni ovisi o pH vrijednosti puferne otopine koja se koristi kao vodeni dio pokretne faze (103). Pomoću kromatografskih metoda moguće je odrediti kiselobazni karakter novih spojeva koji igra ključnu ulogu u procesima *in vivo* distribucije (97). Novi spojevi koji se razvijaju kao potencijalni lijekovi često posjeduju ionizabilne skupine pa njihova lipofilnost ovisi o pH vrijednosti pokretne faze. Pritom će spojevi u ioniziranom obliku imati značajno niže zadržavanje na kromatografskoj koloni u RP-HPLC sustavu od njihove neionizirane forme. Pomoću tri gradijentne analize, primjenom kiselih (pH 2,70), neutralnih (pH 7,40) i bazičnih (pH 10,5) uvjeta pokretne faze, moguće je odrediti kiselobazni profil novih spojeva (26,77,104,105). Gradijentne metode koje se koriste u tu svrhu su jednake onoj koju primjenjuje CHI metoda opisana u prethodnom poglavlju, s razlikom u pH vrijednosti puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze. Svako mjerenje počinje kalibracijom RP-HPLC sustava upotrebom 10 kalibracijskih standarda s CHI vrijednostima karakterističnim za pojedinu pH vrijednost, nakon čega slijedi procedura i obrada podataka jedna onoj koja se provodi upotrebom CHI metode.



Slika 2.8 Kategorizacija spojeva ovisno o njihovom kiselobaznom karakteru pomoću CHI vrijednosti ovisno o pH vrijednosti puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (105).

Slika 2.8 prikazuje kategorizaciju spojeva prema njihovom kiselo-baznom karakteru na temelju dobivenih CHI vrijednosti pri kiseloj, neutralnoj i baznoj pH vrijednosti puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze. Bazični spojevi će imati najvišu lipofilnost pri visokim pH vrijednostima gdje su prisutni u neutralnoj formi, dok će pri niskim pH vrijednostima biti u ioniziranom obliku i brže se ispirati s kromatografske kolone pa samim time imati i nižu lipofilnost. S druge strane, spojevi koji imaju kiseli karakter će najvišu lipofilnost pokazivati pri niskim pH vrijednostima gdje je dominantna njihova neutralna forma, dok će povećanjem pH vrijednosti doći do smanjenja njihove lipofilnosti uslijed ionizacije spoja. Amfoterni spojevi će najvišu lipofilnost imati pri neutralnoj pH vrijednosti pokretne faze, dok će se pomicanjem prema ekstremnim pH vrijednostima njihova lipofilnost smanjivati zbog ionizacije bazične skupine pri nižoj pH, odnosno kisele skupine pri višoj pH vrijednosti. Promjena pH vrijednosti pokretne faze ne utječe na lipofilnost neutralnih molekula te je ona konstantna neovisno o primijenjenom pH.

2.3.5. Računalno određivanje lipofilnosti

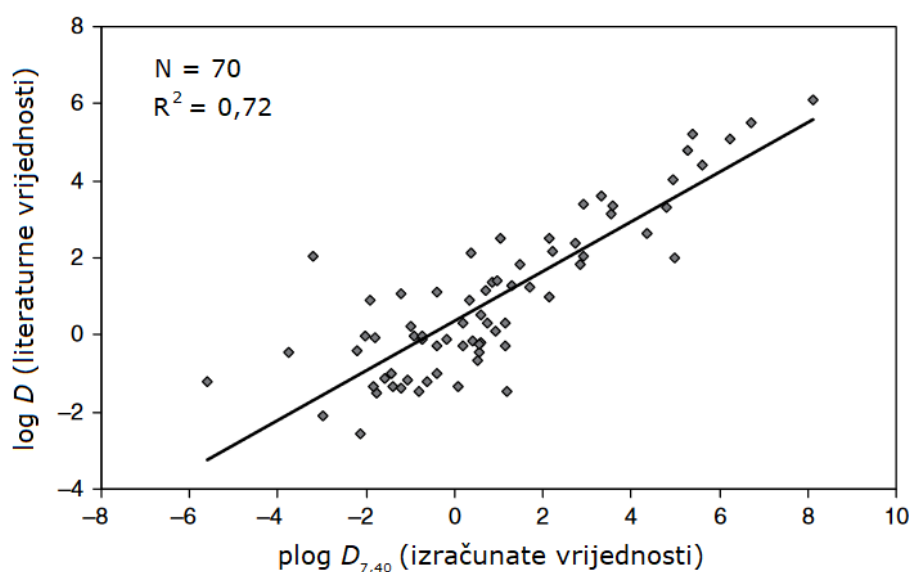
Nakon što je otkriveno da se $\log P$ vrijednost molekule može izračunati fragmentacijskom metodom zbrajanja lipofilnosti svih njezinih strukturnih podjedinica (106), razvijen je cijeli niz računalnih programa za *in silico* predviđanje lipofilnosti novih spojeva. Svi programi razvijeni su na temelju eksperimentalno određenih lipofilnosti velikog seta molekula pa je vrlo važna točnost mjerenih podataka koji se koriste za kreiranje modela. Kako se određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja koristi već dugi niz godina te je riječ o dobro istraženoj i robusnoj metodi, točne eksperimentalne vrijednosti lipofilnosti su dostupne za velik broj spojeva, što značajno doprinosi točnosti *in silico* predviđanja ovog svojstva. Osim o broju molekula na temelju kojih je baza napravljena, točnost predviđanja ovisi i o strukturnoj raznolikosti baze, odnosno sličnosti molekula čija se lipofilnost predviđa s molekulama korištenim za razvoj modela pa se preferira da spojevi korišteni za razvoj modela pripadaju različitim strukturnim klasama (23,107).

Računalni pokazatelj lipofilnosti koji se najčešće računa je $\log P$ jer je algoritam za njegovo računanje značajno jednostavniji od onog za računanje $\log D$ vrijednosti (43). Razlog tome je što je za predviđanje $\log D$ vrijednosti potrebno prethodno izračunati pK_a vrijednost spoja, čime se u računanje unosi dodatna pogreška.

Predviđanje $\log P$ i $\log D$ vrijednosti pomoću računalnih programa ima niz prednosti (23), kao što su relativna točnost, brzina i dostupnost samog programa. Upotrebom računalnih metoda, lipofilnost se može izračunati za spojeve čija sinteza se tek planira te rezultati nisu osjetljivi na moguće interferencije potekle od prisutnih nečistoća. Točnost određene lipofilnosti nije ograničena topljivošću spoja kao što je to slučaj u eksperimentalnim

metodama. Računalni programi imaju širok dinamički raspon te su jeftiniji od provedbe eksperimenata određivanja lipofilnosti.

Računalni programi za *in silico* predviđanje lipofilnosti imaju i ograničenja. Primjerice, izračunate log P vrijednosti upotrebom različitih programa mogu varirati i do dvije logaritamske jedinice ovisno o modelu koji se koristi (108,109). Također, mogu se razlikovati od eksperimentalnih vrijednosti prosječno oko jedne log D jedinice (Slika 2.9). Ipak, točnost usporedbe lipofilnosti spojeva unutar iste klase koji imaju male strukturne razlike je visoka (23). Također, pouzdanost izračunatih vrijednosti je niska u slučaju spojeva visoke strukturne kompleksnosti (63).



Slika 2.9 Korelacija literaturnih i izračunatih log $D_{7,40}$ vrijednosti (koristeći Prolog D računalni program) za 70 komercijalnih lijekova. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (24).

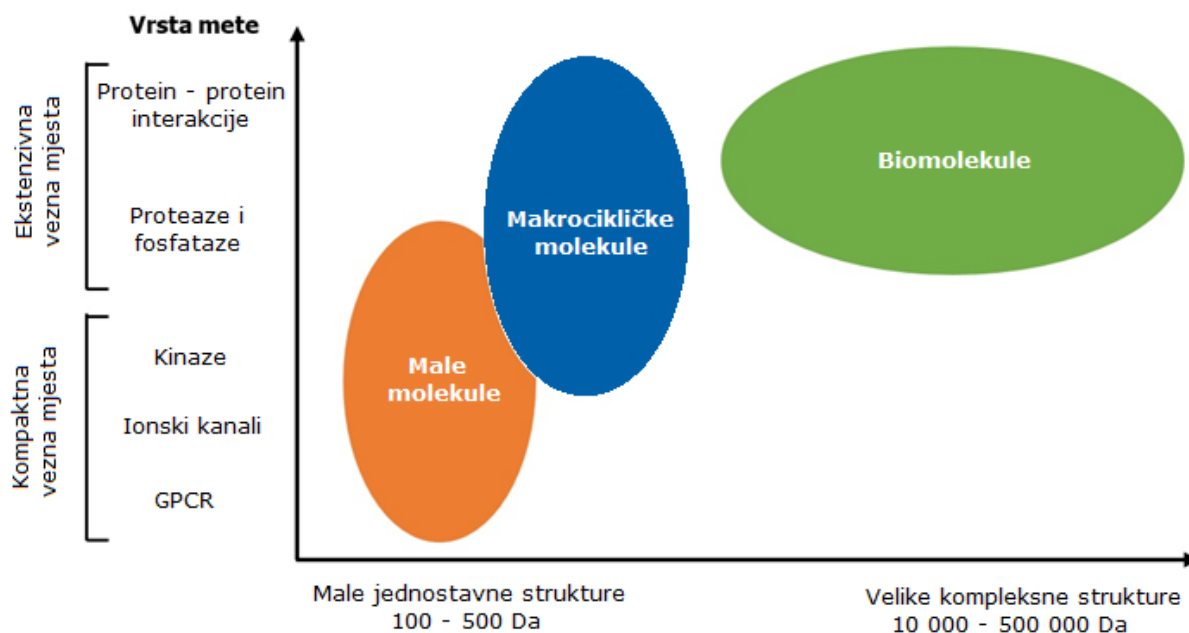
Ipak, računalni programi za računanje lipofilnosti mogu biti od velike pomoći, osobito u fazama planiranja kemijske sinteze ili ranim fazama istraživanja pri filtriranju spojeva s odgovarajućim svojstvima (54). Međutim, čim je to moguće, izračunate vrijednosti lipofilnosti treba zamijeniti točnijim eksperimentalnim vrijednostima.

2.4. Makrociklički spojevi

Farmaceutska industrija se u prošlosti uglavnom oslanjala na istraživanje malih molekula niskih molekulskih masa kao novih lijekova. Ovi spojevi mogu se uspješno dizajnirati za vezanje na mala kompaktna vezna mjesta kakva se nalaze u mnogim poznatim farmakološkim metama, enzimima i receptorima (110). Međutim, oko pola farmakoloških meta, posjeduje aktivna mjesta čiju je modulaciju moguće postići ligandom koji pripada klasi oralno biorasploživih malih molekula. Druga polovica farmakoloških meta su tzv. kompleksne mete s velikim plosnatim i plitkim aktivnim mjestima ili onima u obliku tunela

ili udubljenja (111,112). Ovakva aktivna mjesta obično imaju manji broj mogućih interakcija s ligandom te je zahtjevno dizajnirati male molekule koje bi u interakciji s njima pokazale prikladan farmakodinamički odgovor (113–116). Iz tog razloga raslo je zanimanje za biomolekule koje imaju sposobnost modulacije kompleksnih farmakoloških meta. Ove velike molekule moguće je dizajnirati na način da imaju visok afinitet za vezanje na plosnata i plitka vezna mjesta kakva se često nalaze u različitim proteazama, fosfatazama, receptorima spregnutim s G-proteinom (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR) i nekim enzimima, ali i kod protein-protein interakcija (110,117). Iako biomolekule nude zanimljive prednosti u usporedbi s malim molekulama, njihovo istraživanje i razvoj kao novih lijekova ima nekoliko nedostataka, a to su visok trošak proizvodnje, smanjena suradljivost pacijenata, nemogućnost prolaska bioloških barijera i niska oralna bioraspoloživost (20). Neke od ovih poteškoća potječu od činjenice da biomolekule ne podliježu pravilima za svojstva koja molekulu čine sličnu lijeku. Ova pravila nazvana su Lipinskijevih pet pravila (engl. *rule of five*, Ro5) te opisuju uvjete prema kojima se povećava vjerojatnost za dobra fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva budućih lijekova (34). Ova pravila propisuju maksimalne granice lipofilnosti, molekulske težine, broj akceptora i donora vodikovih veza kao i polarnu površinu molekule (engl. *polar surface area*, PSA). Molekule koje zadovoljavaju postavljene uvjete imaju veću vjerojatnost razviti se u uspješan oralno bioraspoloživ lijek (Tablica 2.2). Spojevi koji ne slijede Lipinskijevih pet pravila u literaturi se nazivaju molekule "izvan" Lipinskijevih pet pravila (engl. *beyond rule-of-5*, bRo5), jer se njihov kemijski prostor nalazi izvan granica klasičnih pravila. Ne postoje strogi kriteriji koji moraju biti zadovoljeni kako bi molekula pripadala bRo5 klasi spojeva, ali standardni molekularni deskriptori definitivno izlaze iz optimalnog raspona za spojeve s optimalnim ADME i farmakokinetičkim svojstvima. Biomolekule imaju visoku molekularnu masu (>500 Da) te značajno veći broj akceptora i donora vodikovih veza u usporedbi s malim molekulama (118,119). Njihova PSA vrijednost je daleko viša od najviše dopuštene za oralno bioraspoložive male molekule (120).

Makrociklički spojevi se klasificiraju kao bRo5 molekule te zauzimaju prostor između malih molekula i biomolekula (Slika 2.10), pri čemu dijele sličnost s malim molekulama što se tiče posjedovanja svojstva koja molekulu čine sličnu lijeku, a s druge strane imaju sposobnost vezanja na kompleksne farmakološke mete što je glavna karakteristika biomolekula (110).



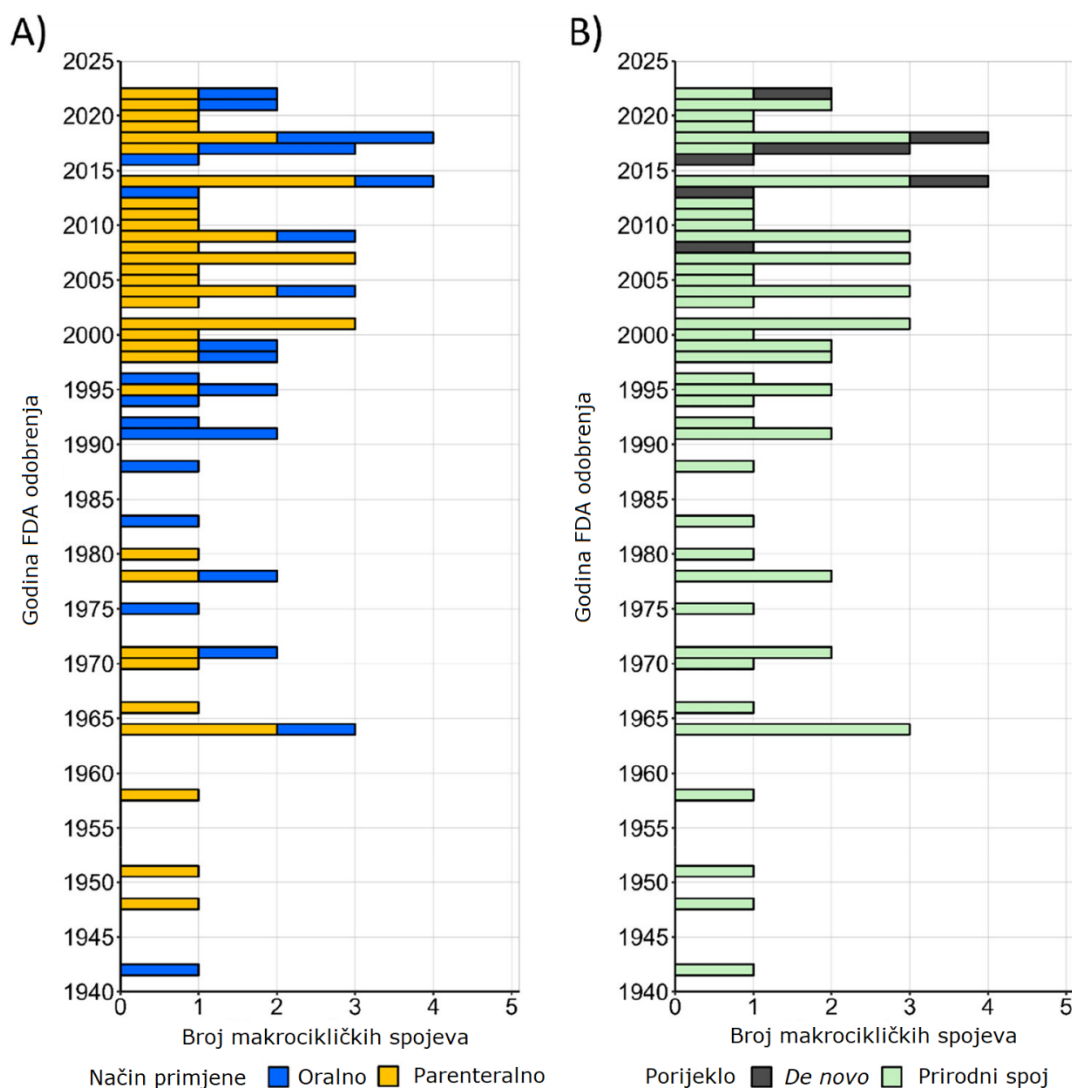
Slika 2.10 Usporedba strukturnih karakteristika i farmakoloških meta koje su podložne modulaciji za male molekule, makrocikličke spojeve i biomolekule. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (110).

Prema definiciji, makrociklički spojevi su organske molekule koje sadrže prsten od najmanje 12 teških atoma (121). Mogu se podijeliti na više podskupina od kojih su za farmaceutsku industriju najvažniji makrolidi, ciklički peptidi, ansamicini i porfirini (20). Prvi makrociklički lijekovi pripremljeni su iz prirodnih izvora (19,20), ali danas ih je sve više i sintetskog porijekla. Sintetski makrociklički spojevi se dalje dijele na one dobivene kemijskim modifikacijama prirodnih produkata te na one koji su sintetizirani *de novo* (21,122). Važno je naglasiti da je sinteza makrocikličkih spojeva izazovan i često mukotrpan zadatak obilježen dugim sintetskim putevima s niskim iskorištenjima (19,119,121,123,124). Unatoč tome, kemijska i funkcionalna raznolikost te stereokemijska kompleksnost otvaraju niz mogućnosti koje kemijski prostor malih molekula ne posjeduje (117).

2.4.1. Makrociklički spojevi prisutni na tržištu lijekova i u kliničkim fazama istraživanja

Na tržištu trenutno postoji 67 makrocikličkih spojeva koji se koriste kao lijekovi (Slika 2.11) (117). Od toga, 26 lijekova (39 %) se primjenjuje oralnim putem, dok njih 41 (61 %) se dozira parenteralno. Oralna primjena lijeka preferirani je put primjene lijeka jer nije invazivna te ju pacijenti rado prihvaćaju. Ipak, omjer između oralno i parenteralno primjenjivih makrocikličkih lijekova ostaje relativno konstantan kroz godine. Velika većina makrocikličkih lijekova na tržištu su prirodni spojevi (88 %) pa je tako prvi lijek koji je potpuno sintetskog porijekla, pleriksafor, odobren tek 2008. godine. Makrociklički spojevi

primjenjuju se za niz terapijskih indikacija. Pritom, 44 % makrocikličkih lijekova na tržištu su lijekovi za zarazne bolesti, pri čemu je najviše antibakterijskih lijekova (85 %), ali antivirusni (7 %) i antifungalni (8 %) su također značajno zastupljeni. Onkološki (21 %), lijekovi za autoimune poremećaje (6 %) i imunosupresivni lijekovi (6 %) također čine značajan dio tržišta makrocikličkih spojeva. Od ostalih manje zastupljenih indikacija tu su kronična bol, genetska pretilost, srčani zastoje itd. Analizom aktivnih mjesta farmaceutskih meta na koje se vežu makrociklički lijekovi, pokazano je kako njih 79 % djeluje na mete s plosnatim, plitkim mjestima ili mjestima u obliku tunela ili udubljenja. Veličina i strukturna kompleksnost makrocikličkih spojeva razlozi su njihove mogućnosti vezanja na kompleksne mete nedostupne malim molekulama. Dakle, iako je pokazano kako su spojevi iz klase makrocikala jedinstveni zbog mogućnosti moduliranja kompleksnih farmakoloških meta, tek 4 % ukupnih lijekova koji su odobreni i stavljeni na tržište pripadaju ovoj skupini spojeva.



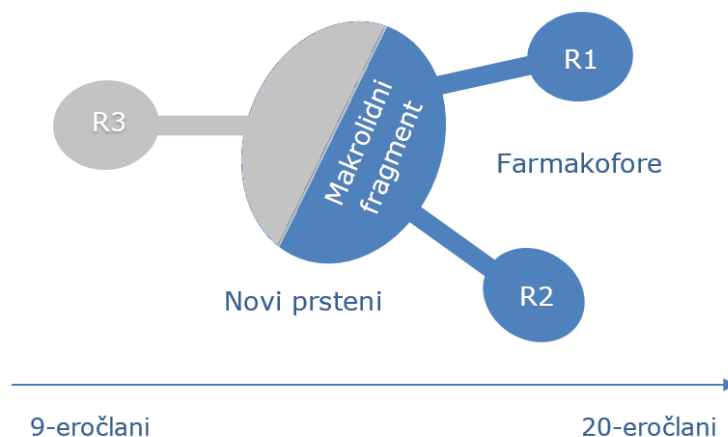
Slika 2.11 Broj makrocikličkih spojeva ovisno o godini odobrenja od FDA; A) Raspodjela prema načinu primjene; B) Raspodjela prema porijeklu. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (117).

Pregled makrocikličkih lijekova na tržištu daje povijesnu sliku spojeva iz klase makrocikala u istraživanju lijekova, dok bi promatranje spojeva koji tek trebaju ući na tržište trebalo dati uvid u suvremeni pristup i nove smjerove istraživanja makrocikala. Usporedbom farmaceutskog profila makrocikličkih spojeva na tržištu i onih koji se nalaze u kliničkim fazama istraživanja, može se uočiti da od 34 makrociklička spoja koja se nalaze u kliničkim fazama istraživanja, 32 % se doziraju oralno, dok je za ostale prikladna parenteralna primjena lijeka (117). Moguće je da je udio oralno biorasploživih spojeva donekle podcijenjen jer se neki spojevi u ranim kliničkim ispitivanjima primjenjuju parenteralno te se to promijeni u kasnijim kliničkim fazama. Bez obzira na to, u usporedbi s odobrenim oralno biorasploživim makrocikličkim spojevima (39 %), u skorije vrijeme nije došlo do značajnijeg napretka prema preferiranom načinu primjene lijeka. Iznenađujuće je da je udio spojeva u kliničkim istraživanjima dobivenih iz prirodnih izvora i dalje visokih 82 %. Iako su metode sinteze makrocikličkih molekula značajno napredovale i konstantno se unapređuju, visok udio prirodnih makrocikala, kako odobrenih tako i onih u kliničkim fazama istraživanja, dokazuje kako su biosinteski putevi još uvijek dominantni. Što se tiče terapijskih indikacija kliničkih kandidata, onkologija je preuzela primat s 47 % zastupljenosti, dok su antibiotici, koji su dominantni među odobrenim lijekovima, sada na drugom mjestu s 30 %.

Iako je primijećen značajan i konstantan porast zanimanja farmaceutske industrije za ulaganje u istraživanja makrocikličkih spojeva, i dalje je mali udio makrocikala na tržištu, ali i u kliničkim fazama istraživanja. Stoga se istraživački naponi kontinuirano ulažu u dodatno poboljšanje učinkovitosti sinteze, ali i bolje razumijevanje fizikalno-kemijskih i ADME svojstava makrocikličkih spojeva.

2.4.2. FideltaMacro™ – biblioteka makrocikličkih spojeva

U Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.) se u zadnjih 10-ak godina intenzivno razvija FideltaMacro™ platforma čiji je cilj sinteza, istraživanje te stvaranje biblioteke novih i inovativnih makrocikličkih spojeva koji su inspirirani makrolidima (Slika 2.12) (125). Biblioteka sadrži makrocikličke spojeve s različitim veličinama prstenova na koje su vezani različiti supstituenti s ciljem dobivanja strukturne i trodimenzionalne raznolikosti, a da se pritom zadrže povoljna farmakokinetička svojstva (21).

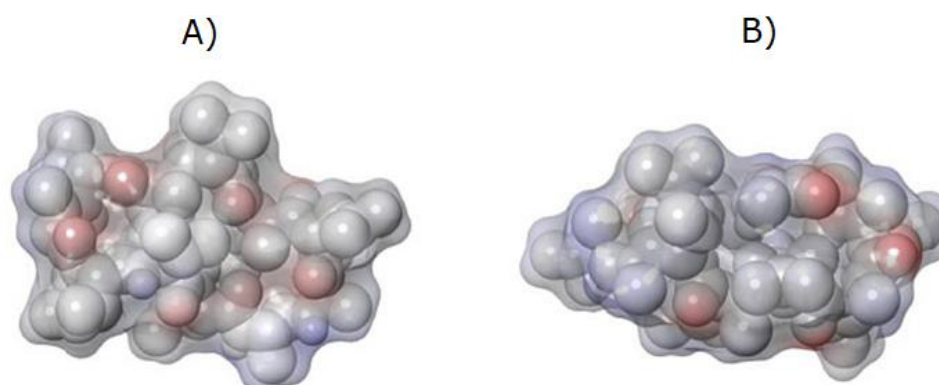


Slika 2.12 FideltaMacro™ platforma. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (21).

2.4.3. Strukturne karakteristike te fizikalno-kemijska i ADME svojstva makrocikličkih spojeva

Potencijalni kemijski prostor makrocikličkih spojeva je vrlo velik. Osim što je moguć velik broj varijacija samog prstena, na njega se mogu vezati razni supstituenti na različitim pozicijama na molekuli. Pri dizajnu makrocikličkih spojeva treba imati na umu da njihova dvodimenzionalna struktura ne može ni približno dočarati karakteristike koje nudi njihova trodimenzionalna struktura (21). Proces kojim se zatvara makrociklički prsten zove se makrociklizacija. Ovaj korak daje makrociklima značajnu prednost u odnosu na njihove linearne analoge (19,119,122). Zatvaranje prstena dovodi do generiranja djelomično rigidnih molekula s konformacijskim ograničenjima koje, unatoč tome, i dalje imaju dovoljnu slobodu zauzimanja različitih konformacija. Razina slobode ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su veličina prstena, broj rotabilnih veza, sterička ograničenja itd. Makrociklizacijom se makrociklička molekula zaključava u bioaktivnoj konformaciji, što omogućavanju makrocikličkim spojevima da tvore više veznih interakcija s receptorom. Jače i specifičnije vezanje posljedično dovodi do poboljšanja selektivnosti, čime je smanjen rizik za pojavu toksičnih efekata (37,44). Dokazano je kako makrociklički prsten i mali supstituenti vezani direktno na njega doprinose jačini vezanja na receptor u udjelu od oko 50 %, dok ostatak proizlazi iz većih supstituenata vezanih na molekulu (115). Ovi podaci pokazuju kako su za ostvarivanje interakcije između receptora i liganda jednako važni veličina, oblik i konformacija makrocikličkog prstena kao i supstituenti vezani na njega. Makrociklizacija je odlično oruđe za kontrolu velikog broja alternativnih konformacija koje bi mogle dovesti do neželjenih nuspojava ili loše bioraspodjelivosti (119). Ujedno, ovaj korak je ključan u smanjenju ukupne polarnosti molekule te poboljšanja njezine permeabilnosti i bioraspodjelivosti.

Neki makrociklički spojevi imaju sposobnost prilagođavanja svoje konformacije okolišu u kojem se nalaze, pri čemu se ponašaju kao molekularni kameleoni (Slika 2.13) (126,127). Kameleonski makrociklički spojevi preferiraju otvorenu konformaciju u polarnom vodenom okolišu pri čemu su polarne skupine izložene prema otapalu. Na ovaj način mogu stvarati vodikove veze ili dipol-dipol interakcije s molekulama vode čime se poboljšava topljivost spoja. S druge strane, zatvorena konformacija je dominantna u hidrofobnom okolišu, kao što je fosfolipidna membrana, pri čemu se polarne skupine smještaju u unutrašnjost prstena te tvore intramolekulske vodikove veze. Ova konformacija omogućuje makrociklima dobru pasivnu permeabilnost.



Slika 2.13 Kameleonski makrociklički spoj s prikazanim konformacijama dominantnim u A) vodenom mediju (bioaktivna konformacija) i u B) biološkoj membrani (konformacija s intramolekulskim vodikovim vezama). Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (128).

Najpoznatiji primjer molekularnog kameleona je ciklosporin (129–131). Ovaj ciklički peptid je konformacijski vrlo fleksibilan. Zato u polarnom vodenom mediju molekula zauzima polarnu bioaktivnu konformaciju, pri čemu su donori i akceptori vodikovih veza prisutni na molekuli okrenuti prema otapalu. S druge strane, u nepolarnom mediju dolazi do formiranja intramolekulskih vodikovih veza čime se štite polarne grupe te molekula kao takva ima bolju pasivnu permeabilnost. Dakle, kameleonska svojstva posebno su korisna jer omogućuju dobar balans između topljivosti i pasivne permeabilnosti spoja (132). Načinjeni su značajni koraci u racionalnoj sintezi spojeva koji bi posjedovali ovu povoljnu karakteristiku (133,134). Međutim, još ima dosta prostora za istraživanje ovakvih sintetskih procesa. S druge strane, razvijeno je nekoliko eksperimentalnih (128,135) i računalnih (136,137) metoda, koje se mogu koristiti za detekciju makrocikličkih spojeva koji posjeduju kameleonska svojstva, odnosno koji bi potencijalno bili oralno bioraspoloživi.

Dobra fizikalno-kemijska i ADME svojstva svakog lijeka, kao i onih iz klase makrocikala, određuju njegov povoljan farmakokinetički profil. Analizom makrocikličkih molekula na tržištu i u kliničkim fazama istraživanja ustanovljeno je da je, unatoč njihovoj veličini, moguće dizajnirati makrocikličke spojeve koji imaju povoljnu permeabilnost i oralnu bioraspoloživost (20,122,138). Za predviđanje fizikalno-kemijskih i ADME svojstava

spojeva koji pripadaju klasi malih molekula često se koriste jednostavni molekularni deskriptori te su za njih postavljene maksimalne dopuštene vrijednosti kako bi lijek bio oralno biorasploživ (34,120). Za makrocikličke spojeve ove granice imaju nešto više vrijednosti (Tablica 2.2) pa je dopušten širi raspon lipofilnosti, ali i značajno veća molekularna masa i PSA vrijednost te veći broj akceptora vodikovih veza. Strože ograničenje je pritom postavljeno za broj donora vodikovih veza, koji može biti veći samo za jedan u usporedbi s malim molekulama (115,139).

Tablica 2.2 Usporedba dopuštenih vrijednosti molekularnih deskriptora za oralnu biorasploživost malih i makrocikličkih molekula (34,120,139).

	Lipinskijevih pet pravila za male molekule	Pravila postavljena za makrocikličke molekule
Molekularna masa	< 500 Da	600 - 1200 Da
Lipofilnost	< 5	-2 - 10
Broj donora vodikovih veza	< 5	< 6
Broj akceptora vodikovih veza	< 10	< 15
Broj rotabilnih veza	≤ 10	< 20
PSA	≤ 140 Å ²	< 250 Å ²

Iako osnovni strukturni deskriptori mogu biti jako korisni u predviđanju ADME svojstava makrocikličkih spojeva, za određenu klasu spojeva potrebno je provjeriti postoji li korelacija između ovih jednostavnih dvodimenzionalnih strukturnih karakteristika i farmakokinetičkog parametra koji se želi optimirati. Kako trodimenzionalna struktura ipak igra dominantnu ulogu u određivanju ADME svojstava makrocikličkih spojeva te osnovni strukturni deskriptori često ne mogu pouzdano predvidjeti ponašanje ovakvih molekula, najčešće je ipak potrebno eksperimentalno odrediti njihova fizikalno-kemijska svojstva (21).

Zbog svoje strukturne kompleksnosti, makrociklički spojevi imaju mogućnost jačeg vezanja na kompleksne farmakološke mete čiju aktivnost nije moguće modulirati malim molekulama (19,119,122). Uz to, većina tih meta se nalazi unutar stanica pa je ključno da makrociklički spojevi imaju dovoljno visoku permeabilnost kako bi mogli doći do mjesta djelovanja (140,141). Pritom treba voditi računa o tome da povećanje permeabilnosti putem povećanja lipofilnosti vodi do niže topljivosti, ali i drugih rizika vezanih za povećan stupanj metabolizma, potencijalne lijek-lijek interakcije i toksične efekte (118). Stoga makrociklički spojevi s kameleonskim karakteristikama koje utječu na mogućnost više

permeabilnosti bez povećanja ukupne lipofilnosti imaju prednost pred rigidnijim strukturama (142). Međutim, postoje slučajevi makrocikličkih spojeva koji u *in vitro* uvjetima pokazuju niske vrijednosti pasivne permeabilnosti (143), ali u *in vivo* uvjetima pokazuju dobru biorasploživost (144). Riječ je o spojevima iz klase makrolida za koje je dokazano da aktivni prijenos igra ključnu ulogu u njihovoj permeabilnosti. S druge strane, makrociklički laktoni su supstrati za P-gp, što može ograničiti njihovu ukupnu permeabilnost (145). Stoga je važno uspostaviti pouzdanu *in vitro* – *in vivo* korelaciju unutar svakog programa koji se bavi istraživanjem novih spojeva, tako i makrocikličkih, kao potencijalnih lijekova.

2.4.4. Određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva

Lipofilnost makrocikličkih spojeva ima značajan utjecaj na permeabilnost, ali i na njihovu biorasploživost (146–148). Zato je jako važno imati pouzdanu metodu za određivanje lipofilnosti ove vrlo važne, ali i zahtjevne skupine spojeva.

Predviđanje log D vrijednosti za fleksibilne molekule kakve su makrocikličke je osobito izazovno. Pri procjeni lipofilnosti *in silico* metodama, najčešće se koriste aditivne metode računanja lipofilnosti (106). U slučaju makrocikličkih spojeva, potrebno je u obzir uzeti i trodimenzionalnu strukturu te konformacijsku fleksibilnost (132,149). Poznato je da broj mogućih konformacija raste eksponencijalno s brojem rotabilnih veza (150), što može značajno otežati istraživanje konformacijskog prostora. Pritom, predviđanje omjera zastupljenosti različitih konformacija je također vrlo nepouzdana. Vrijednosti lipofilnosti makrocikličkih spojeva dobivene upotrebom računalnih programa često su puno niže od onih dobivenih eksperimentalnom metodama (97,151). Postoje posebni programi za računanje lipofilnosti koji uzimaju u obzir zastupljenost različitih konformacija fleksibilnih molekula (152,153), ali nisu jednostavni za korištenje te zahtijevaju dobro poznavanje molekuskog modeliranja.

Eksperimentalno određivanje log D vrijednosti izrazito je važno jer ovisi o veličini i polarosti molekule, ali i o njezinoj trodimenzionalnoj konformaciji (154). Iako su u literaturi opisana istraživanja u kojima je lipofilnost makrocikličkih spojeva uspješno određena metodom izmućkivanja (155–157), ova metoda ima nekoliko ključnih nedostataka koji otežavaju profiliranje makrocikličkih spojeva. Relativno uzak raspon lipofilnosti koji se može odrediti metodom izmućkivanja (35) čini ovu metodu samo djelomično primjenjivom za makrocikličke spojeve jer je za ovu klasu molekula potrebno imati mogućnost određivanja puno šireg raspona lipofilnosti. Nadalje, pokazano je da se ciklički peptidi gotovo uopće ne distribuiraju u organsku fazu jer se pri uvjetima koje metoda primjenjuje nalaze u ioniziranom obliku (158). Nadalje, većina makrocikličkih spojeva su molekule amfifilnog karaktera pa postoji mogućnost njihovog nakupljanja na

površini između vodene i organske faze (60,151). Ovo dovodi do stvaranja emulzije što otežava razdvajanje slojeva te određivanje koncentracije spoja u vodenoj i organskoj fazi. Iz navedenih razloga metode tekućinske kromatografije nude prednosti koje ih čine puno primjenjivijima za određivanje lipofilnosti makrocikličkih molekula.

Pretragom literature pronađeno je tek nekoliko publikacija koje se bave određivanjem nekog kromatografskog parametra kao pokazatelja lipofilnosti makrocikličkih molekula. Katz i suradnici proučavali su lipofilnost malih molekula ali i makrocikličkih spojeva te razvili AlphaLog D metodu (159) koja je svojevrsna adaptacija prethodno objavljene eLog D metode (160), no prilagođena promjenom pokretne faze kako bi se povećala reproducibilnost i vijek trajanja kromatografske kolone (159). AlphaLog D parametar dobije se višestrukim mjerenjem log k vrijednosti izokratnim metoda te je pokazano da dobiveni pokazatelj lipofilnosti ima dobru korelaciju s log D vrijednostima dobivenim metodom izmućkivanja za 8 makrocikličkih molekula. Iako obećavajuća, metoda se temelji na malom setu spojeva i njezinu primjenu za makrocikličke spojeve bi trebalo opširnije istražiti. Ermondi i suradnici proučavali su lipofilnost makrocikličkih spojeva te predstavili eksperimentalno određivanje eLog P i BRlog P parametara dobivenih izokratnim metodama koje koriste različite pokretne faze (161). Pokazano je da pri određivanju eLog P vrijednosti pokretna faza generira okolinu u kojoj molekula zauzima lipofilniju konformaciju u usporedbi s eksperimentalnim uvjetima pri određivanju BRlog P vrijednosti te da se ova dva parametra mogu koristiti kao komplementarne vrijednosti za određivanje lipofilnosti i kameleonskih svojstava makrocikličkih molekula. Autori naglašavaju da je istraživanje primjene metode koja se bavi određivanjem log D vrijednosti pri fiziološkom pH još uvijek u tijeku. Gradijentne metode za određivanje faktora zadržavanja kao mjere lipofilnosti makrocikličkih molekula također se mogu pronaći u literaturi. Tako su Wang i suradnici za skupinu od 62 ispitivana makrociklička peptida mjerili log k vrijednosti upotrebom RP-HPLC tehnike te dobili dobru korelaciju s pasivnom permeabilnošću (162). Essaid i suradnici su koristili prilagođenu CHI metodu s promijenjenim gradijentom i drugačijom kromatografskom kolonom za određivanje lipofilnosti porfirina (163), a pokazatelje lipofilnosti određivali su i u drugim kromatografskim sustavima te je zaključeno da se primjenom različitih kromatografskih sustava dobiju komplementarne informacije kojima je moguće objasniti različite mehanizme vezanja ovih spojeva na membrane.

Najbrojnija istraživanja koja se bave određivanjem lipofilnosti makrocikličkih spojeva su ona koja koriste originalnu CHI metodu (22) opisanu u poglavlju 2.3.4.2. Jedno od tih istraživanja provedeno je kako bi se usporedio fizikalno-kemijski profil makrolidnih spojeva s onim dobivenim za male molekule (164). Stoga je profilirano 50 000 malih molekula i 600 spojeva iz klase makrolida, kojima je određena CHI vrijednost, ali i vezanje na imobiliziranu umjetnu membranu te na proteine plazme. Zaključeno je da makrolidni spojevi i male molekule imaju sličan profil lipofilnosti, dok makrolidi pokazuju niže vezanje

na proteine plazme te jaču interakciju s umjetnim membranama u usporedbi s malim molekulama. Ovo odgovara *in vivo* opažanjima koja govore u prilog tome da makrolidni spojevi imaju visok afinitet prema fosfolipidnim strukturama, a time i visoku distribuciju u tkivima (165). Stepanić i suradnici su istraživali fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva makrolidnih spojeva s makrocikličkim prstenima od 14 i 15 članova (166). Pritom su lipofilnost odredili upotrebom CHI metode te su pokazali da se zadržavanje spoja u stanicama može predvidjeti pomoću kromatografskog pokazatelja lipofilnosti. Iako se CHI metoda pokazala korisnom za određivanje lipofilnosti makrolidnih spojeva u smislu dobre korelacije između dobivene vrijednosti lipofilnosti s određenim farmakokinetičkim parametrima, kao najveći problem pri profiliranju makrocikličkih spojeva CHI metodom je pojava širokih kromatografskih pikova za velik broj spojeva. To je posljedica spore kinetike vezanja na nepokretnu fazu, što utječe na preciznost, a time i na pouzdanost izmjerenih vrijednosti (97).

3. SVRHA, CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Svrha ovog istraživanja bila je razviti novu kromatografsku metodu za pouzdano određivanje lipofilnosti makrocikličkih molekula. Za razvoj metode korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza s detektorom s nizom dioda u sprezi sa spektrometrom masa (engl. *reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detector coupled with mass spectrometer*, RP-HPLC-DAD-MS). Pritom se primjenjivao gradijentni način ispiranja. Istraživanja utjecaja kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te razvoj nove kromatografske metode provela su se upotrebom početne skupine komercijalno dostupnih makrocikličkih spojeva kojima su se referentne vrijednosti lipofilnosti odredile metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode. Primjenjivost metode razvijene u ovom radu provjerena je profiliranjem proširene skupine makrocikličkih spojeva.

Ciljevi istraživanja su:

- I. Odrediti lipofilnost makrocikličkih spojeva metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode.
- II. Odrediti kromatografsku lipofilnost makrocikličkih spojeva upotrebom CHI metode.
- III. Istražiti utjecaj promjena u eksperimentalnim kromatografskim uvjetima na određivanje vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva.
- IV. Odrediti lipofilnost makrocikličkih spojeva upotrebom RP-HPLC metode s MS detektorom razvijene u ovom radu.
- V. Odabrati nove kalibracijske standarde iz klase makrocikličkih spojeva za kalibraciju RP-HPLC sustava.
- VI. Odrediti jedinstvenu jednadžbu kojom bi se vremena zadržavanja bilo kojeg novog makrocikličkog spoja mogla prevesti na log D skalu lipofilnosti.
- VII. Istražiti mogućnost ubrzanja postupka kromatografskog određivanja lipofilnosti grupiranjem spojeva za RP-MPLC analizu uz upotrebu MS detektora.
- VIII. Usporediti pokazatelje lipofilnosti makrocikličkih spojeva dobivenih metodom izmućkivanja s *in silico* pokazateljima lipofilnosti dobivenima upotrebom računalnog programa za predviđanje lipofilnosti.
- IX. Usporediti pokazatelje lipofilnosti makrocikličkih spojeva dobivenih CAMDIS metodom s pokazateljima dobivenima upotrebom CHI metode te metode razvijene u ovom radu.

Hipoteze istraživanja su:

- I. RP-HPLC metoda u gradijentnom načinu ispiranja koja se koristi za određivanje lipofilnosti malih molekula primjenjiva je i za kromatografsko određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva.
- II. Promjena eksperimentalnih kromatografskih uvjeta ne utječe na određivanje vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva.
- III. Rezultati lipofilnosti dobiveni upotrebom kromatografske metode razvijene u ovom radu ne koreliraju dobro s rezultatima dobivenima upotrebom CAMDIS metode.
- IV. CHI metoda je primjenjivija za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva od kromatografske metode razvijene u ovom radu.
- V. *In silico* vrijednosti lipofilnosti dobro predviđaju lipofilnost makrocikličkih spojeva.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Materijali

4.1.1. Spojevi korišteni pri kromatografskim analizama

Standardi korišteni za kalibraciju RP-HPLC sustava pri upotrebi CHI metode za određivanje lipofilnosti

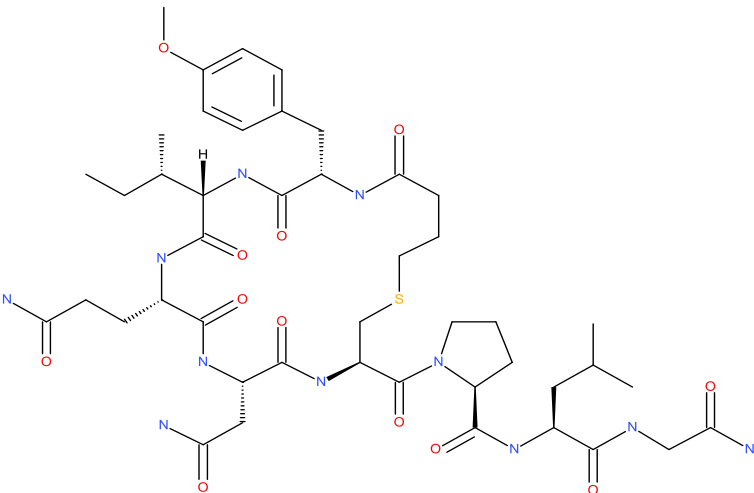
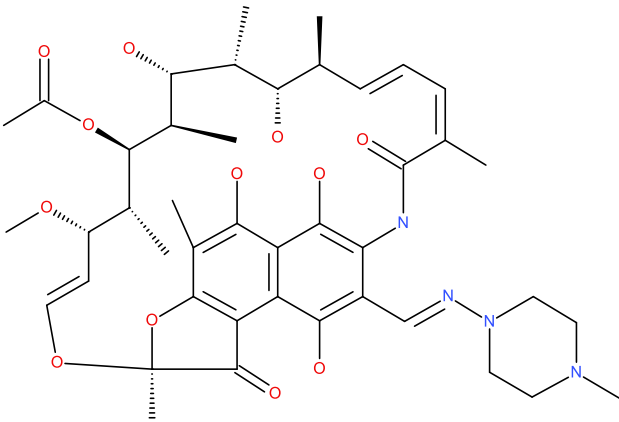
- STD_1, Teofilin (Fluka, Steinheim, Njemačka)
- STD_2, 5-Feniltetrazol (TCI, Tokio, Japan)
- STD_3, Benzimidazol (Fluka, Steinheim, Njemačka)
- STD_4, Kolhicin (Sigma, Steinheim, Njemačka)
- STD_5, 8-Fenilteofilin (Sigma, Steinheim, Njemačka)
- STD_6, Acetofenon (Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- STD_7, Indol (SAFC, Steinheim, Njemačka)
- STD_8, Propiofenon (TCI, Tokio, Japan)
- STD_9, Butirofenon (TCI, Tokio, Japan)
- STD_10, Valerofenon (TCI, Tokio, Japan)

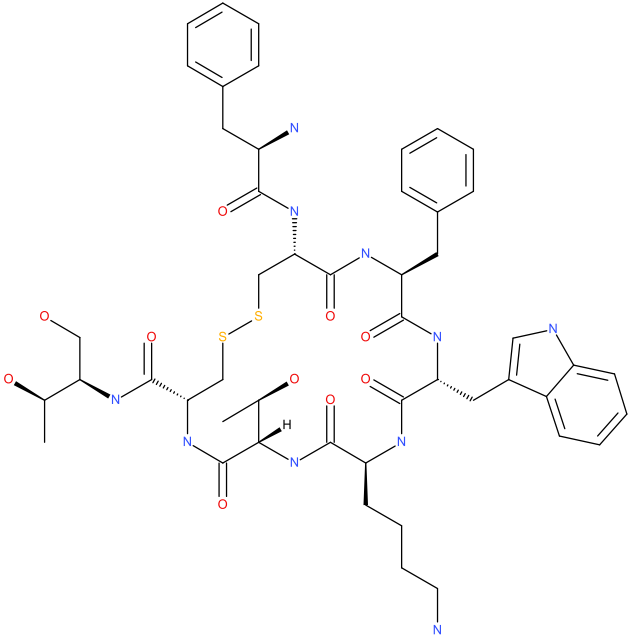
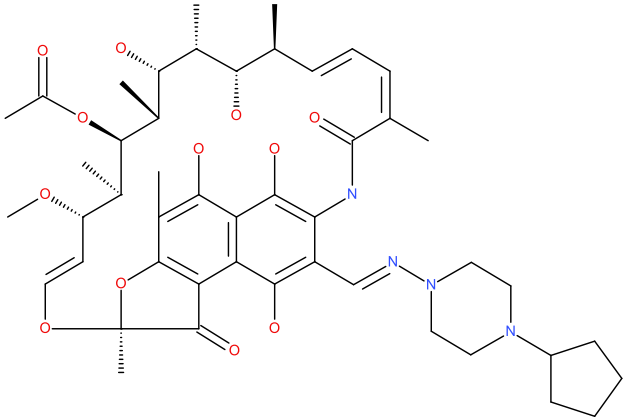
Kalibracijski standardi koji se koriste pri upotrebi CHI metode u ovom radu su korišteni i kao predstavnici malih molekula te se na njima proučavao utjecaj eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja. U dodatku 8.5 nalaze se njihove molekulske strukture, formule i mase te broj donora i akceptora vodikovih veza. Ovi parametri izračunati su pomoću ACD/Labs Percepte.

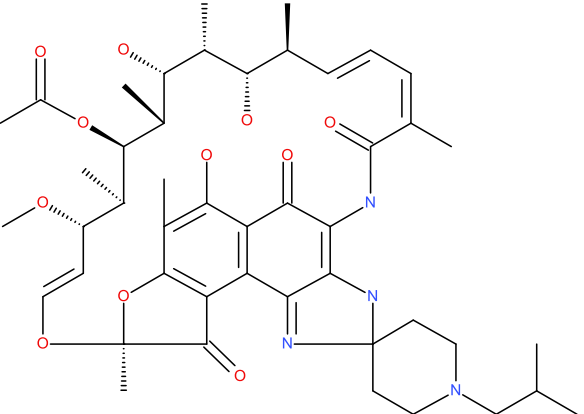
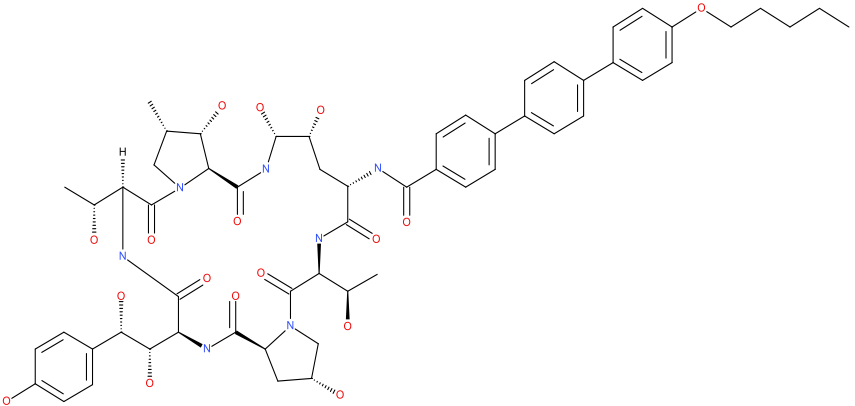
Makrociklički spojevi početne skupine korišteni za istraživanje utjecaja eksperimentalnih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova

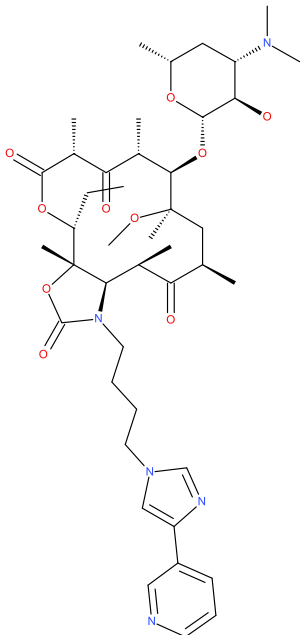
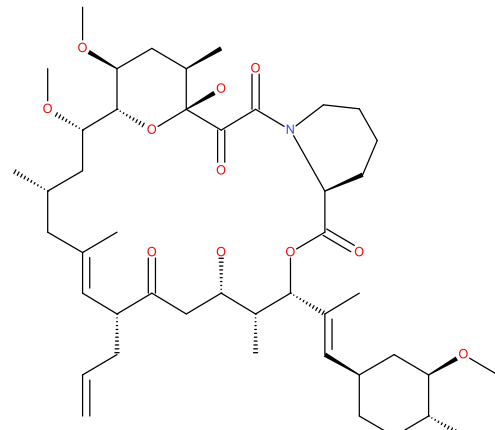
U ovom doktorskom radu korišteno je 20 makrocikličkih spojeva početne skupine (Tablica 4.1) na kojima se proučavao utjecaj eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova. U dodatku 8.6 nalaze se njihove molekulske formule i mase, broj donora i akceptora vodikovih veza, kao i *in silico* clog *D* vrijednosti pri pH vrijednosti 7,40 te konstante ionizacije, pK_a . Navedeni parametri izračunati su pomoću ACD/Labs Percepte.

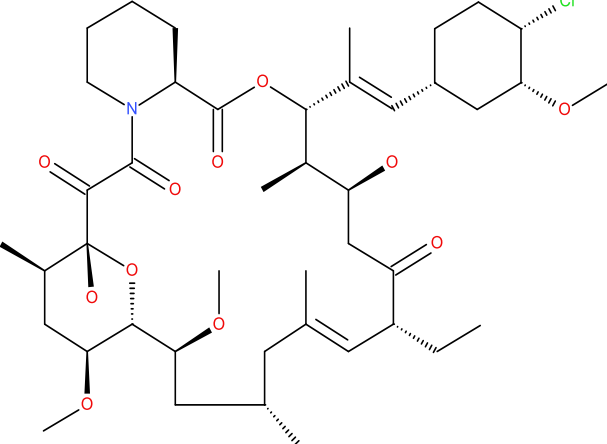
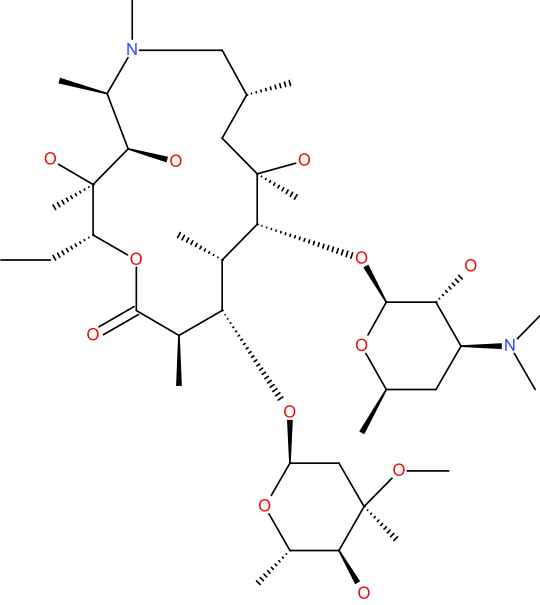
Tablica 4.1 Početna skupina makrocikličkih spojeva.

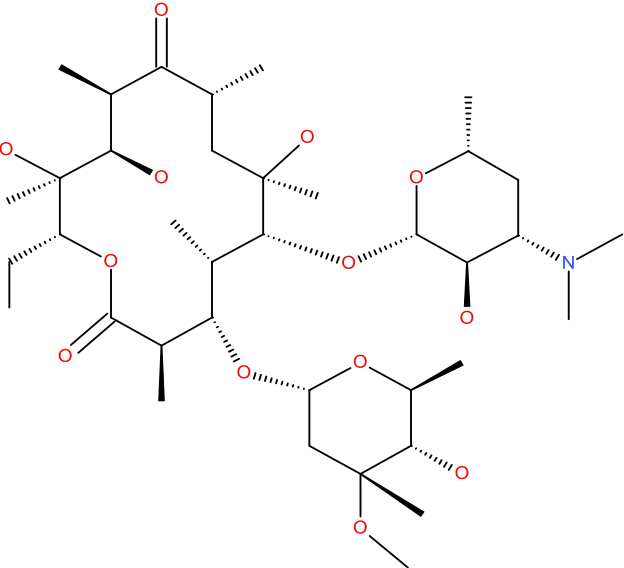
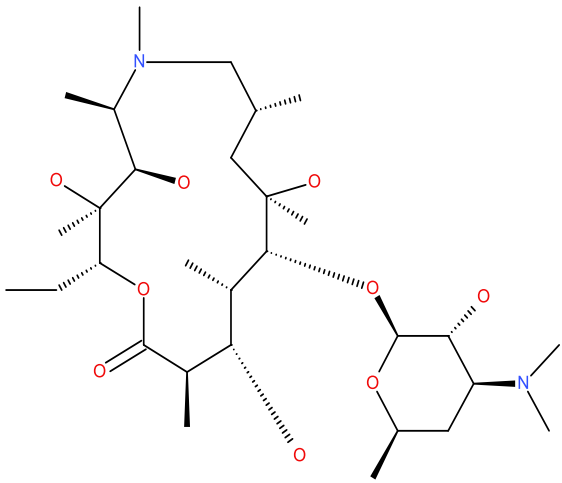
Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_1	Karbetocin		MedChemExpress, Sollentuna, Švedska
MAC_2	Rifampicin		Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države

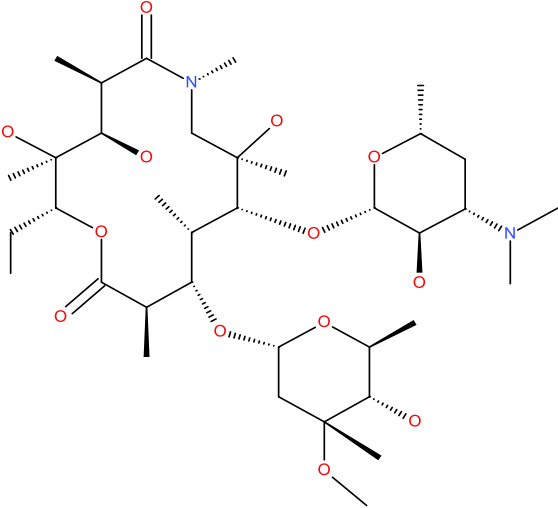
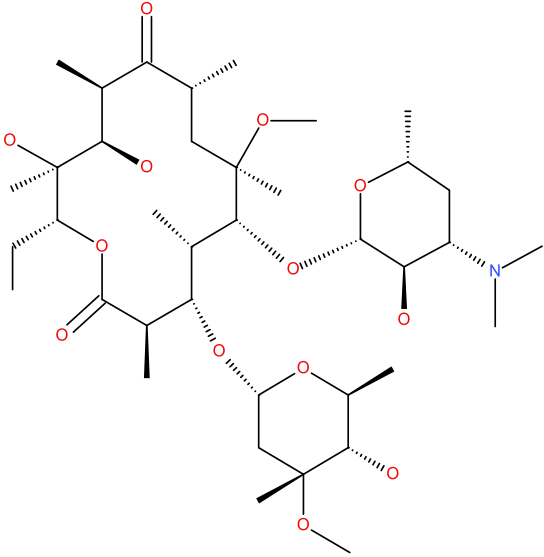
Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_3	Oktreotid		Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada
MAC_4	Rifapentin		Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada

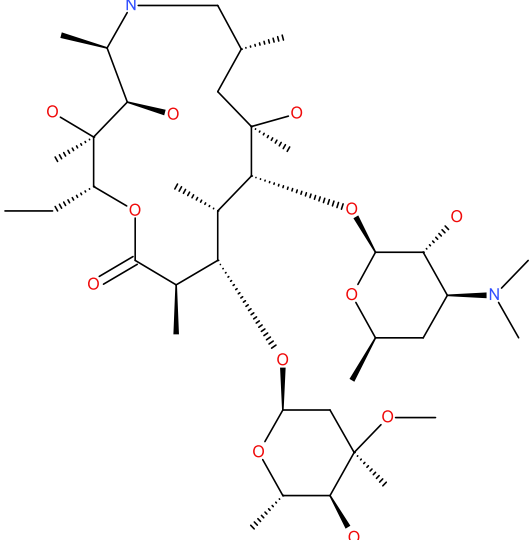
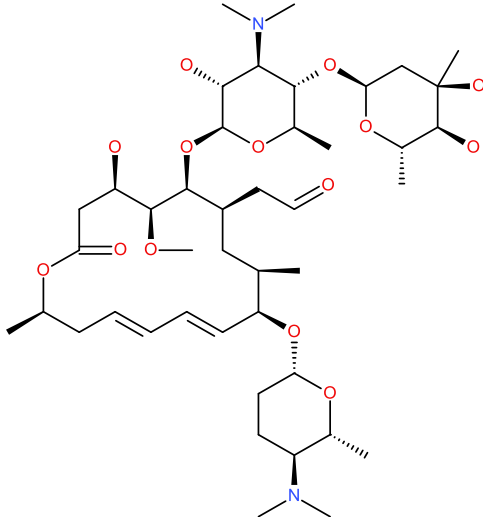
Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_5	Rifabutin	 <p>The image shows the chemical structure of Rifabutin, a rifamycin derivative. It features a central rifamycin core with a piperazine ring substituted with an isobutyl group. The structure is highly complex with multiple stereocenters and various functional groups including hydroxyl, methyl, and acetoxy groups.</p>	Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada
MAC_6	Anidulafungin	 <p>The image shows the chemical structure of Anidulafungin, a tricyclic antifungal agent. It consists of a central bicyclic core with a piperazine ring and a morpholine ring. The structure is highly complex with multiple stereocenters and various functional groups including hydroxyl, methyl, and a long alkoxy chain.</p>	Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada

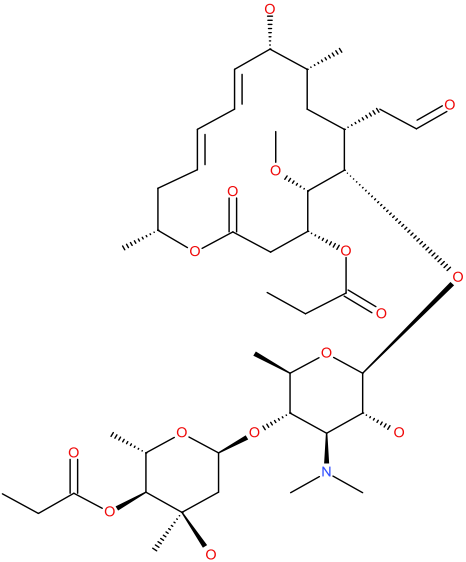
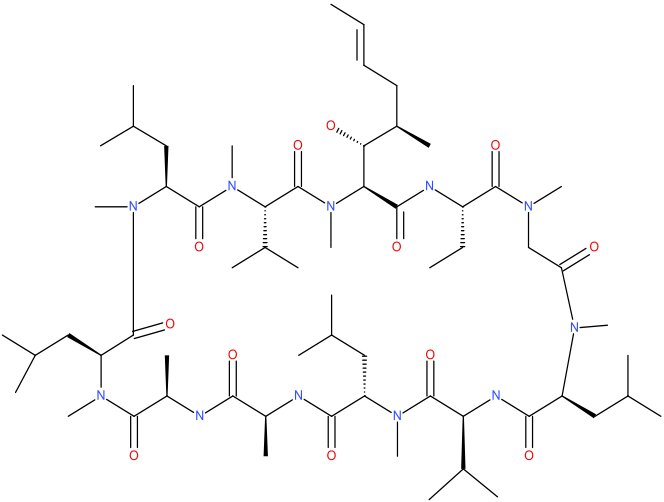
Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_7	Telitromicin	 <p>The chemical structure of Telitromicin is a complex macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters, several hydroxyl groups, and a methyl group. Attached to the ring is a side chain containing a 1,2,4-triazole ring, which is further substituted with a pyridine ring. Another side chain includes a dimethylamino group attached to a cyclohexane ring.</p>	Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada
MAC_8	Takrolimus	 <p>The chemical structure of Takrolimus is a complex polyketide. It consists of a long, branched carbon chain with multiple stereocenters, several hydroxyl groups, and a methyl group. The chain is terminated by a cyclohexane ring with a methoxy group and a hydroxyl group. The structure is highly complex and contains several functional groups, including a lactone ring and a diene system.</p>	Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_9	Pimekrolimus	 <p>The image shows the chemical structure of Pimekrolimus, a macrolide antibiotic. It features a large 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters, several oxygen atoms, and a piperidine ring attached to the main structure. A chlorine atom is highlighted in green on a cyclohexane ring substituent.</p>	Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada
MAC_10	Azitromicin	 <p>The image shows the chemical structure of Azitromicin, a macrolide antibiotic. It consists of a 14-membered macrolide ring with a nitrogen atom at the 9-position, a methyl group, and a trimethylammonium group. It is substituted with two pyranose rings at the 2 and 3 positions.</p>	sintetiziran u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.)

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_11	Eritromicin	 <p>The image shows the chemical structure of Erythromycin, a macrolide antibiotic. It consists of a 14-membered macrolide ring with a ketone group at C2, a methyl group at C3, and a methyl group at C10. Attached to the ring are two deoxy sugars: a 2,6-dideoxy-3,4-dihydroxy-5-methylhexose at C3 and a 2,6-dideoxy-3,4-dihydroxy-5-methylhexose at C14. The structure is drawn with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>	sintetiziran u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.)
MAC_12	Dekladinozil azitromicin	 <p>The image shows the chemical structure of Decadinoxil azithromycin, a 15-membered macrolide antibiotic. It features a 15-membered macrolide ring with a methyl group at C1, a methyl group at C2, and a methyl group at C10. Attached to the ring are two deoxy sugars: a 2,6-dideoxy-3,4-dihydroxy-5-methylhexose at C3 and a 2,6-dideoxy-3,4-dihydroxy-5-methylhexose at C14. The structure is drawn with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>	sintetiziran u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.)

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_13	Azahomoeritromicin	 <p>The chemical structure of Azahomoerythromycin is a 14-membered macrolide ring with a nitrogen atom at the 12-position. It features a methyl group at C-13, a methyl ester at C-14, and a methyl group at C-15. The ring is substituted with a 2,6-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyridin-2-ylmethoxy group at C-6, a 2,6-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyridin-2-ylmethoxy group at C-8, and a 2,6-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyridin-2-ylmethoxy group at C-10. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>	sintetiziran u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.)
MAC_14	Klaritromicin	 <p>The chemical structure of Clarithromycin is a 14-membered macrolide ring with a nitrogen atom at the 12-position. It features a methyl group at C-13, a methyl ester at C-14, and a methyl group at C-15. The ring is substituted with a 2,6-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyridin-2-ylmethoxy group at C-6, a 2,6-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyridin-2-ylmethoxy group at C-8, and a 2,6-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyridin-2-ylmethoxy group at C-10. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>	sintetiziran u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.)

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_17	N'-Demetil azitromicin	 <p>The image shows the chemical structure of N'-demethyl azithromycin. It features a 14-membered macrolide ring with a nitrogen atom at the top. Attached to this ring are two deoxyribose sugar units and one ribose sugar unit. The ribose unit is substituted with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) at the 2-position. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>	<p>sintetiziran u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.)</p>
MAC_18	Spiramicin	 <p>The image shows the chemical structure of spiramicin. It consists of a complex polycyclic aglycone core with multiple stereocenters and a long unsaturated side chain. It is substituted with two deoxyribose sugar units and one ribose sugar unit. The ribose unit is substituted with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) at the 2-position. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>	<p>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Sjedinjene Američke Države</p>

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Komercijalni izvor
MAC_19	Midekamicin		<p>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Sjedinjene Američke Države</p>
MAC_20	Ciklosporin		<p>USP Reference Standard, Rockville, MD, Sjedinjene Američke Države</p>

Prilikom odabira početne skupine makrocikličkih spojeva postavljeno je nekoliko kriterija. Jedan od njih bila je strukturna raznolikost skupine tako da se vodilo računa o tome da budu zastupljeni predstavnici različitih klasa makrocikličkih spojeva. Odabrana su četiri spoja koja pripadaju skupini cikličkih peptida (karbetocin, oktreetid, anidulafungin i ciklosporin), tri spoja koja pripadaju skupini ansamicina (rifampicin, rifapentin i rifabutin) te 13 spojeva koji pripadaju skupini makrolida (telitromicin, takrolimus, pimekrolimus, azitromicin, eritromicin, dekladinozil azitromicin, azahomoeritromicin, klaritromicin, roksitromicin, josamicin, N'-demetil azitromicin, spiramicin i midekamicin). Drugi kriterij bio je dostupnost spojeva pa je 14 makrocikličkih spojeva pribavljeno iz komercijalnih izvora, a 6 ih je sintetizirano u Fidelti d.o.o. (danas Selvita d.o.o.). Važan treći kriterij pri odabiru je bio da odabrana skupina zauzima širok raspon lipofilnosti, kako bi se utjecaj promjena eksperimentalnih kromatografskih uvjeta istražio podjednako za hidrofilne i lipofilne spojeve. Izračunate $D_{7,40}$ vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva protežu se od -3,11 za karbetocin do 5,09 za pimekrolimus.

Makrociklički spojevi proširene skupine korišteni za provjeru primjene kromatografske metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva

Makrociklički spojevi koji pripadaju FideltaMacro™ platformi sintetizirani su u Fidelti d.o.o. (sada Selvita d.o.o.) te su korišteni za provjeru primjene kromatografske metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva razvijene u ovom doktorskom rada. Njihove strukture nisu prikazane u ovom radu zato što pripadaju intelektualnom vlasništvu kompanije, a nisu relevantne za tematiku rada.

4.1.2. Spojevi korišteni pri određivanju lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Pri određivanju lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode korišteni su makrociklički spojevi početne i proširene skupine opisani u poglavlju 4.1.1.

4.1.3. Kemikalije korištene pri kromatografskim analizama

- Acetonitril, ACN, HPLC čistoće (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- Amonijak, 25 % -tna (V / V) otopina u vodi, HPLC čistoće (Fluka, Steinheim, Njemačka)
- Amonijev acetat, AA, čistoće p.a. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Amonijev hidrogenkarbonat, AH, čistoće p.a. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

- Certificirane otopine pufera za kalibraciju pH-metra – pH 7,00 i pH 10,01 (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Dimetilsulfoksid, DMSO, čistoće p.a. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Metanol, MeOH, HPLC čistoće (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- Mravlja kiselina, HPLC čistoće (Fluka, Steinheim, Njemačka)
- Voda – predestilirana, pročišćena i deionizirana, otpor manji od 18,2 MΩ pri 25 °C i ukupna masena koncentracija organskog ugljika manja od 5 µg l⁻¹

4.1.4. Kemikalije korištene pri određivanju lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

- Dimetilsulfoksid, DMSO, čistoće p.a. (Carlo Erba, Cornaredo, MI, Italija)
- Imipramin hidroklorid (Sigma, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)
- Testosteron (Steraloids, Newport, RI, Sjedinjene Američke Države)
- Primidon (Sigma, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, Na₂HPO₄ × 2H₂O (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Amonijak, 25 % -tna (V / V) otopina u vodi, HPLC čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, min. 36,5 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- n-Oktanol (Acros Organics, Morris, NJ, Sjedinjene Američke Države)
- Unutarnji standard (sintetiziran u F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Švicarska)
- Acetonitril, ACN, čistoće p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina, HPLC čistoće (Fluka, Steinheim, Njemačka)
- Voda – predestilirana, pročišćena i deionizirana, otpor manji od 18,2 MΩ pri 25 °C i ukupna masena koncentracija organskog ugljika manja od 5 µg l⁻¹

4.2. Priprava otopina

4.2.1. Priprava otopina korištenih pri kromatografskim analizama

Priprava izvornih i radnih otopina standarda korištenih za kalibraciju RP-HPLC sustava pri upotrebi CHI metode

Izvorna otopina svakog kalibracijskog standarda (STD_1 – STD_10) masene koncentracije 1 mg ml⁻¹ pripravljena je otapanjem 1 mg spoja u 1 ml otapala. Kao otapalo korišten je acetonitril, osim za STD_5 – 8-fenilteofilin koji je otopljen u DMSO-u.

Iz izvornih otopina kalibracijskih standarda masene koncentracije 1 mg ml⁻¹ pripravljena je smjesa za kalibraciju RP-HPLC sustava tako da se pomiješalo 10 µl izvorne otopine svakog kalibracijskog standarda pri čemu je svaki kalibracijski standard bio zastupljen u smjesi u masenoj koncentraciji od 0,1 mg ml⁻¹.

Priprava izvornih i radnih otopina kalibracijskih standarda i makrocikličkih spojeva početne skupine korištenih za istraživanje utjecaja eksperimentalnih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova

Iz izvornih otopina kalibracijskih standarda (STD_1 – STD_10) masene koncentracije 1 mg ml⁻¹ pripravljene su radne otopine masene koncentracije od 0,1 mg ml⁻¹ razrjeđivanjem 10 µL izvorne otopine u 90 µl smjese otapala koja se sastojala od vode i acetonitrila (1:1, V / V).

Izvorne otopine makrocikličkih spojeva početne skupine koncentracije 50 mM pripravljene su na sljedeći način:

- MAC_1 – karbetocin: otapanjem 49,4 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_2 – rifampicin: otapanjem 41,2 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_3 – oktreotid: otapanjem 5,1 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_4 – rifapentin: otapanjem 43,9 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_5 – rifabutin: otapanjem 42,4 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_6 – anidulafungin: otapanjem 57,0 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_7 – telitromicin: otapanjem 40,6 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_8 – takrolimus: otapanjem 40,2 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_9 – pimekrolimus: otapanjem 40,5 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_10 – azitromicina: otapanjem 37,5 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_11 – eritromicin: otapanjem 36,7 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_12 – dekladinozil azitromicin: otapanjem 29,5 mg krutine u 1 ml DMSO-a;

- MAC_13 – azahomoeritromicin: otapanjem 36,8 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_14 – klaritromicin : otapanjem 37,4 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_15 – roksitromicin: otapanjem 41,9 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_16 – josamicin: otapanjem 41,4 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_17 – N'-demetil azitromicin: otapanjem 36,8 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_18 – spiramicin: otapanjem 42,2 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_19 – midekamicin: otapanjem 40,7 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- MAC_20 – ciklosporina: otapanjem 6,01 mg krutine u 1 ml DMSO-a.

Radna otopina svakog makrocikličkog spoja koncentracije 1,25 mM pripravljena je razrjeđivanjem 2,5 µL izvorne otopine koncentracije 50 mM u 97,5 µl smjese otapala koja se sastojala od vode i acetonitrila (1:1, V / V).

Priprava radnih otopina makrocikličkih spojeva proširene skupine korištenih za provjeru primjene kromatografske metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva

Izvorne otopine makrocikličkih spojeva proširene skupine korištenih za provjeru kromatografske metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva, dobivene su iz banke spojeva Fidelte d.o.o. (danas Selvita d.o.o.) kao otopine u DMSO-u koncentracije 50 mM. Radna otopina svakog makrocikličkog spoja koncentracije 1,25 mM pripravljena je razrjeđenjem 2,5 µl izvorne otopine koncentracije 50 mM u 97,5 µl smjese otapala koja se sastojala od vode i acetonitrila (1:1, V / V).

Priprava radnih otopina makrocikličkih spojeva proširene skupine korištenih za istraživanje mogućnosti kromatografskog određivanje lipofilnosti grupiranjem spojeva u skupine od tri člana

Otopine međurazrijeđenja makrocikličkih spojeva proširene skupine koncentracije 10 mM pripravljene su razrjeđivanjem 10 µL izvorne otopine koncentracije 50 mM u 40 µl acetonitrila.

Radne otopine makrocikličkih spojeva proširene skupine korištenih za istraživanje mogućnosti kromatografskog određivanje lipofilnosti grupiranjem spojeva u skupine od tri člana pripravljene su grupiranjem u skupine tako da se molekulske mase članova grupe razlikuju za najmanje 5 Da. Pomiješano je 15 µl otopine međurazrijeđenja svakog člana grupe te se 15 µl tako pripremljene smjese spojeva razrijedilo s 50 µl acetonitrila do koncentracije od 0,9 mM.

Priprava izvorne otopine korištene za pripravu vodenih dijelova pokretnih faza

Izvorna otopina amonijevog acetata koncentracije 200 mM pripravljena je otapanjem 15,4 g amonijevog acetata u 1 l vode.

Priprava puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze za kromatografsko određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode

Otopina amonijevog acetata koncentracije 50 mM korištena kao vodeni dio pokretne faze pripravljena je razrjeđenjem 250 ml izvorne otopine amonijevog acetata koncentracije 200 mM s 750 ml vode te joj je pH vrijednost podešena na 7,40 pomoću otopine amonijaka.

Priprava vodenih dijelova pokretnih faza korištenih za istraživanje utjecaja eksperimentalnih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova

Otopina amonijevog acetata koncentracije 5 mM korištena kao vodeni dio pokretne faze pripravljena je razrjeđenjem 25 ml izvorne otopine amonijevog acetata koncentracije 200 mM s 975 ml vode.

Otopina amonijevog acetata koncentracije 10 mM korištena kao vodeni dio pokretne faze pripravljena je razrjeđenjem 50 ml izvorne otopine amonijevog acetata koncentracije 200 mM s 950 ml vode.

Otopina amonijevog acetata koncentracije 30 mM korištena kao vodeni dio pokretne faze pripravljena je razrjeđenjem 150 ml izvorne otopine amonijevog acetata koncentracije 200 mM s 850 ml vode.

Otopina amonijevog acetata koncentracije 70 mM korištena kao vodeni dio pokretne faze pripravljena je razrjeđenjem 350 ml izvorne otopine amonijevog acetata koncentracije 200 mM s 650 ml vode.

Amonijev acetat koncentracije 70 mM korišten kao vodeni dio pokretne faze pripremljen je razrjeđenjem 0,35 l izvorne otopine amonijevog acetata koncentracije 200 mM do volumena od 1 l.

Amonijev hidrogenkarbonat koncentracije 10 mM korišten kao vodeni dio pokretne faze pripremljen je otapanjem 0,791 g amonijevog hidrogenkarbonata u 1 l vode.

Amonijev hidrogenkarbonat koncentracije 50 mM korišten kao vodeni dio pokretne faze pripremljen je otapanjem 3,95 g amonijevog hidrogenkarbonata u 1 l vode.

Svim otopinama je podešena pH vrijednost na 7,40 pomoću amonijaka. Pripravljene su neposredno prije kromatografskih analize te su prije upotrebe filtrirane kroz PTFE filter veličine pora od 0,22 μm .

4.2.2. Priprava otopina za određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Priprava fosfatnog pufera i n-oktanola

Otopina klorovodične kiseline koncentracije 5 M ($M = \text{mol l}^{-1}$) pripravljena je razrjeđenjem 43,6 ml koncentrirane klorovodične kiseline s 56,4 ml vode.

Fosfatni pufer koncentracije 25 mM ($\text{mM} = \text{mmol l}^{-1}$) pripremljen je otapanjem 8,90 g natrijevog hidrogenkarbonata dihidrata u 2 l vode te je pH vrijednost otopine podešana na 7,40 pomoću klorovodične kiseline koncentracije 5 M. Nakon dodatka 100 ml n-oktanola i intenzivnog miješanja 72 sata, slojevi su odvojeni pomoću lijevka za odjeljivanje. Pripremljeni pufer, zasićen n-oktanolom, filtriran je kroz politetrafluoretilenski (PTFE) filter veličine pora od 0,22 μm .

n-Oktanol, zasićen fosfatnim puferom, pripremljen je kako opisano u prethodnom odlomku.

Priprava radnih otopina makrocikličkih spojeva početne i proširene skupine te otopina kontrolnih spojeva za CAMDIS pokus

Radne otopine makrocikličkih spojeva početne i proširene skupine koncentracije od 10 mM pripravljene su razrjeđivanjem 10 μl izvorne otopine koncentracije 50 mM s 40 μl DMSO-a.

Radne otopine vanjskog standarda i kontrolnih spojeva koncentracije 10 mM koji su se koristili u pokusu pripravljene su na sljedeći način:

- vanjski standard – imipramin: otapanjem 3,17 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- kontrolni spoj – primidon: otapanjem 2,18 mg krutine u 1 ml DMSO-a;
- kontrolni spoj – testosteron: otapanjem 2,88 mg krutine u 1 ml DMSO-a.

Priprava otopine za razrjeđenje uzoraka iz CAMDIS pokusa

Izvorna otopina unutarnjeg standarda masene koncentracije 0,4 mg ml^{-1} pripravljena je otapanjem 0,8 mg unutarnjeg standarda u 2 ml acetonitrila.

Otopina unutarnjeg standarda koncentracije masene koncentracije 50 ng ml^{-1} za razrjeđivanje uzoraka za analize upotrebom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom (engl. *ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, UPLC-MS/MS) pripravljena je razrjeđivanjem 125 μl izvorne otopine unutarnjeg standarda masene koncentracije 0,4 mg ml^{-1} te dodatkom 1 ml mravlje kiseline u smjesu koja se sastojala od 900 ml acetonitrila i 100 ml vode.

Priprava pokretnih faza za UPLC-MS/MS analize uzoraka iz CAMDIS pokusa

Vodeni dio pokretne faze, 0,1 % mravlje kiseline u vodi (V / V), pripremljen je razrjeđivanjem 0,1 ml mravlje kiseline u 1 l vode.

Organski dio pokretne faze, 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu i vodi (0,1:90:10, V / V / V), pripremljen je dodatkom 1 ml mravlje kiseline u smjesu otapala koja se sastojala od 900 ml acetonitrila i 100 ml vode.

4.3. Oprema

4.3.1. Pribor i uređaji

Pribor korišten pri kromatografskim analizama

- PTFE filtri veličine pora 0,2 µm (Whatman, Kent, Velika Britanija)
- Posudice s čepovima koje se koriste u automatskim uzorkivačima kod RP-HPLC analiza (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Automatske pipete s jednokratnim nastavcima (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Plastične posudice s čepovima (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Pribor korišten za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

- PTFE filtri veličine pora 0,2 µm (Whatman, Kent, Velika Britanija)
- Polipropilenske pločice s 96 jažica, V-dno (Thermo Scientific Nunc, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Pločice s 96 dubokih jažica i filtracijskim sustavom MultiScreen (Billerica, MA, Sjedinjene Američke Države)
- Polipropilenske pločice s 96 dubokih jažica, 2 ml (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Teflonske CAMDIS pločice s 96 jažica (napravljene po narudžbi)
- Univerzalni poklopci za pločice (Thermo Scientific Nunc, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Pločice s posudicama za difuziju i filtraciju, DIFI (Weidmann Plastics Technology, Rapperswil, Švicarska)
- Polipropilenske pločice s 96 dubokih jažica, 1 ml (Treff Lab, Torekov, Švedska)
- Polipropilenske pločice s 96 jažica, U-dno (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Adhezivne folije za zatvaranje pločica EZ-Pierce (Sigma, Steinheim, Njemačka)
- Adhezivne folije za zatvaranje pločica za kromatografsku analizu s utiskom za 96 jažica (JG Finneran, Vineland, NJ, Sjedinjene Američke Države)

Uređaji korišteni za pripremu pokretnih faza za kromatografske analize

- Analitička vaga AT261 DeltaRange (Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Švicarska)
- Vibracijska mješalica IKA-MS2 minishaker (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj Sonorex Super RK 514 BH (Bandelin electronic, Berlin, Njemačka)
- Digitalni pH-metar Orion 370 (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Kombinirana staklena elektroda (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Uređaj za pročišćavanje vode Milli Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, Sjedinjene Američke Države)

Uređaji korišteni za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

- Automatska jedinica Freedom EVO s EVOware programom za upravljanje (Tecan, Männedorf, Švicarska)
- Automatska jedinica JANUS s WinPrep programom za upravljanje (Perkin Elmer, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države)
- Centrifuga SL 40R (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, Sjedinjene Američke Države)
- Termomikser, ThermoMixer C s ThermoTop (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Uređaj za pročišćavanje vode Milli Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, Sjedinjene Američke Države)

4.3.2. Instrumenti

Instrument korišten za kromatografske analize

Sva mjerenja su provedena upotrebom RP-HPLC-DAD-MS metode na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) spregnutim s Micromass Quattro micro API spektrometrom masa (Waters, Milford, MA, Sjedinjene Američke Države). HPLC instrument je opremljen kvarternom pumpom, termostatiranim automatskim uzorkivačem, termostatiranim odjeljkom za kolone te DAD-om.

Instrument korišten za analize uzoraka iz pokusa za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Sva mjerenja su provedena upotrebom UPLC-MS/MS metode na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spregnutim

s API4000 spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom kao analizatorom masa (AB Sciex Instruments, Foster City, CA, Sjedinjene Američke Države).

4.3.3. Kromatografske kolone

Kromatografske kolone korištene za kromatografske analize

- Luna C18(2), duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 5 μm , veličine pora 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Luna C18(2) HST, duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 2,5 μm , veličine pora 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Atlantis dC18, duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 3 μm , veličine pora 100 Å (Waters, Manchester, Velika Britanija)
- XBridge BEH C18, duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 2,1 mm, veličine čestica 3,5 μm , veličine pora 130 Å (Waters, Manchester, Velika Britanija)
- XTerra Shield RP18, duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 3,5 μm , veličine pora 125 Å (Waters, Manchester, Velika Britanija)
- XSelect CSH C18, duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 5 μm , veličine pora 130 Å (Waters, Manchester, Velika Britanija)

Kromatografska kolona korištena za analizu uzoraka iz pokusa za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

- Luna Omega Polar C18, duljine 30 mm, unutarnjeg promjera 2,1 mm, veličine čestica 1,6 μm , veličine pora 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, Sjedinjene Američke Države)

4.3.4. Programi korišteni za upravljanje RP-HPLC-DAD-MS i UPLC-MS/MS sustavima te za obradu podataka

- MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, Velika Britanija)
- Applied Biosystems Analyst 1.6.3 (AB Sciex Instruments, Toronto, Kanada)
- DiscoveryQuant 3.0.1 (AB Sciex Instruments, Toronto, Kanada)
- Microsoft Excel 2013 and 2016 (Microsoft, Redmond, WA, Sjedinjene Američke Države)
- ACD/Labs Percepta 14.2.0 (ACD/Labs, Toronto, Kanada)

4.4. Metode

4.4.1. Određivanje log D vrijednosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Makrocikličkim spojevima početne i proširene skupine određena je log D vrijednost metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode (73).

4.4.1.1. Provedba pokusa za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

CAMDIS metoda se rutinski provodi u našem laboratoriju na način opisan u literaturi (73), ali uz primjenu još jednog koraka (neobjavljeni rezultati). Kako bi se metoda dodatno ubrzala, spojevi se prije eksperimenta slažu u grupe od tri člana, vodeći računa o kriteriju da se njihove molekulske mase moraju razlikovati za najmanje 5 Da kako bi se izbjegle eventualne interferencije prilikom UPLC-MS/MS analiza uzoraka. Time se u svakom stupcu, umjesto za jedan spoj, određuje lipofilnost za tri spoja, čime se smanjio broj pločica korištenih u eksperimentu, što je značajno olakšalo provedbu samog eksperimenta. Vrijeme trajanja analiza uzoraka smanjilo se za 60 %. Osim u vremenu trajanja analize, značajan je pomak i u potrošnji pokretnih faza te je produljen vijek trajanja kromatografske kolone ako se uzme u obzir broj spojeva koji se profiliraju njezinom upotrebom. Ovakvo grupiranje spojeva ne utječe na log D vrijednost određenu upotrebom CAMDIS metode (neobjavljeni rezultati).

Iz radnih otopina makrocikličkih spojeva početne i proširene skupine koncentracije 10 mM u DMSO-u grupiranjem su pripravljene smjese spojeva koje su sadržavale po tri spoja koncentracije 3,33 mM, na način da se pomiješalo 15 μ l radne otopine svakog člana smjese. Uz istraživane spojeve pokus je sadržavao i vanjski standard imipramin te kontrolne spojeve primidon i testosteron. Volumen od 12 μ l svake smjese spojeva je razrijeđen u 1,188 ml fosfatnog pufera, nakon čega je dobivena otopina filtrirana te je dodano još 200 ml fosfatnog pufera u svrhu sprječavanja eventualnog taloženja spoja za one spojeve koji imaju graničnu topljivost pri ovoj koncentraciji. Tako pripravljena otopina koncentracije 28,5 mM korištena je kao vodeni dio distribucijskog sustava za određivanje log D vrijednosti. Log D vrijednost svakog spoja mjerena je u 6 replika (tri CAMDIS^{hidro} i tri CAMDIS^{lipo} replike) te su pripravljena dva referentna uzorka, jedan koji predstavlja početnu koncentraciju istraživanog spoja te jedan koji je razrijeđen fosfatnim puferom na način da se 30 μ l otopine smjese spojeva u puferu dodatno razrijedilo s 120 μ l pufera. Po 150 μ l otopine je preneseno u stupac teflonske CAMDIS pločice s 96 jažica te prekriveno DIFI pločicom koja je napunjena n-oktanolom za tri CAMDIS^{hidro} replike, odnosno tri CAMDIS^{lipo}

replike te dvije prazne jačice za referentne uzorke, kako je opisano u poglavlju 2.3.3. Pločice su zatvorene adhezivnom folijom za zatvaranje te je tako sastavljena aparatura miješana 18 sati na 21 °C pri 400 rpm. Nakon postizanja ravnoteže između slojeva, aparatura je rastavljena odvajanjem DIFI pločice te je vodeni dio razrijeđen otopinom za razrjeđivanje za UPLC-MS/MS analize koja je sadržavala unutarnji standard. Razrjeđenje uzoraka je provedeno na način da se 5 µl CAMDIS^{hidro} uzoraka razrijedilo s 245 µl otopine za razrjeđivanje (1:49, V/V), dok se 5 µl CAMDIS^{lipō} i referentnih R_b i R_a uzoraka razrijedilo s 445 µl otopine za razrjeđivanje (1:89, V/V).

4.4.1.2. UPLC-MS/MS analize uzoraka iz pokusa za određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Umjesto RP-HPLC-DAD-MS metode za analizu uzoraka kako je opisano u literaturi (73), korištena je UPLC-MS/MS metoda. Konfiguracija instrumenta korištenog u tu svrhu navedena je u poglavlju 4.3.2. Kao vodeni dio pokretne faze korištena je otopina mravlje kiseline u vodi (0,1:100, V / V), dok je kao organski dio pokretne faze korištena otopina mravlje kiseline u acetonitrilu i vodi (0,1:90:10, V / V / V). Kao nepokretna faza, odnosno kromatografska kolona korištena je Luna Omega Polar C18. Protok pokretne faze iznosio je 700 µl min⁻¹, dok je volumen injektiranja iznosio 2 µl. Kromatografska kolona je termostatirana na 50 °C, a uzorci za analizu čuvani u automatskom uzorkivaču na 8 °C. Korišteni gradijent pokretne faze prikazan je u Tablica 4.2.

Tablica 4.2 Gradijent pokretne faze za analizu istraživanih i kontrolnih spojeva te vanjskog standarda iz CAMDIS pokusa

t / min	Vodeni dio pokretne faze φ / %	Organski dio pokretne faze φ / %
0,00 – 0,15	98	2
0,15 – 0,70	98 → 5	2 → 95
0,70 – 1,10	5	95
1,10 – 1,11	5 → 98	95 → 2
1,11 – 1,50	98	2

Za snimanje kromatograma ukupne struje korištena je ionizacija elektroraspršenjem uz primjenu pozitivnog ili negativnog izvora napona te tehnike snimanja višestrukih reakcija (eng. *multiple reaction monitoring*, MRM). Zajedno sa svakim analitom, praćen je i prijelaz unutarnjeg standarda zbog postizanja bolje preciznosti mjerenja, kao i za provjeru ispravnosti rada UPLC-MS/MS sustava. Parametri rada MS detektora prilagođeni su posebno za svaki istraživani uzorak u svrhu postizanja najviše osjetljivosti. Fragmentacije te parametri MS detektora korišteni za detekciju (ion prekursora → ion produkta) unutarnjeg i vanjskog standarda, kontrolnih uzoraka, kao i svakog istraživanog spoja nalaze se u dodatku 8.7. Kvantifikacija je provedena računanjem omjera površine pika analita i pika unutarnjeg standarda.

4.4.1.3. Računanje log D vrijednosti upotrebom CAMDIS metode

Određivanje log D vrijednosti upotrebom CAMDIS metode provedeno je na 6 replika te je vrijednost istraživanih spojeva izračunata kao njihova srednja vrijednost. Log D vrijednost svake replike izračunata je prema Jednadžba 4.1.

$$\log D = \log \left(\frac{R - S}{S} \times \frac{V_V}{V_0} \right)$$

Jednadžba 4.1 Računanje log D vrijednosti upotrebom CAMDIS metode.

gdje je:

- R – omjer površina kromatografskih pikova referentnog uzorka (R_a ili R_b) i unutarnjeg standarda;
- S – omjer površina kromatografskih pikova istraživanog uzorka i unutarnjeg standarda;
- V_V – volumen fosfatnog pufera;
- V_0 – volumen n-oktanola.

Kako bi se napravila korekcija volumena n-oktanola uslijed isparavanja, korišten je imipramin kao vanjski standard. Volumen n-oktanola za CAMDIS^{hidro} i CAMDIS^{lipō} replike korigirao se kako bi log D vrijednost za imipramin iznosila 2,40. Kao kontrolni uzorci korišteni su testosteron i primidon. Na temelju korigiranih vrijednosti n-oktanola te dobivenih log D vrijednosti za kontrolne spojeve ocijenjena je uspješnost CAMDIS pokusa. Pokus se prihvaćao za daljnju obradu podataka ako su vrijednosti n-oktanola bile $10,5 \mu\text{l} \pm 1,0 \mu\text{l}$ za CAMDIS^{hidro} replike, odnosno $1,25 \mu\text{l} \pm 0,12 \mu\text{l}$ za CAMDIS^{lipō} replike. Također, log D vrijednost trebala je biti $0,80 \pm 0,07$ za primidon, odnosno $3,37 \pm 0,05$ za testosteron. U slučaju kada jedan od kriterija uspješnosti pokusa nije zadovoljen, pokus se ponovio.

Za svaki istraživani spoj procijenjen je i eventualni afinitet spoja za plastiku koja se koristi u pokusu prema Jednadžba 4.2.

$$\% \text{ razlike} = \frac{R_a}{R_b} \times 100$$

Jednadžba 4.2 Računanje afiniteta spoja za plastiku upotrebom CAMDIS metode.

gdje je:

- R_a – omjer površina kromatografskih pikova uzorka i unutarnjeg standarda za referentni uzorak razrijeđen fosfatnim puferom (1:5, V / V);
- R_b – omjer površina kromatografskih pikova uzorka i unutarnjeg standarda za referentni uzorak koji predstavlja početnu koncentraciju spoja.

Ukoliko je $R_a \leq 25\%$ od R_b , R_b je korišten u jednadžbi za računanje $\log D$ vrijednosti. Ukoliko je $R_a \geq 25\%$ od R_b , kao referentni uzorak uzeta je vrijednost u iznosu $5 \times R_a$. U slučaju kad je $R_a \geq 80\%$ od R_b , smatralo se da je tijekom pokusa došlo do taloženja spoja u fosfatnom puferu.

4.4.2. Kromatografsko određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode

Kromatografske analize spojeva u svrhu određivanja lipofilnosti upotrebom CHI metode (22,77) provedene su pomoću RP-HPLC-DAD-MS sustava. Konfiguracija instrumenta korištenog u tu svrhu navedena je u poglavlju 4.3.2.

4.4.2.1. RP-HPLC-DAD-MS uvjeti za određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode

Za određivanje lipofilnosti spojeva CHI metodom kao vodeni dio pokretne faze korištena je otopina amonijevog acetata koncentracije 50 mM pri pH vrijednosti 7,40, dok je kao organski dio pokretne faze korišten acetonitril. Nepokretna faza, odnosno kromatografska kolona bila je Luna C18(2), duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 5 μm te veličine pora 100 Å. Protok pokretne faze bio je 1 ml min^{-1} tijekom cijelog mjerenja, dok je injektirani volumen uzorka iznosio 2 μl . Kromatografska kolona je termostatirana na 25 °C, a uzorci za analizu čuvani u automatskom uzorkivaču na 15 °C. Gradijentna analiza provodila se za svaki spoj dva puta. Gradijent pokretne faze korišten za analize prikazan je u Tablica 4.3.

Tablica 4.3 Gradijent pokretne faze za kromatografsko određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode.

t / min	Vodeni dio pokretne faze φ / %	Organski dio pokretne faze φ / %
0,00 – 3,00	100 → 0	0 → 100
3,00 – 3,50	0	100
3,50 – 3,70	0 → 100	100 → 0
3,70 – 5,00	100	0

Kromatogrami su dobiveni snimanjem pomoću DAD-a s korištenim rasponom valnih duljina od 190 do 600 nm. S obzirom da većina istraživanih makrocikličkih spojeva ne apsorbira u UV/VIS području mjerljivom DAD-om, za njihovu detekciju korišten je MS detektor. Za snimanje kromatograma ukupne ionske struje (engl. *total-ion current*, TIC) i spektara masa korištena je ionizacija elektroraspršenjem uz izmjenu pozitivnih i negativnih potencijala pri rasponu omjera mase i naboja (engl. *mass-to-charge ratio*, m/z) koja

odgovara ionu protoniranog spoja $[M-H]^+$ od 300 do 1300. Kapilarni napon je bio oko 2500 V, ekstrakcijske elektrode u obliku stošca oko 3 V, a elektrode u obliku stošca u koji ulazi ionizirani uzorak oko 30 V. Temperatura desolvatacije bila je oko 350 °C, a temperatura izvora oko 150 °C. Protok dušika korištenog za desolvataciju je bio oko 700 l h⁻¹, a protok plina pri elektrodi u obliku stošca oko 80 l h⁻¹. Omjer rezolucije masa težih i lakših iona bio je podešen na 15/15.

4.4.2.2. Računanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI) i Chrom log D vrijednosti istraživanih spojeva upotrebom CHI metode

Pri kromatografskom određivanju lipofilnosti upotrebom CHI metode kromatografski sustav je prije svakog mjerenja kalibriran pomoću 10 spojeva koji pripadaju klasi malih molekula koje se upotrebljavaju kao kalibracijski standardi upotrebom CHI metode (77) (Tablica 4.4). Prikazane CHI vrijednosti standarda odnose se na pH vrijednost puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze od 7,40. U dodatku 8.5 dane su molekulske strukture, formule i mase svih kalibracijskih standarda.

Tablica 4.4 Kalibracijski standardi i njihovi kromatografski indeksi hidrofobnosti CHI pri pH 7,40 koji se koriste za kalibraciju RP-HPLC sustava upotrebom CHI metode za određivanje lipofilnosti.

Oznaka spoja	Naziv spoja	CHI
STD_1	Teofilin	18,4
STD_2	5-Feniltetrazol	23,6
STD_3	Benzimidazol	34,3
STD_4	Kolhicin	43,9
STD_5	8-Fenilteofilin	51,7
STD_6	Acetofenon	64,1
STD_7	Indol	72,1
STD_8	Propiofenon	77,4
STD_9	Butirofenon	87,3
STD_10	Valerofenon	96,4

Vremena zadržavanja kalibracijskih standarda dobivena upotrebom CHI metode linearnom regresijom dovedena su u ovisnost s njihovim literaturnim CHI vrijednostima čime je dobivena Jednadžba 2.7. Dobivena kalibracijska jednadžba, odnosno nagib dobivenog kalibracijskog pravca A te njegov odsječak B korišteni su za određivanje CHI vrijednosti istraživanih makrocikličkih spojeva. Tako dobivene CHI vrijednosti upotrebom Jednadžba 2.8 preračunate su u Chrom log D vrijednosti (38).

4.4.3. Istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova istraživanih spojeva

Kromatografske analize pri kojima su se mijenjali kromatografski uvjeti provedene su u svrhu istraživanja eksperimentalnih promjena na vremena zadržavanja spojeva, ali i na oblik i simetriju kromatografskih pikova. Ove promjene istraživane su na kalibracijskim standardima koji pripadaju malim molekulama, kao i na spojevima koji pripadaju početnoj skupini makrocikala. Sva mjerenja provedena su na RP-HPLC-DAD-MS instrumentu (poglavlje 4.3.2). Uvjeti DAD-a, kao i MS detektora su bili jednaki onima primijenjenim za određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode.

Istraživanje utjecaja eksperimentalnih uvjeta na vremena zadržavanja odabranih spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova provedeno je mijenjanjem više kromatografskih parametara. Eksperimentalni uvjeti koji su proučavani su:

- temperatura kromatografske kolone;
- brzina primijenjenog gradijenta;
- protok pokretne faze;
- upotreba vrste nepokretne faze, odnosno kromatografske kolone;
- koncentracija i vrsta puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze;
- vrsta organskog otapala u pokretnoj fazi.

4.4.3.1. Utjecaj temperature kromatografske kolone

Temperatura kromatografske kolone koja se koristi upotrebom CHI metode je 25 °C. Istražen je utjecaj povećanja temperature kromatografske kolone na 40 °C, 50 °C te 60 °C. Svi ostali parametri bili su jednakim onima u CHI metodi.

4.4.3.2. Utjecaj brzine gradijenta

CHI metoda za određivanje lipofilnosti koristi linearno gradijentno ispiranje od 0 do 100 % (V / V) organskog dijela pokretne faze, odnosno acetonitrila, kroz 3 minute. Istražen je utjecaj brzine primijenjenog gradijenta na način da je primijenjen linearni gradijent kroz 2, 5 i 7 minuta. Svi ostali parametri bili su jednakim onima u CHI metodi.

4.4.3.3. Utjecaj protoka pokretne faze

Protok pokretne faze koji se koristi upotrebom CHI metode je 1 ml min⁻¹ tijekom cijelog mjerenja. Istražen je utjecaj promjene protoka pokretne faze te su primijenjeni protoci od

0,5 ml min⁻¹, 1,5 ml min⁻¹ te 2 ml min⁻¹. Za ovo istraživanje primijenjen je linearni gradijent kroz 5 minuta. Svi ostali parametri bili su jednakim onima u CHI metodi.

4.4.3.4. Utjecaj vrste kromatografske kolone

U svrhu istraživanja utjecaja nepokretne faze, odnosno kromatografske kolone korišteno je pet alternativnih kromatografskih kolona. S obzirom na ograničenje maksimalnog tlaka sustava na 400 bar-a, kao i na razlike u duljini istraženih kolona, prema potrebi prilagođen je i gradijentni način ispiranja za svaku primijenjenu kromatografsku kolonu (Tablica 4.5). Svi ostali parametri bili su jednakim onima u CHI metodi.

Tablica 4.5 Gradijenti pokretne faze za istraživanje utjecaja odabrane kromatografske kolona na vrijeme zadržavanja istraženih spojeva.

Kromatografska kolona	t / min	Vodeni dio pokretne faze φ / %	Organski dio pokretne faze φ / %
Atlantis dC18 XBridge BEH XTerra RP18	0,00 – 3,00	100 → 0	0 → 100
	3,00 – 3,50	0	100
	3,50 – 3,70	0 → 100	100 → 0
	3,70 – 5,00	100	0
Luna HST	0,00 – 3,80	100 → 0	0 → 100
	3,80 – 4,40	0	100
	4,40 – 4,60	0 → 100	100 → 0
	4,60 – 6,20	100	0
XSelect CSH	0,00 – 3,00	95 → 0	5 → 100
	3,00 – 3,50	0	100
	3,50 – 3,70	0 → 95	100 → 5
	3,70 – 5,00	95	5

4.4.3.5. Utjecaj koncentracije i vrste puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze

Za istraživanje utjecaja koncentracije puferske otopine koja se koristi kao vodeni dio pokretne faze korišten je amonijev acetat u koncentracijama od 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM i 70 mM. Također, istražen je i utjecaj zamjene amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom kao puferskom otopinom korištenom kao vodeni dio pokretne faze, i to u koncentracijama od 10 mM i 50 mM. Svi ostali parametri bili su jednakim onima u CHI metodi.

4.4.3.6. Utjecaj vrste organskog otapala u pokretnoj fazi

Istražen je utjecaj vrste organskog otapala u pokretnoj fazi tako da je acetonitril kao organsko otapalo u pokretnoj fazi zamijenjen metanolom. Pritom je kao vodeni dio pokretne faze upotrijebljen amonijev acetat koncentracije 50 mM. Također, istražen je i utjecaj upotrebe amonijevog hidrogenkarbonata u koncentracijama od 50 mM i 10 mM kao

puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze i metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi. U ovom istraživanju primijenjeni su linearni gradijenti kroz 5 minuta. Svi ostali parametri bili su jednakim onima u CHI metodi.

5. REZULTATI I RASPRAVA

Poglavlje Rezultati i rasprava podijeljeno je u nekoliko cjelina. Prvi dio opisuje profiliranje početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom poznatih metoda. Makrocikličkim spojevima početne skupine izmjerene su log D vrijednosti pomoću metode izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode. Ista skupina spojeva je zatim profilirana upotrebom CHI metode za kromatografsko određivanje lipofilnosti.

U drugom dijelu poglavlja prikazani su rezultati vezani uz istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja spojeva te na oblik i simetriju kromatografskih pikova. Pritom su se za navedena istraživanja koristile male molekule koje se upotrebljavaju kao standardi za kalibraciju CHI metode te početna skupina makrocikličkih spojeva.

Odabir kombinacije najboljih eksperimentalnih uvjeta za kromatografsko lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva napravljen je u trećem dijelu poglavlja. Zatim je metodom razvijenom u ovom radu profilirana proširena skupina makrocikličkih spojeva koja se sastojala od 236 novih makrocikličkih spojeva iz FideltaMacro™ platforme u svrhu provjere kromatografske metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva razvijene unutar ovog doktorskog rada. Pritom je predložena jednadžba za prevođenje vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva u log D vrijednosti. Također, prikazani su i rezultati istraživanja gdje se proučavala mogućnost grupiranja spojeva za kromatografsku analizu u svrhu ubrzanja procesa kromatografskog određivanja lipofilnosti.

Na kraju, u četvrtom dijelu napravljena je usporedba rezultata dobivenih različitim metodama određivanja log D vrijednosti proširene skupine makrocikličkih spojeva pri čemu su log D vrijednosti dobivene metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode uspoređene s *in silico* log D vrijednostima, kako i s eksperimentalnim log D vrijednostima dobivenima upotrebom CHI metodom te metode razvijene u ovom radu.

5.1. Određivanje lipofilnosti početne skupine makrocikličkih spojeva metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Upotrebom CAMDIS metode opisane u poglavlju 4.4.1 (73) određene su log D vrijednosti za 20 makrocikličkih spojeva početne skupine. Rezultati su prikazani u Tablica 5.1.

Tablica 5.1 CAMDIS log *D* vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva.

Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar
MAC_1	< -0,2	/	5	Izvan granica metode
MAC_2	1,12	0,09	6	/
MAC_3	< -0,2	/	3	Izvan granica metode
MAC_4	2,61	0,29	5	/
MAC_5	3,92	0,07	5	/
MAC_6	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora
MAC_7	/	/	/	Neprecizni rezultati
MAC_8	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora
MAC_9	/	/	/	Neprikladna analitička metoda
MAC_10	0,75	0,34	6	/
MAC_11	0,77	0,26	5	/
MAC_12	0,82	0,23	4	/
MAC_13	0,37	0,42	4	/
MAC_14	1,51	0,07	3	/
MAC_15	1,72	0,06	4	/
MAC_16	3,25	0,07	5	/
MAC_17	0,53	0,07	2	/
MAC_18	0,86	0,20	5	/
MAC_19	2,61	0,07	4	/
MAC_20	/	/	/	Taloženje u puferu

Kako bi se dobili što precizniji podaci o lipofilnosti, CAMDIS pokus se za početnu skupinu makrocikličkih spojeva proveo ukupno 6 puta te je log *D* vrijednost izračunata kao srednja vrijednost svih mjerenja (Tablica 5.1). Razlog većeg broja mjerenja je potreba za što preciznijim određivanjem log *D* vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva jer je CAMDIS log *D* vrijednost uzeta kao referentna vrijednost s kojim su uspoređivani pokazatelji lipofilnosti dobiveni drugim metodama u ovom radu. Može se primijetiti kako za 7 spojeva nije bilo moguće odrediti CAMDIS log *D* vrijednost iz nekoliko razloga. Spojevima MAC_1 – karbetocinu i MAC_3 – oktreetidu nije bilo moguće odrediti konkretnu vrijednost lipofilnosti jer nije dobivena dovoljna razlika između omjera analita i unutarnjeg standarda između istraživanih uzoraka i referentnog uzorka, što ukazuje da je riječ o izrazito hidrofilnim spojevima kod kojih gotovo i da ne dolazi do raspodjele u *n*-oktanol. Za ove spojeve log *D* vrijednost nije iskazana konkretnim brojem, već je izražena kao < -0,2 jer je log *D* vrijednost izvan granica metode. Za spojeve MAC_6 – anidulafungin i MAC_8 – takrolimus UPLC-MS/MS analiza uzoraka nije bila uspješna zbog nemogućnosti pronalaska prikladnih parametara rada MS detektora, odnosno u slučaju spoja MAC_9 – pimekrolimusa zbog neprikladnosti analitičke metode. Prilikom dodavanja spoja MAC_20 – ciklosporina u fosfatni pufer došlo je do taloženja, što upućuje na nedovoljnu topljivost

spoja u mediju za provedbu pokusa. U slučaju spoja MAC_7 – telitromicina u ponovljenim pokusima dobiveni su značajno različiti rezultati, odnosno primijećen je prevelik rasap dobivenih log *D* vrijednosti pa je naznačeno da su dobiveni neprecizni rezultati. Za ostalih 13 od 20 spojeva početne skupine uspješno je određena CAMDIS log *D* vrijednost.

Proučavanjem raspona CAMDIS log *D* vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva, može se primijetiti da je raspon prilično širok i kreće se od $< -0,2$ do 3,92. Spojeve čije su CAMDIS log *D* vrijednosti manje od 0 smatramo hidrofilnima, dok one s log *D* vrijednostima iznad 3 smatramo lipofilnima. Stoga spojeve MAC_5 – rifabutin i MAC_16 – josamicin svrstavamo u lipofilnu, dok spojevi MAC_1 – karbetocin i MAC_3 – oktreetid spadaju u hidrofilnu kategoriju. Ostali spojevi imaju log *D* vrijednosti koje smatramo optimalnima za razvoj oralno bioraspoloživog lijeka (23).

Analiziramo li dobivene standardne devijacije mjerenja (Tablica 5.1), može se primijetiti da je za neke spojeve dobivena vrlo niska standardna devijacija što upućuje na dobru ponovljivost mjerenja i pouzdanost dobivenog rezultata. Međutim, za nekolicinu spojeva to nije slučaj, što upućuje na visoku osjetljivost metode pa tako i male promjene u provedbi pokusa mogu značajno promijeniti konačni rezultat mjerenja lipofilnosti ovih spojeva upotrebom CAMDIS metode.

CAMDIS metoda je minijaturizirna direktna metoda izmućkivanja (73), a lipofilnost spojeva dobivena izmućkivanjem u sustavu *n*-oktanol i vode još uvijek se smatra zlatnim standardnom za određivanje lipofilnosti (55). Iz tog razloga CAMDIS log *D* vrijednosti makrocikličkih spojeva početne skupine dobivene u ovom pokusu definirane su kao referentne vrijednosti te su korištene za usporedbu s kromatografskim pokazateljima lipofilnosti dobivenim upotrebom različitih kromatografskih metoda za određivanje lipofilnosti.

5.2. Kromatografsko određivanje lipofilnosti početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom CHI metode

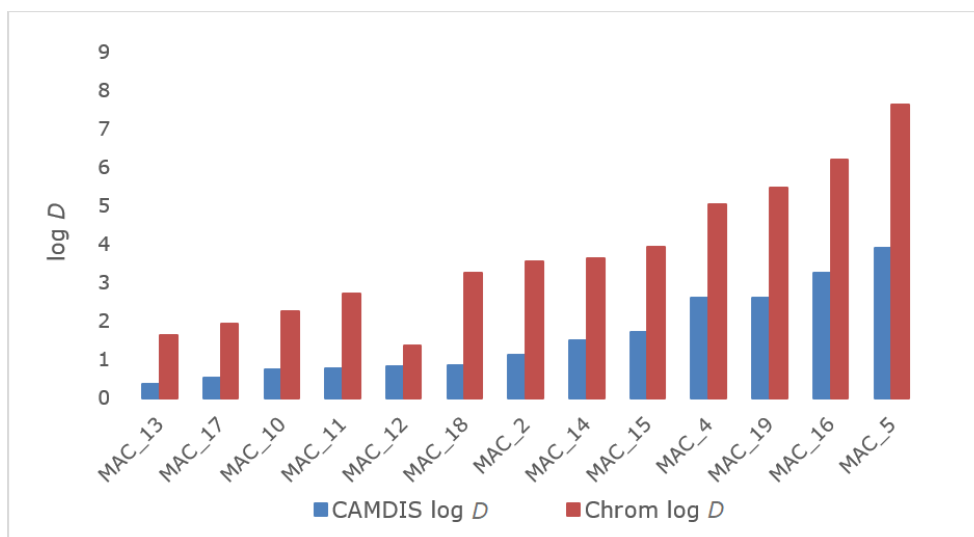
Kromatografska lipofilnost određena je za početnu skupinu makrocikličkih spojeva upotrebom CHI metode opisane u poglavlju 4.4.2. Dobivene Chrom log *D* vrijednosti prikazane su u Tablica 5.2.

Tablica 5.2 Vremena zadržavanja, CHI te Chrom log *D* vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva dobivene upotrebom CHI metode.

Oznaka spoja	t_R / min	CHI	Chrom log <i>D</i>
MAC_1	2,52	49,3	2,23
MAC_2	2,84	64,8	3,55
MAC_3	2,53	49,8	2,27
MAC_4	3,20	82,2	5,05
MAC_5	3,82	112	7,62
MAC_6	3,21	82,7	5,09
MAC_7	2,71	58,5	3,01
MAC_8	3,93	118	8,07
MAC_9	4,33	137	9,73
MAC_10	2,53	49,8	2,27
MAC_11	2,64	55,1	2,72
MAC_12	2,31	39,2	1,36
MAC_13	2,38	42,5	1,65
MAC_14	2,86	65,8	3,64
MAC_15	2,93	69,2	3,93
MAC_16	3,48	95,8	6,21
MAC_17	2,45	45,9	1,94
MAC_18	2,77	61,4	3,26
MAC_19	3,30	84,2	5,46
MAC_20	3,96	119	8,20

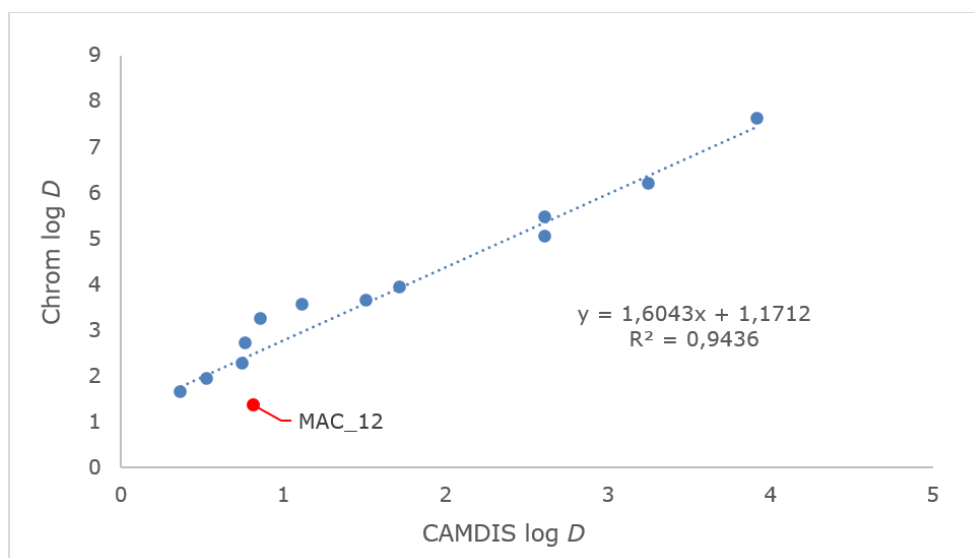
Određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode za početnu skupinu makrocikličkih spojeva dobiven je raspon Chrom log *D* vrijednosti od 1,36 do 9,73. Pritom najnižu lipofilnosti imaju spojevi koji se pri pH uvjetima kromatografske analize, odnosno fiziološkom pH od 7,40, nalaze u ioniziranom obliku (MAC_12 – dekladinozil azitromicin, MAC_13 – azahomoeritromicin i MAC_17 – N'-demetil azitromicin), oni koji su u neutralnom obliku, ali jako hidrofilni (MAC_1 – karbetocin) ili kombinacija oba navedena razloga (MAC_3 – oktreetid). S druge strane, najvišu lipofilnost su pokazali spojevi koji imaju veliku molekulsku masu ili ne ioniziraju pri pH vrijednosti od 7,40 (MAC_8 – takrolimus, MAC_9 – pimekrolimus i MAC_20 – ciklosporin).

Poznato je da je Chrom log *D* skala za otprilike dvije logaritamske jedinice viša od log *D* vrijednosti dobivenih metodom izmućivanja (97). Ovo opažanje je primijećeno i na početnoj skupini makrocikličkih spojeva (Slika 5.1). Uz to se može uočiti da se razlika u apsolutnim log *D* vrijednostima upotrebom CAMDIS odnosno CHI metode povećava s povećanjem lipofilnosti spoja, odnosno što je lipofilnost veća, to je veća i razlika između dvije log *D* vrijednosti. Jedina iznimka ovog pravila je MAC_12 – dekladinozil azitromicin za koji je izmjerena Chrom log *D* vrijednost nešto niža od očekivane.



Slika 5.1 Usporedba CAMDIS log D (plavi stupci) i Chrom log D (crveni stupci) vrijednosti za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.

Kada usporedimo Chrom log D rezultate za početnu skupinu spojeva s CAMDIS log D vrijednostima (Slika 5.2), može se primijetiti snažna korelacija između ta dva pokazatelja lipofilnosti s $R^2 = 0,9436$, čak i s MAC_12 – dekladinozil azitromicinom kao očitim izuzetkom iz grupe (prikazan crvenom bojom na grafu). Iz ovih rezultata može se zaključiti da kromatografsko određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode daje rezultate usporedive onima dobivenima metodom izmućkivanja za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.



Slika 5.2 Korelacija između CAMDIS log D i Chrom log D vrijednosti za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.

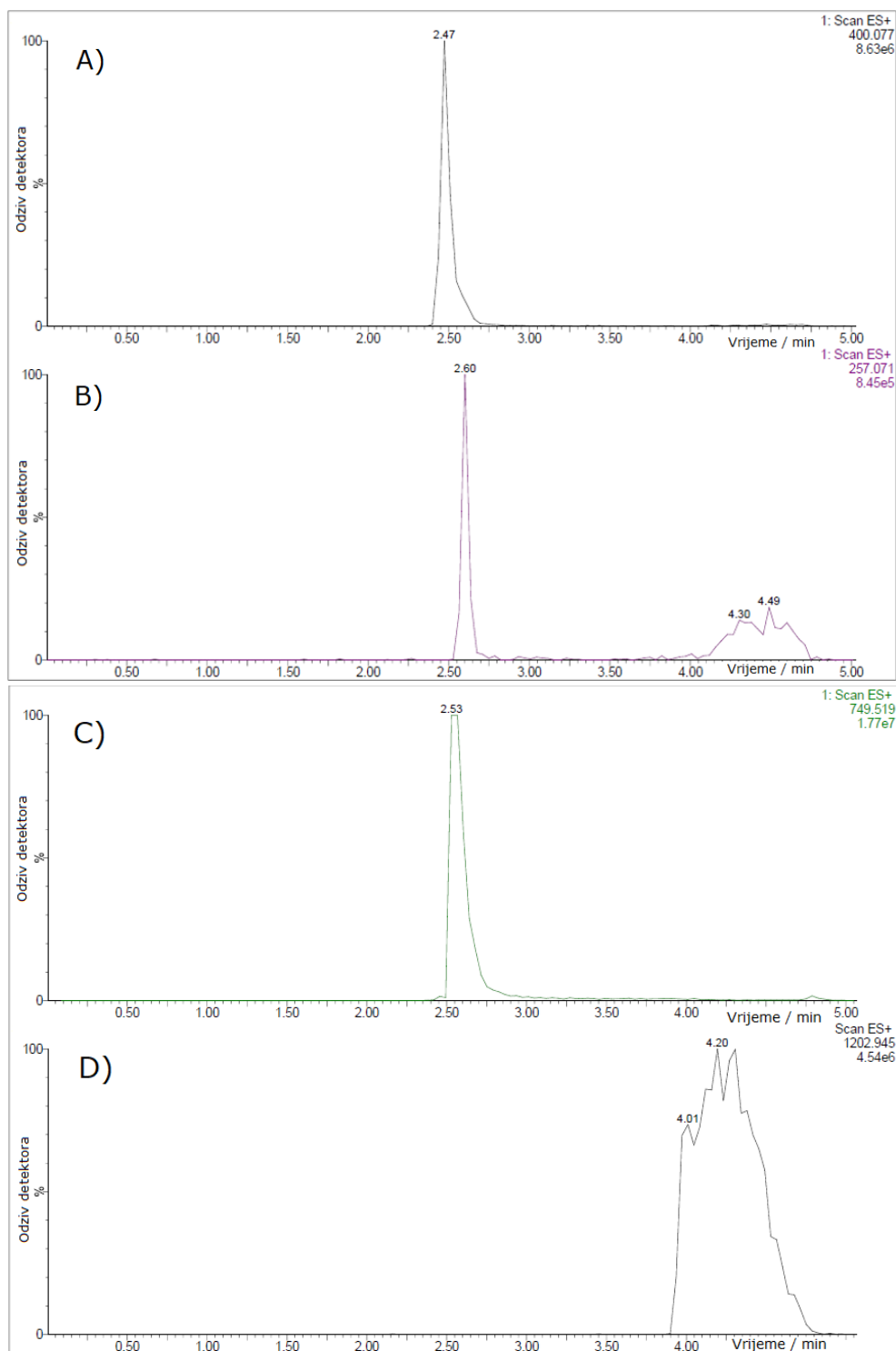
Dakle, CHI metoda se pokazala pouzdanom u predviđanju log D vrijednosti makrocikličkih spojeva, a pokazuje još jednu prednost u odnosu na metodu izmućkivanja. Za nekoliko makrocikličkih spojeva početne skupine nije bilo moguće odrediti log D vrijednost

upotrebom CAMDIS metode. Međutim, tim spojevima je lipofilnost uspješno određena CHI metodom. Također, CHI metoda donosi i sve prednosti koje svaka kromatografska metoda nosi, u smislu jednostavnosti pripreme uzorka, provedbe samog eksperimenta, vremenske učinkovitosti i male količine spoja potrebne za kromatografske analize.

S druge strane, primijećen je jedan značajan nedostatak kad je riječ o kromatografskim analizama makrocikličkih spojeva. Tijekom analiza makrocikličkih spojeva Luna C18 kromatografska kolona koja se koristi za određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode postiže nižu učinkovitost nego kad je riječ o kalibracijskim standardima koji pripadaju klasi malih molekula. Pritom je učinkovitost procijenjena na temelju izgleda kromatografskog pika. Širina kromatografskih pikova makrocikličkih molekula značajno je veća u usporedbi sa širinom pikova kalibracijskih standarda, što može dovesti do otežanog jednoznačnog očitavanja vremena zadržavanja spoja.

Slika 5.3 prikazuje kromatograme dobivene iz TIC kromatograma odabirom odgovarajuće m/z vrijednosti. Riječ je o kalibracijskim standardima STD_4 – kolhicinu i STD_5 – 8-fenilteofilinu koji pripadaju klasi malih molekula te MAC_10 – azitromicinu i MAC_20 – ciklosporinu kao predstavnicima makrocikličkih spojeva. Može se primijetiti kako je kromatografski pik azitromicina širi od kromatografskih pikova malih molekula, dok je u slučaju ciklosporina došlo do dodatnog širenja i značajnije asimetrije pika te se njegovo vrijeme zadržavanja ne može jednoznačno odrediti. Slično je primijećeno i za spojeve MAC_8 – takrolimusa i MAC_9 – pimekrolimusa za koje su vremena zadržavanja očitana iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi. U slučaju ostalih makrocikličkih spojeva vremena zadržavanja su jednoznačno određena, ali je ipak uočena asimetrija kromatografskih pikova. Na temelju ovih zapažanja može se zaključiti kako Luna C18 kromatografska kolona ima nižu učinkovitost u slučaju analiza makrocikličkih spojeva u usporedbi s analizama malih molekula. Prvi razlog tome je spora kinetika vezanja makrocikličkih spojeva na nepokretnu fazu [97]. Drugi, vjerojatno jednako značajan, razlog širokih kromatografskih pikova je što su makrociklički spojevi većinom slabe baze koje se pri pH vrijednosti od 7,40 nalaze u potpuno ili djelomični ioniziranom obliku. Postotak spoja koji se nalazi u ioniziranom obliku ovisi o njegovoj pK_a vrijednosti i pH vrijednosti pokretne faze. S druge strane, površina punila kromatografske kolone sadrži određeni broj slobodnih silanolnih skupina, koje su u većoj ili manjoj mjeri prisutne na svim C18 kromatografskim kolonama (16). One imaju kiselost svojstva pa se pri pH vrijednosti pokretne faze od 7,40 nalaze se u ioniziranom obliku odnosno negativno su nabijene (167). Ionizirana forma bazičnih analita kakvi su makrociklički spojevi imaju mogućnost sekundarnih interakcija sa slobodnim silanolnim skupinama prisutnim na površini punila kromatografske kolone te s njima ostvaruju vodikove veze i elektrostatske interakcije (168). Osim silanolnih skupina, analit može ostvarivati sekundarne interakcije s metalima i drugim aktivnim skupinama na površini nepokretne faze. Svi navedeni razlozi

dovode do jače interakcije ovakvih analita s nepokretnom fazom i značajnije asimetrije kromatografskih pikova, a često i povećanja vremena zadržavanja (15,63).



Slika 5.3 Kromatogrami malih molekula A) STD_4 – kolhicina i B) STD_5 – 8-fenilteofilina te makrocikličkih spojeva C) MAC_10 – azitromicina i D) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom CHI metode.

Na temelju ovih ispitivanja može se zaključiti da se CHI kromatografska metoda za određivanje lipofilnosti u slučaju makrocikličkih spojeva pokazala obećavajućom u smislu

dobre korelacije s CAMDIS log D vrijednostima, ali nešto manje učinkovito za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva nego što je to slučaj s malih molekulama. Kako je cilj ovog rada dobiti pouzdanije kromatografsko određivanje lipofilnosti makrocikličkih molekula i kako bi se dobila veća preciznost i ponovljivost mjerenja vremena zadržavanja, bilo je potrebno prilagoditi eksperimentalne kromatografske uvjete.

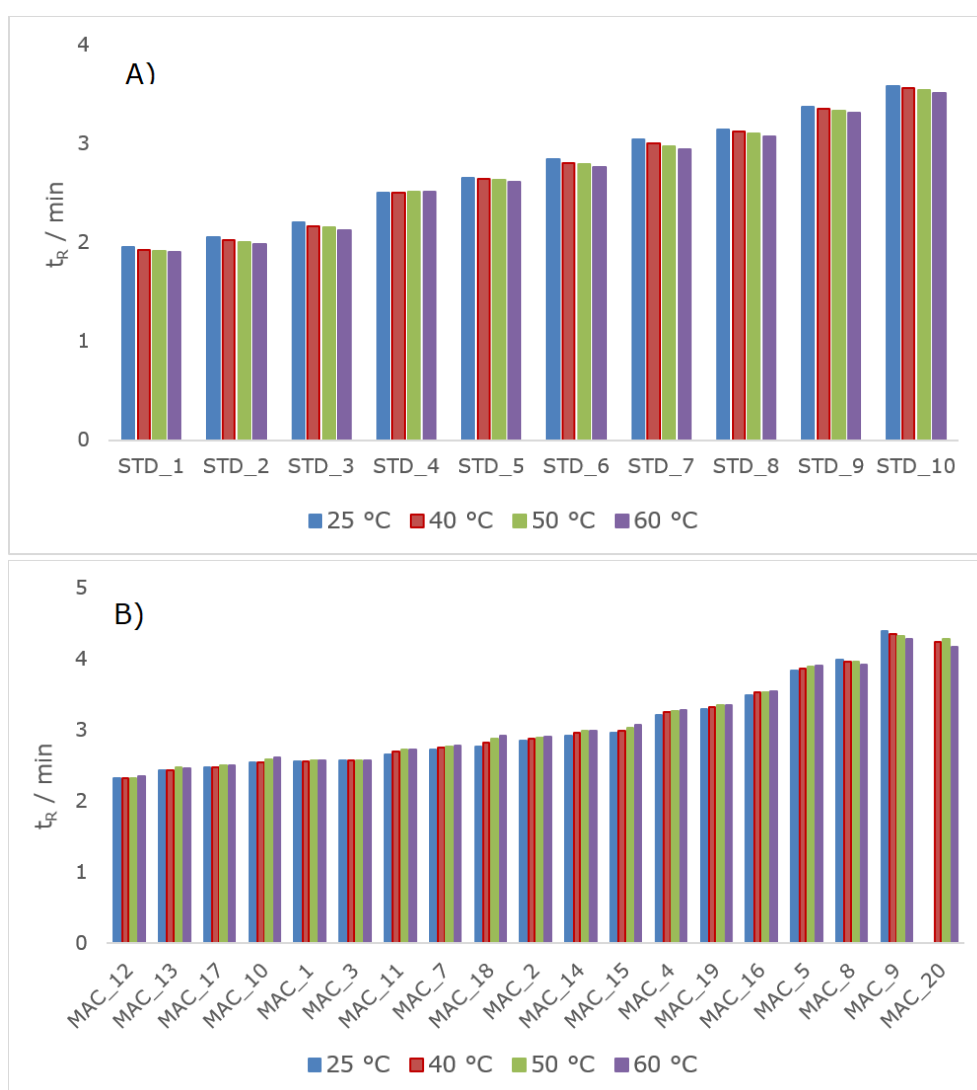
5.3. Istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na određivanje lipofilnosti malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva

Cilj drugog dijela ovog rada je bio istražiti kako promjene u eksperimentalnim kromatografskim uvjetima utječu na vremena zadržavanja kalibracijskih standarda kao predstavnika malih molekula te na početnu skupinu makrocikličkih spojeva. Obuhvaćene su obje skupine spojeva jer je upotrebom CHI metode primijećena asimetrija kromatografskih pikova makrocikličkih spojeva, dok za kalibracijske standarde isto nije uočeno. Istraženi su kromatografski parametri za koje se pretpostavljalo kako bi najviše mogli utjecati na vremena zadržavanja spojeva. Tako je istražen utjecaj temperature kromatografske kolone, brzine primijenjenog gradijenta, brzine protoka pokretne faze, vrste nepokretne faze odnosno kromatografske kolone, koncentracije i vrste upotrijebljene puferske otopine korištene za pripravu vodenog dijela pokretne faze te vrste organskog otapala u pokretnoj fazi. Utjecaj svakog eksperimentalnog parametra istražen je na način da su se vremena zadržavanja istraživanih spojeva izmjerena pri promijenjenim eksperimentalnim uvjetima uspoređivala s vremenima zadržavanja dobivenim upotrebom CHI metode, pri čemu se uvijek mijenjao samo jedan parametar. Vremena zadržavanja dobivena CHI metodom koja su korištena za usporedbu su se iznova određivale neposredno prije istraživanja svake promjene pojedinog parametra. Razlog tome je što je iskustvo pokazalo da starenjem kromatografske kolone dolazi do pomaka vremena zadržavanja prema većim vrijednostima, odnosno interakcija nepokretne faze i analita je značajnije izražena. Prilikom očitavanja vremena zadržavanja iz TIC kromatograma provedena je korekcija. Naime, s obzirom da korišteni RP-HPLC-DAD-MS sustav ima detektore spojene u seriju, dolazi do razlike u detektiranim vremenima zadržavanja ovisno o detektoru na kojem se očitavaju vrijednosti. Iz toga razloga su vremena zadržavanja dobivena očitavanjem s MS detektora korigirana da budu usporediva s vremenima zadržavanja očitanim na DAD-u. Spojevi kojima vremena zadržavanja iz bilo kojeg objektivnog razloga nije bilo moguće očitati iz kromatograma (oblik kromatografskog pika koji onemogućava

jednoznačno očitavanje vremena zadržavanja ili pojava više pikova iste očekivane m/z vrijednosti) su izostavljeni iz usporedbe s CHI vrijednostima.

5.3.1. Utjecaj temperature kromatografske kolone na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

Kako bi se istražio utjecaj temperature pri kojoj se provode kromatografska mjerenja na vremena zadržavanja istraživanih spojeva, osim uobičajeno primjenjivane temperature od 25 °C, provedene su analize i pri temperaturama kromatografske kolone od 40 °C, 50 °C i 60 °C. Vremena zadržavanja dobivena pri ovim mjerenjima prikazana su u dodatku 8.8.1, dok su na Slika 5.4 prikazane promjene vremena zadržavanja pri temperaturi od 25 °C i ostalih istraženih temperatura kromatografske kolone za male molekule i makrocikličke spojeve. Zanimljivo je primijetiti kako u slučaju malih molekula povećanjem temperature dolazi do neznatnih pomaka u vremenima zadržavanja prema nižim vrijednostima.



Slika 5.4 Usporedba vremena zadržavanja A) malih molekula i B) makrocikličkih spojeva s pri temperaturama kromatografske kolone od 40 °C (crveni stupci), 50 °C (zeleni stupci) i 60 °C (ljubičasti stupci) s vrijednostima pri temperaturi od 25 °C (plavi stupci).

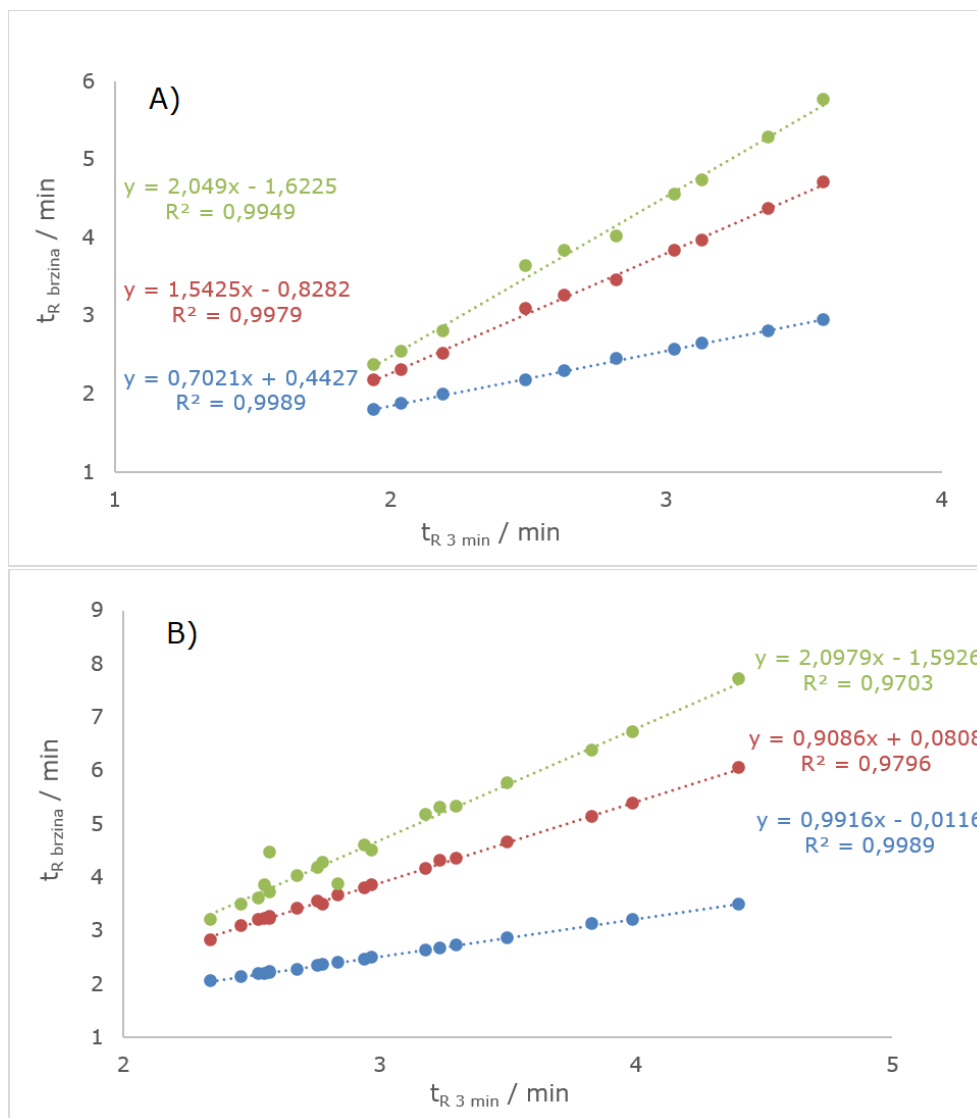
S druge strane, makrociklički spojevi pokazuju manje ujednačen trend. Za spojeve MAC_8 – takrolimus i MAC_9 – pimekrolimus povećanjem temperature primijećeno je smanjenje vremena zadržavanja, dok je više makrocikličkih spojeva pokazalo upravo suprotno ponašanje. Za većinu spojeva povećanje temperature pri kojoj se provode analize dovodi do pojačavanja interakcije s nepokretnom fazom, a posljedično do povećanja vremena zadržavanja spojeva. Najizraženiji predstavnici ovog trenda su MAC_15 – roksitromicin i MAC_18 – spiramicin. Ipak, ti pomaci su neznatni te se može zaključiti da temperatura kromatografske kolone nema značajan utjecaj na vremena zadržavanja istraživanih spojeva kako iz skupine malih molekula tako i iz skupine makrocikličkih spojeva.

Iako je pokazano da temperatura kromatografske kolone ne utječe značajno na vremena zadržavanja malih molekula i makrocikličkih spojeva, poznato je da se povećanjem temperature može očekivati povećanje učinkovitosti kromatografske kolone, osobito kad je riječ o analitima veće konformacijske slobode (169). Razlog tome je što povećanjem temperature dolazi do manje restrikcija u kretanju velikih molekula niz kromatografsku kolonu (170). Ovo opažanje primijećeno je i u slučaju makrocikličkih spojeva, osobito u slučaju spojeva MAC_8 – takrolimusa, MAC_9 – pimekrolimusa i MAC_20 – ciklosporina koji su i pokazali široke kromatografske pikove pri određivanju lipofilnosti upotrebom CHI metode. Povećanjem temperature kromatografske kolone došlo je do povećanja u učinkovitosti analize i u slučaju ostalih makrocikličkih spojeva. Pritom su dobiveni uži kromatografski pikovi bolje simetrije što omogućava preciznije određivanje vremena zadržavanja za spojeve za koje je učinkovitost kromatografske kolone nešto lošija pri nižim temperaturama. Dakle, primjena povišene temperature za kromatografsko određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva ne utječe značajno na njihova vremena zadržavanja te njihov relativni odnos ostaje isti, ali pospješuje dobivanje užih kromatografskih pikova bolje simetrije što omogućava jednoznačno određivanje vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva. Može se zaključiti da je primjena temperature kromatografske kolone od 25 °C koja se koristi pri upotrebi CHI metode učinkovita u slučaju analiza malih molekula, ali za kromatografsko određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva bolji rezultati se dobiju upotrebom više temperature.

5.3.2. Utjecaj brzine gradijenta na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

Brzina gradijentnog programa je sljedeći parametar čiji je utjecaj na vremena zadržavanja istražen. Vremena zadržavanja istraživanih spojeva dobivena trominutnim gradijentom koji

se koristi upotrebom CHI metode uspoređena su s onima dobivenima primjenom linearnog gradijenta od 2 minute, 5 minuta te 7 minuta. Rezultati ovih mjerenja prikazana su u dodatku 8.8.2, dok Slika 5.5 prikazuje korelaciju vremena zadržavanja malih molekula i makrocikličkih spojeva pri gradijentu od 3 minute i ostalih istraženih linearnih gradijenata.

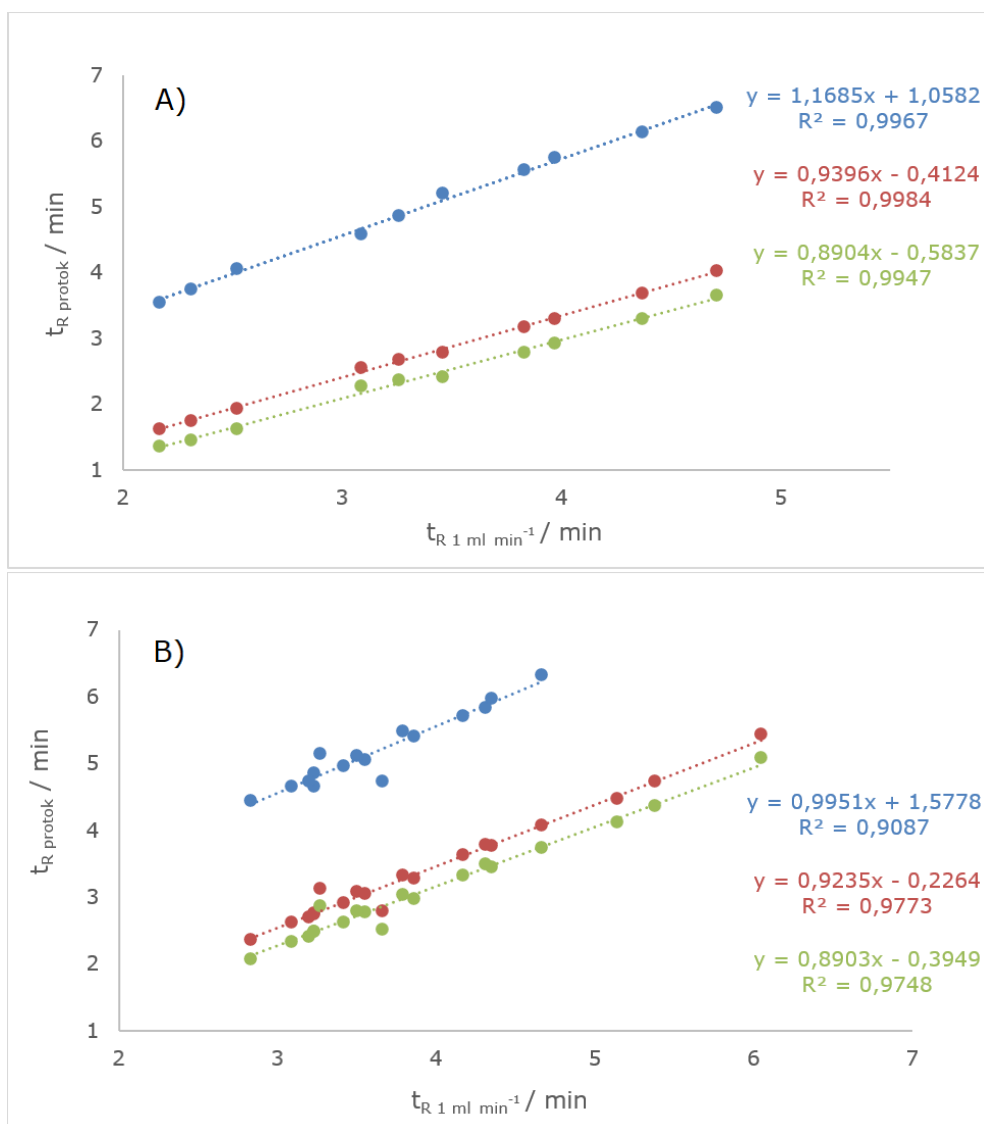


Slika 5.5 Usporedba vremena zadržavanja A) malih molekula i B) makrocikličkih spojeva primjenom dvominutnog (plavo), petominutnog (crveno) i sedmominutnog (zeleno) gradijenta s vrijednostima pri trominutnim gradijentom.

Povećanjem vremena trajanja gradijentnog programa od najkraćeg dvominutnog pa sve do najdužeg sedmominutnog dolazi do povećanja apsolutnih vrijednosti vremena zadržavanja svih istraživanih spojeva. Međutim, iako povećanjem vremena trajanja gradijenta dolazi do blagog smanjenja koeficijenta determinacije i za male molekule i za makrocikličke spojeve, važno je naglasiti da njihovi relativni odnosi ostaju nepromijenjeni, što dovodi do zaključka da dužina gradijenta ne utječe na kromatografsko određivanje lipofilnosti te da se proizvoljno može odabrati dužina trajanja gradijentnog programa.

5.3.3. Utjecaj protoka pokretne faze na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

Kako bi se istražio utjecaj protoka pokretne faze na vremena zadržavanja, spojevi su testirani primjenom tri različita protoka pokretne faze od $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ i 2 ml min^{-1} . Dobivena vremena zadržavanja pri ovim mjerenjima prikazana su u dodatku 8.8.3. Na Slika 5.6 prikazana je korelacija vremena zadržavanja malih molekula i makrocikličkih spojeva pri protoku od 1 ml min^{-1} i ostalih istraženih protoka pokretne faze.



Slika 5.6 Usporedba vremena zadržavanja A) malih molekula i B) makrocikličkih spojeva pri protocima pokretne faze od $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ (plavo), $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ (crveno) te 2 ml min^{-1} (zeleno) s vrijednostima pri protoku od 1 ml min^{-1} .

Iz vrijednosti vremena zadržavanja spojeva može se primijetiti da povećanjem protoka pokretne faze dolazi do povećanja njihovih apsolutnih vrijednosti. Dobra korelacija vremena zadržavanja malih molekula i makrocikličkih spojeva pri sva tri istražena protoka

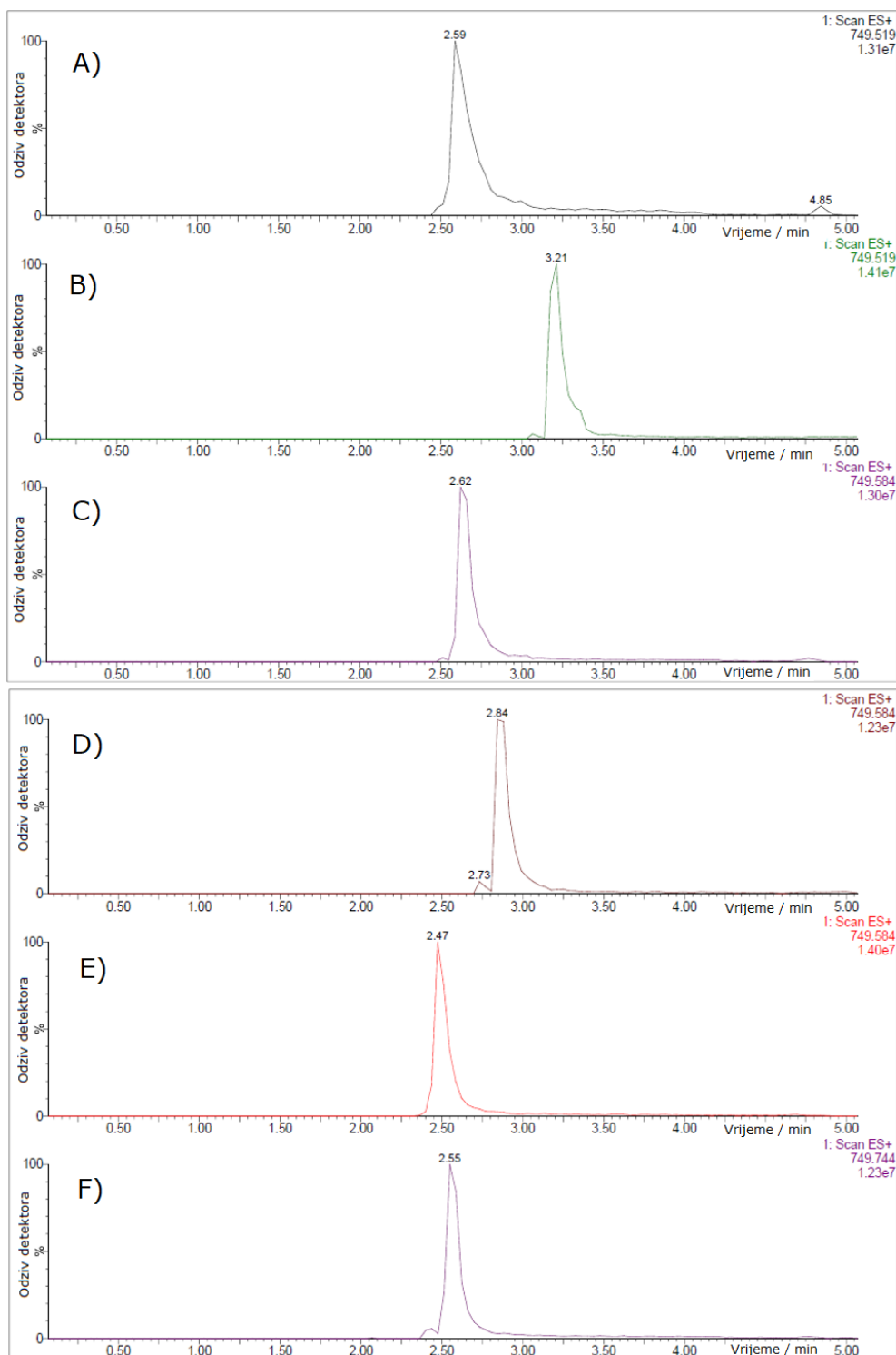
pokretne faze s vremenima zadržavanja pri protoku od 1 ml min⁻¹ pokazuje da se te vrijednosti kreću zajedničkim trendom, što znači da su njihovi relativni odnosi neovisni o protoku. Iz navedenog se može zaključiti da protok pokretne faze nema utjecaja na relativne odnosne vremena zadržavanja te da samim time odabir protoka pokretne faze ne utječe na kromatografsko lipofilno profiliranje kako malih molekula, tako ni makrocikličkih spojeva.

5.3.4. Utjecaj vrste kromatografske kolone na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

Upotrebom CHI metode za kromatografsko određivanje lipofilnosti koristi se Luna C18 kromatografska kolona. Ovdje je riječ o nepolarnoj nepokretnoj fazi u kojoj su oktadecil (C18) skupine kovalentno vezane na porozne sferične čestice silikagela. Ova kromatografska kolona se ubraja u L1 skupinu po klasifikaciji Farmakopeje Sjedinjenih Država (eng. *United States Pharmacopeia*, USP). Prednosti Lune C18 kao kromatografske kolone su u njezinoj visokoj izdržljivosti, robusnosti i mogućnosti dobre rezolucije (171). Međutim, u poglavlju 5.2 pokazano je da upotreba Luna C18 kromatografske kolone za analize makrocikličkih spojeva nije najbolji izbor. Zato je istražena mogućnost upotrebe prikladnije kromatografske kolone za ovu klasu spojeva. Kako se kromatografsko određivanje lipofilnosti temelji na raspodjeli istraživanog spoja između nepolarne nepokretne faze i polarne pokretne faze, odabrane su kromatografske kolone koje pripadaju istoj USP klasifikaciji kao i Luna C18. Dakle, zadržana je primjena nepolarne nepokretne faze koja sadrži C18 alkilne skupine, ali se istražila mogućnost zamjene Luna C18 kromatografske kolone drugom kolonom novije generacije koja bi pružila bolju učinkovitost pri analizama makrocikličkih spojeva. U tu svrhu istražene su Luna HST, XTerra RP18, Atlantis dC18, XBridge BEH i XSelect CSH kromatografske kolone. Detaljne specifikacije za svaku navedenu kromatografsku kolonu nalaze se u poglavlju 4.3.3 eksperimentalnog dijela.

Istraživanje utjecaja kromatografske kolone na oblik i simetriju kromatografskih pikova

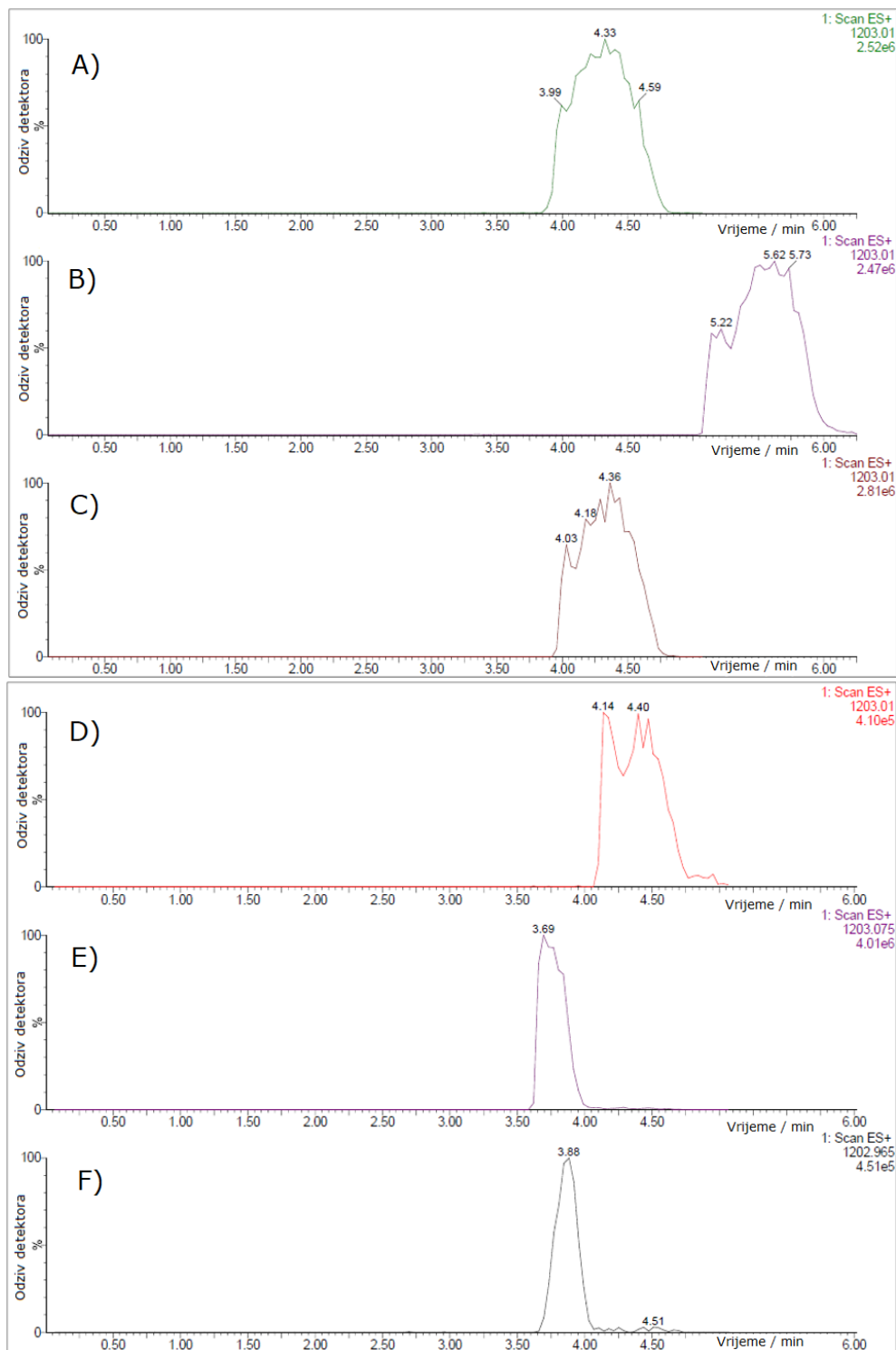
Za testiranje primjenjivosti alternativne kromatografske kolone za analizu makrocikličkih spojeva odabrana su dva spoja za koje je upotrebom CHI metode za određivanje lipofilnosti primijećena najznačajnija asimetričnost kromatografskog pika, MAC_10 – azitromicin (Slika 5.7) te najširi kromatografski pik za koji je otežano jednoznačno određivanje vremena zadržavanja, MAC_20 – ciklosporin (Slika 5.8).



Slika 5.7 Prikaz kromatografskih pikova MAC_10 – azitromicina primjenom A) Luna C18, B) Luna HST, C) XTerra RP18, D) Atlantis dC18, E) XBridge BEH i F) XSelect CSH kromatografskih kolona.

Slika 5.7 prikazuje kromatografske pikove makrocikličkog spoja MAC_10 – azitromicina analiziranog na Luna C18 kromatografskoj koloni te na pet alternativnih kolona. S obzirom na dobiveni uži kromatografski pik bolje simetrije, može se zaključiti da je svaka od istraženih kromatografskih kolona bolji izbor od Lune C18 za analizu azitromicina. Međutim,

teško je uočiti značajnu razliku između njih. Zato je važno pogledati Slika 5.8 koja prikazuje rezultate istih analiza za MAC_20 – ciklosporin.



Slika 5.8 Prikaz kromatografskih pikova MAC_20 – ciklosporina primjenom A) Luna C18, B) Luna HST, C) XTerra RP18, D) Atlantis dC18, E) XBridge BEH i F) XSelect CSH kromatografskih kolona.

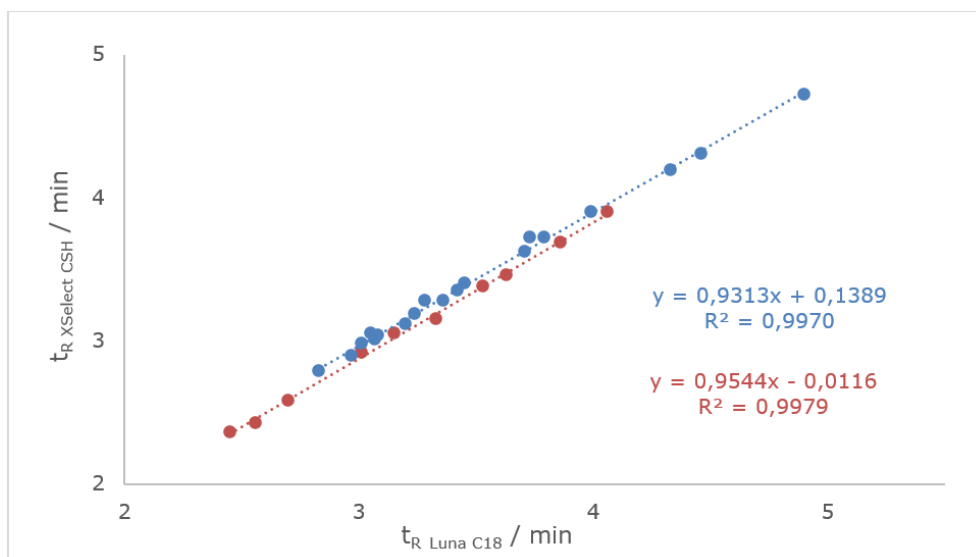
Iz kromatografskih pikova ciklosporina na Slika 5.8 dobivenih na alternativnim kolonama vidljivo je da Luna HST, XBridge BEH i Atlantis dC18 nisu pokazale nikakve prednosti u

usporedbi s Lunom C18 kolonom, dok u slučaju upotrebe kromatografskih kolona s većim porama, XTerra RP18 s veličinom pora od 125 Å te XSelect CSH s veličinom pora od 130 Å, dolazi do značajnog smanjenja širine kromatografskog pika. Razlog ove promjene vjerojatno je to što upotrebom kolone s većim porama dolazi do učinkovitije raspodjele većih molekula između pokretne i nepokretne faze. Nadalje, nepokretna faza XSelect CSH kromatografske kolone je hibridna čestica koja se temelji na novoj tehnologiji hibridne nabijene površine (eng. *charged surface hybrid*, CSH) koja na svojoj površini, osim C18 alkilnih lanaca, ima vezane i aminske skupine (168,172). Glavna prednost ove tehnologije je što CSH čestica pri niskim pH vrijednostima pokretne faze posjeduje pozitivno nabijene aminske skupine. Zbog toga su sekundarne interakcije između pozitivno nabijenih analita i nepokretne faze manje izražene zbog elektrostatskog odbijanja, što dovodi do smanjenja širine kromatografskih pikova bazičnih analita. Međutim, pri višim pH vrijednostima pokretne faze pa tako i pri pH vrijednosti od 7,40 koja se primjenjuje u svim mjerenjima u ovom radu, ovaj mehanizam gubi na važnosti jer aminske skupine na površini čestice kolone prelaze u neutralni oblik te više nemaju mogućnost elektrostatskog odbijanja pozitivno nabijenih analita. Ipak, na primjerima MAC_10 – azitromicina i MAC_20 – ciklosporina čiji su kromatografski pikovi na XSelect CSH koloni značajno uži u usporedbi s pikovima na Lunom C18 koloni, može se zaključiti kako su slobodne silanolne skupine na XSelect CSH koloni u usporedbi s Luna C18 kolonom manje dostupne za interakciju s analitom zbog bolje tehnologije zaštićivanja silanola tijekom procesa proizvodnje kolone.

Iz ovih opažanja može se zaključiti da su primjenom XSelect CSH kromatografske kolone dobiveni uži kromatografski pikovi s boljom simetrijom za dva makrociklička spoja koja su imala široke i asimetrične kromatografske pikove upotrebom Luna C18 kromatografske kolone. Primjena XSelect CSH kolone za analizu makrocikličkih spojeva time omogućava lakše jednoznačno određivanje vremena zadržavanja makrocikličkih, odnosno ova kolona je efikasnija za analizu makrocikličkih spojeva u usporedbi s Luna C18 kolonom.

Istraživanje utjecaja kromatografske kolone na relativne odnose vremena zadržavanja

Uz poboljšanje učinkovitosti kromatografskih analiza primjenom XSelect CSH kromatografske kolone, bilo je potrebno provjeriti dolazi li do promjena u relativnim odnosima vremena zadržavanja istraživanih spojeva uslijed promjene kolone. Stoga su uspoređena vremena zadržavanja upotrebom Luna C18 i XSelect CSH kromatografskih kolona (Dodatak 8.8.4 i Slika 5.9), dok su drugi eksperimentalni uvjeti održani jednaki onima koji se koriste upotrebom CHI metode.



Slika 5.9 Usporedba vremena zadržavanja malih molekula (crveno) i makrocikličkih spojeva (plavo) dobivenih upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone s vremenima zadržavanja dobivenim upotrebom Luna C18 kromatografske kolone.

Iz visokih koeficijenata determinacije dobivenih ovom korelacijom kako za male molekule tako i za makrocikličke spojeve, može se zaključiti da ne dolazi do značajnijih promjena u relativnim odnosima vremena zadržavanja istraživanih spojeva kad se kao nepokretna faza koristi XSelect CSH umjesto Luna C18 kromatografske kolone. Kako je riječ o kromatografskim kolonama iste skupine prema USP klasifikaciji, ovakav rezultat se mogao očekivati s obzirom na to da dolazi do istog tipa interakcija analita s nepokretnom fazom. Međutim, detaljnijim proučavanjem vremena zadržavanja na Luna C18 i XSelect CSH kromatografskim kolonama (Dodatak 8.8.4) može se primijetiti da su vremena zadržavanja spojeva na XSelect CSH kromatografskoj koloni sustavno nešto nižih vrijednosti nego na Luna C18 koloni. Ovo se opažanje može objasniti nižim udjelom ugljika vezanog na silika čestice kod Luna C18 kromatografske kolone gdje on iznosi 17,5 % (171), dok je u slučaju XSelect CSH kromatografske kolone taj udio 15 % (173). Niži udio ugljika ukazuje na nešto nižu hidrofobnost XSelect CSH kromatografske kolone usporedbi s Luna C18 kolonom što dovodi do kraćeg zadržavanja analita. Međutim, kako su vremena zadržavanja u sličnim relativnim odnosima, može se smatrati da je XSelect CSH prikladna zamjena za Lunu C18.

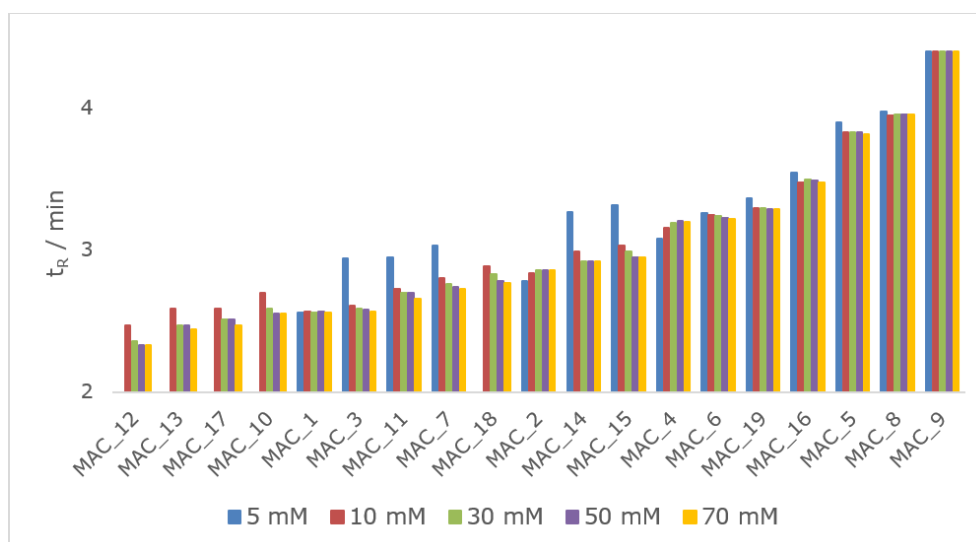
5.3.5. Utjecaj koncentracije puferske otopine amonijevog acetata na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

Poznato je da makrociklički spojevi najčešće nemaju kromofore koje bi apsorbirale zračenje u UV/VIS dijelu elektromagnetskog spektra, što onemogućava detekciju DAD-om. Iz tog razloga je neophodno korištenje MS detektora kao načina detekcije. Maksimalna

preporučena koncentracija pufera za kromatografske analize uz primjenu MS detektora iznosi 10 mM. Upotreba viših koncentracija može dovesti do taloženja puferske soli u ionizacijskom izvoru što povećava opasnost od začepjenja detektora. Također, dugoročno korištenje visokih koncentracija pufera može dovesti i do smanjenja osjetljivosti MS detektora, što iziskuje češće provjere i čišćenje sustava. Vodeni dio pokretne faze koji se koristi upotrebom CHI metode je amonijev acetat koncentracije 50 mM, što značajno premašuje preporučenu koncentraciju pufera kad se kao način detekcije koristi MS detektor. Zbog toga je istražena mogućnost upotrebe puferske otopine pri nižim koncentracijama. Istraživanje je provedeno upotrebom Luna C18 i XSelect CSH kromatografskih kolona kako bi se uočile eventualne razlike.

5.3.5.1. Utjecaj koncentracije puferske otopine amonijevog acetata upotrebom Luna C18 kromatografske kolone

Usporedbom vremena zadržavanja malih molekula dobivenih upotrebom amonijevog acetata u koncentracijama od 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM te 70 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze (Dodatak 8.8.5) može se zaključiti kako koncentracija pufera nema utjecaja na vrijeme zadržavanja malih molekula te da su dobivene vrijednosti pri svim istraženim koncentracijama usporedive. S druge strane, u slučaju makrocikličkih spojeva ipak su primijećeni značajniji pomaci u vremenima zadržavanja.



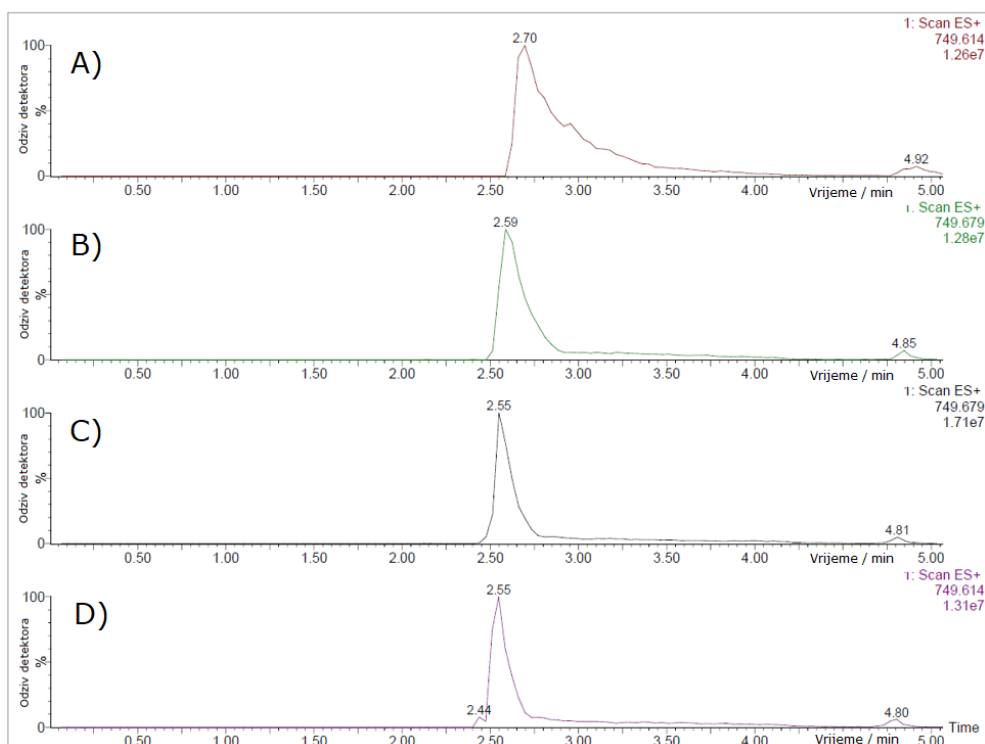
Slika 5.10 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 5 mM (plavi stupci), 10 mM (crveni stupci), 30 mM (zeleni stupci), 50 mM (ljubičasti stupci) i 70 mM (žuti stupci) kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na Luna C18 kromatografskoj koloni.

Proučavanjem Slika 5.10, može se primijetiti nekoliko zanimljivih opažanja. Najprije, može se reći da smanjenjem koncentracije amonijevog acetata dolazi do povećanja vrijednosti

vremena zadržavanja za većinu makrocikličkih spojeva. Ovaj trend je posebno naglašen kod makrocikličkih spojeva s najkraćim vremenima zadržavanja. Tako se za spojeve MAC_12 – dekladinozil azitromicin, MAC_17 – N'-demetil azitromicin i MAC_10 – azitromicin pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM vrijeme zadržavanja nije moglo očitati jer se ti spojevi nisu uopće isprali s kromatografske kolone tijekom analize, već su njihovi kromatografski pikovi primijećeni tek u sljedećoj analizi. Nadalje, u slučaju MAC_13 – azahomoeritromicina i MAC_18 – spiramicina, uz pomicanje vremena zadržavanja prema višim vrijednostima, došlo je i do značajnog širenja kromatografskog pika pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM. Stoga je bilo nemoguće jednoznačno očitati njihove maksimume. Iako su i kod lipofilnijih makrocikličkih spojeva s nešto višim vrijednostima vremena zadržavanja smanjenjem koncentracije amonijevog acetata primijećeni pomaci u vremenima zadržavanja prema višim vrijednostima te promjene nisu bile toliko značajne kao u slučaju hidrofilnijih spojeva. Ovo opažanje je u skladu s poznatom činjenicom da se pri kromatografskim analizama preporučuje održavati dovoljnu ionsku jakost puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze, najčešće iznad 10 mM, kako bi se smanjili neželjeni efekti solvatacije analita koji dovode do asimetričnosti kromatografskih pikova (174). Također, zanimljivo je primijetiti kako dva spoja pokazuju obrnut trend, a to su ansamicini MAC_2 – rifampicin i MAC_4 – rifapentin, kod kojih je smanjenje koncentracije amonijevog acetata dovelo je do nešto nižih vrijednosti vremena zadržavanja. Osim ova dva spoja, i MAC_5 – rifabutin pripada klasi ansamicina, ali pomaci u njegovom vremenu zadržavanja prate trend ostalih makrocikličkih spojeva te se njegova vremena zadržavanja smanjenjem koncentracije amonijevog acetata blago pomiču prema višim vrijednostima.

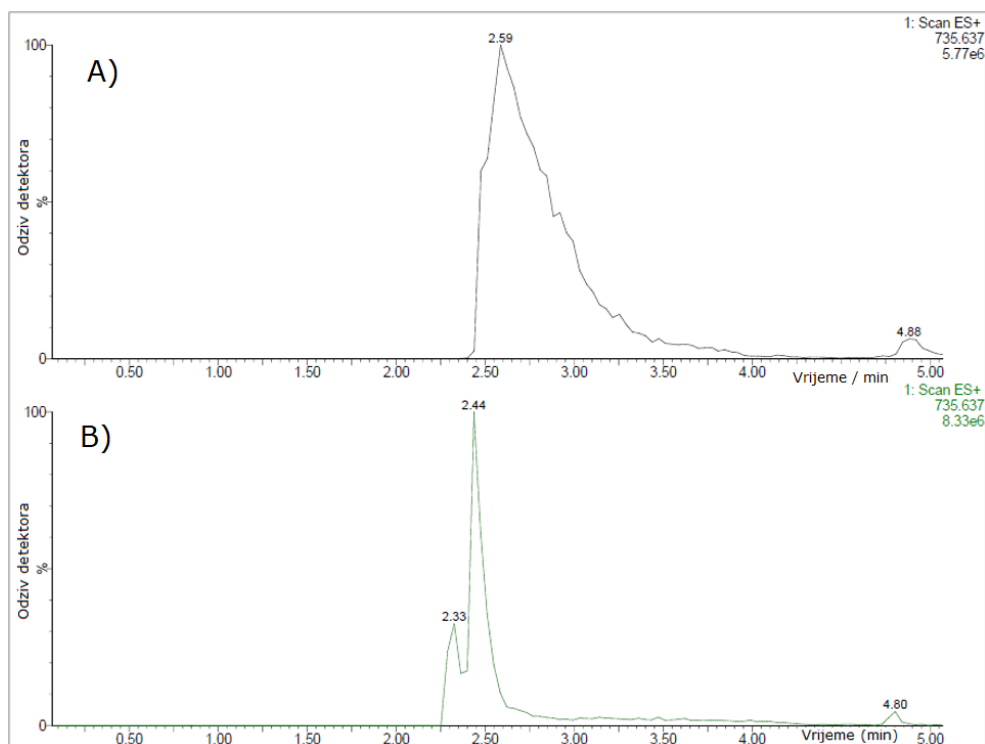
Ako bi se proučilo koja promjena u koncentraciji amonijevog acetata uzrokuje najveće promjene u vremenima zadržavanja, može se primijetiti da do najvećih pomaka dolazi pri prelasku s amonijevog acetata koncentracije 5 mM na 10 mM. Nešto manji skok je prisutan prelaskom s koncentracije od 10 mM na koncentraciju od 30 mM, dok su vremena zadržavanja dobivena upotrebom amonijevog acetata u koncentracijama od 30 mM, 50 mM i 70 mM gotovo jednaka.

Kako je već opisano u poglavlju 5.2, CHI metoda za određivanje lipofilnosti pokazala se manje učinkovitom za analize makrocikličkih spojeva u usporedbi s malim molekulama zbog širine i asimetrije kromatografskih pikova što dovodi do otežanog jednoznačnog očitavanja vremena zadržavanja. Pri istraživanju utjecaja smanjenja koncentracije amonijevog acetata kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze zanimljivo je uočiti kako se širina kromatografskih pikova mijenja promjenom koncentracije. Već je spomenuto kako u slučaju MAC_10 – azitromicina smanjenjem koncentracije pufera dolazi do pomaka vremena zadržavanja prema većim vrijednostima, ali osim toga dolazi i do značajnije asimetričnosti kromatografskog pika, kako je prikazano na Slika 5.11.



Slika 5.11 Kromatografski pikovi MAC_10 – azitromicina dobiveni upotrebom amonijevog acetata koncentracije A) 10 mM, B) 30 mM, C) 50 mM i D) 70 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na Luna C18 kromatografskoj koloni.

I drugi spojevi iz klase makrolida pokazali su širenje kromatografskog pika s nižim koncentracijama amonijevog acetata. Tako se u slučaju MAC_13 – azahomoeritromicina pri koncentraciji amonijevog acetata od 70 mM jasno razlučuju dva kromatografska pika iste m/z vrijednosti. Međutim, u slučaju povećanja koncentracije pufera na 10 mM, osim pomaka vremena zadržavanja prema većoj vrijednosti, više ne dolazi do razdvajanja kromatografskih pikova (Slika 5.12).



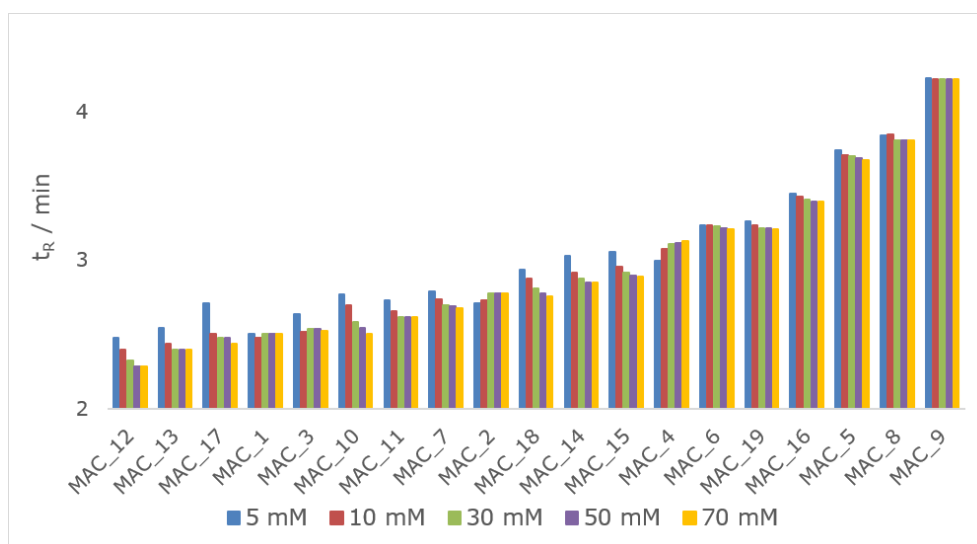
Slika 5.12 Kromatografski pikovi MAC_13 – azahomoeritromicina dobiveni upotrebom amonijevog acetata koncentracije A) 10 mM i B) 70 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na Luna C18 kromatografskoj koloni.

Osim već spomenutog efekta solvatacije, pomaci u vremenima zadržavanja spojeva prema višim vrijednostima te smanjenje učinkovitosti odnosno širenje i asimetričnost kromatografskih pikova do kojih dolazi smanjenjem koncentracije amonijevog acetata, mogu se objasniti još jednim mehanizmom. Pri nižim koncentracijama pufera dolazi do jačih sekundarnih interakcijama bazičnog analita sa silanolnim skupinama nepokretne faze, dok pri višim koncentracijama amonijevog acetata dolazi do slabljenja istih zbog kompeticije analita s amonijevim kationom iz pokretne faze za adsorpciju na nepokretnu fazu (175). Tako možemo reći da viša koncentracija amonijevog kationa uspješnije maskira silanolne skupine koje onda više nisu slobodne za interakciju s analitom.

Zaključno se može reći da smanjenje koncentracije amonijevog acetata utječe na vremena zadržavanja spojeva, ali i na pouzdano određivanje maksimuma kromatografskog pika. Također, utječe i na širinu kromatografskog pika, što može otežati ili čak onemogućiti jednoznačno određivanje vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva. Ovi negativni efekti su dominantni pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM pa ova koncentracija nije pogodna za upotrebu za analize spojeva iz klase makrocikala. Primijećeni su i pri koncentraciji od 10 mM, ali su manje izraženi. Primjenom otopina amonijevog acetata u koncentracijama od 30 mM, 50 mM i 70 mM kao vodenog dijela pokretne faze dobivaju se usporediva vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva.

5.3.5.2. Utjecaj koncentracije puferne otopine amonijevog acetata upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone

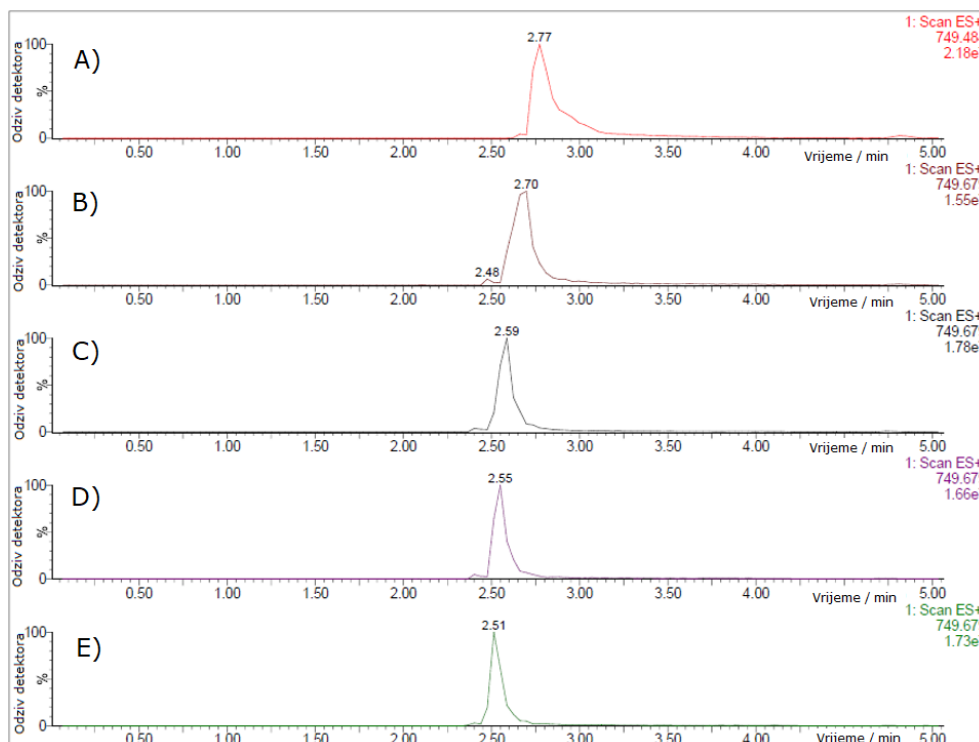
Isti eksperiment kao u prethodnom poglavlju proveden je na XSelect CSH kromatografskoj koloni kako bi se istražilo pokazuju li makrociklički spojevi slično ponašanje upotrebom ove kolone. Rezultati prikazani u dodatku 8.8.6 pokazuju da su vremena zadržavanja nešto kraća na XSelect CSH kromatografskoj koloni kad se usporede s vremenima zadržavanja na Luna C18 koloni, kako za male molekule tako i za makrocikličke spojeve pri svim istraženim uvjetima. Kao i pri upotrebi Luna C18 kromatografske kolone, nisu primijećene značajne promjene u vremenima zadržavanja malih molekula pri različitim koncentracijama amonijevog acetata. S druge strane, pri analizama makrocikličkih spojeva uočeni su pomaci u vremenima zadržavanja ovisno o koncentraciji amonijevog acetata (Slika 5.13), i trendovi su usporedivi s onima primijećenima na Luna C18 kromatografskoj koloni.



Slika 5.13 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 5 mM (plavi stupci), 10 mM (crveni stupci), 30 mM (zeleni stupci), 50 mM (ljubičasti stupci) i 70 mM (žuti stupci) kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni.

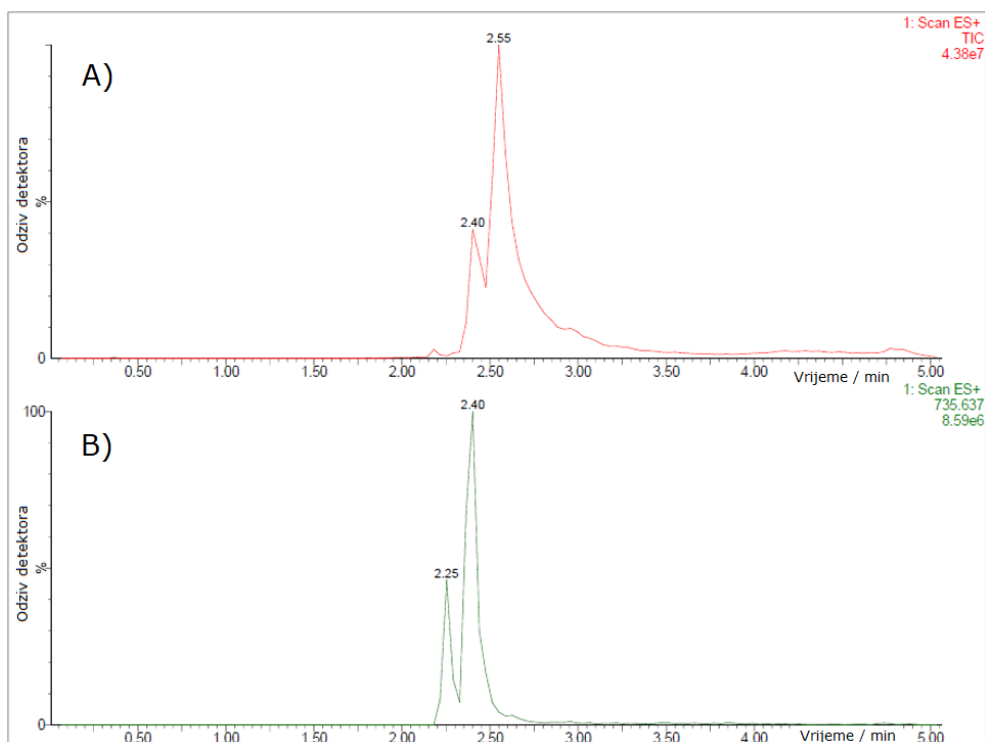
Kao i pri istovjetnim analizama na Luna C18 koloni, i u ovim analizama su najveći pomaci primijećeni u slučaju makrolidnih spojeva niže lipofilnosti, odnosno kraćih vremena zadržavanja. Međutim, važno je napomenuti da za razliku od Luna C18 kolone, XSelect CSH kolona omogućava primjenu nižih koncentracija amonijevog acetata, čak do koncentracije 5 mM, što je vidljivo na Slika 5.14 koja prikazuje kromatograme za MAC_10 – azitromicin dobivene primjenom ispitivanih koncentracija otopine amonijevog acetata. Na Luna C18 koloni pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM azitromicin se nije isprao s kolone zbog jakih interakcija s nepokretnom fazom. U slučaju analize na XSelect CSH koloni vrijeme zadržavanja pri istim uvjetima moguće je jednoznačno odrediti. Također, u

usporedbi s analizama na Luna C18 koloni, kromatografski pikovi na XSelect CSH koloni su uži i bolje simetrije pri svim primijenjenim koncentracijama amonijevog acetata.



Slika 5.14 Kromatografski pikovi MAC_10 – azitromicina dobiveni upotrebom amonijevog acetata koncentracije A) 5 mM, B) 10 mM, C) 30 mM, D) 50 mM i E) 70 mM amonijevog acetata kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni.

Kod spoja MAC_13 – azahomoeritromicina kod kojeg je smanjenje koncentracije amonijevog acetata upotrebom Luna C18 kolone uzrokovalo nemogućnost razdvajanja dva kromatografska pika iste m/z vrijednosti (Slika 5.12), pri upotrebi XSelect CSH kromatografske kolone (Slika 5.15) pikovi su čak i pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM djelomično razdvojeni.



Slika 5.15 Kromatografski pikovi MAC_13 – azahomoeritromicin dobiveni upotrebom A) 5 mM i B) 70 mM amonijevog acetata kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect kromatografskoj koloni.

Ova opažanja dokazuju da XSelect CSH kolona zaista pruža uže kromatografske pikove bazičnih spojeva, čak i pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM te se i pri toj koncentraciji mogu provoditi analize makrocikličkih spojeva upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone. Ovo opažanje dokazuje da je mehanizam maskiranja slobodnih silanolnih skupina na površini nepokretne faze uspješan i pri niskim koncentracijama amonijevog acetata u slučaju XSelect CSH kolone, odnosno da je udio silanolnih skupina kod ove kolone značajno niži u usporedbi s Luna C18 kolonom. To je u skladu i s primijećenim užim kromatografskim pikovima bolje simetrije za makrocikličke spojeve kad se analize provode na XSelect koloni.

5.3.6. Utjecaj vrste puferske otopine na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

Amonijev acetat se često koristi za analize pri neutralnim pH vrijednostima, osobito kad se u sprezi s RP-HPLC sustavom koristi MS detektor. Glavni razlog tome je njegova dobra hlapljivost, a time i kompatibilnost s MS detektorom. Međutim, njegova upotreba kao pufera je upitna pri pH vrijednosti od 7,40 iz razloga što pK_a vrijednost acetata koji bi trebao odigrati pufersku ulogu iznosi 4,75 (176) iz čega proizlazi da amonijev acetat pri pH 7,40 uopće nema puferski kapacitet. Stoga je upotreba izraza acetatni pufer, kad govorimo o neutralnim pH vrijednostima, potpuno neopravdana (177). Ova činjenica nije

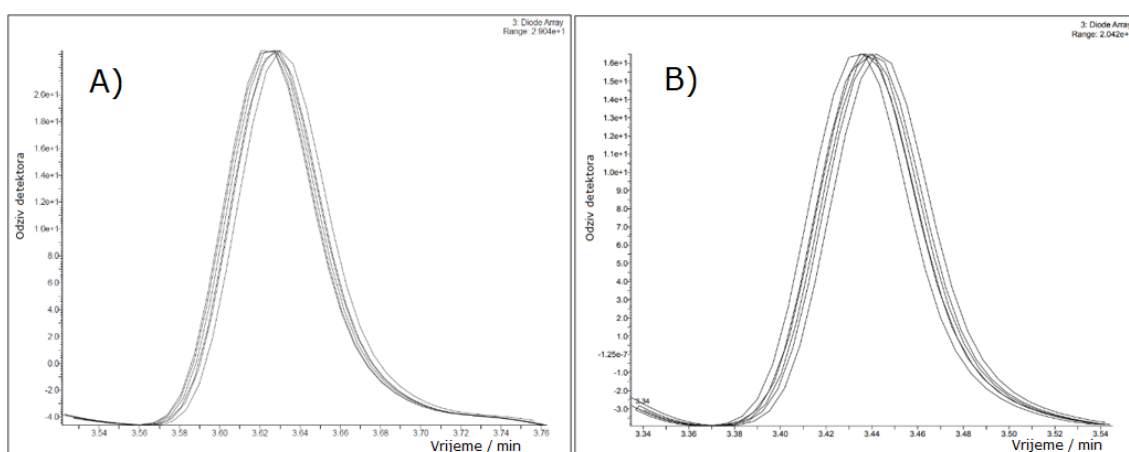
značajna za spojeve koji imaju konstantu ionizacije značajno različitu od pH vrijednosti pri kojoj se provode analize. Međutim, makrociklički spojevi su najčešće slabe baze koje imaju najmanje jednu ionizabilnu skupinu s pK_a vrijednosti blizu fiziološke pH vrijednosti. Pri fiziološkoj pH vrijednosti od 7,40 pri kojoj su provedene sve analize u ovom radu, većina istraživanih makrocikličkih spojeva imaju bar jednu ionizabilnu skupinu te se nalaze djelomično u ioniziranom, a djelomično u neutralnom obliku (Dodatak 8.6). Iz tog razloga važno je održavati konstantnu pH vrijednost tijekom analiza kako bi se dobila pouzdana i ponovljiva vremena zadržavanja. Također, nedovoljno učinkovita kontrola pH vrijednosti puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze može uzrokovati pojavu širih kromatografskih pikova (174) pa time i značajno utjecati na pouzdanost kromatografskog određivanja lipofilnosti.

Iz gore navedenih razloga istražila se mogućnost zamjene amonijevog acetata, koji se koristi upotrebom CHI metode, s drugim puferom. Pri odabiru prikladnog pufera, postavljeno je nekoliko uvjeta. Prvi uvjet je bio da pK_a vrijednost puferkog sustava bude unutar jedne pH jedinice od 7,40, koja je pH vrijednost pri kojoj su se provodile kromatografske analize. Najčešći pufer koji se upotrebljava u kromatografskim analizama, a zadovoljava takav zahtjev je fosfatni pufer, odnosno puferi sustav dihidrogenfosfat/hidrogenfosfat s pK_a vrijednosti od 7,20 (176). Međutim, fosfatni pufer ne zadovoljava uvjet hlapljivosti te ne daje mogućnost sprege RP-HPLC sustava s MS detektorom, što je neophodno za analize makrocikličkih spojeva. Niska hlapljivost fosfata dovodi do taloženja soli unutar ionizacijskog izvora i smanjenja osjetljivosti MS detektora. Također, fosfati često formiraju adukte s analitima te uzrokuju supresiju signala MS detektora (178). Nadalje, u obzir se uzeo i 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (engl. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*, TRIS) pufer s pK_a vrijednošću od 8,00 (176), ali je ipak izuzet iz daljnjeg razmatranja zbog visokog rizika kontaminacije MS detektora i supresije signala analita (179). Amonijev hidrogenkarbonat, odnosno puferi sustav ugljična kiselina/hidrogenkarbonat s pK_a vrijednosti od 6,35 (176) bio je jedini mogući izbor za ovu primjenu. Iako je riječ o puferkom sustavu koji je na gornjoj granici svog kapaciteta pri pH 7,40, zadovoljava ključan uvjet hlapljivosti. Stoga je istražena mogućnost zamjene amonijevog acetata koncentracije 50 mM s amonijevim hidrogenkarbonatom iste koncentracije te je proučavan utjecaj takve promjene na vremena zadržavanja malih molekula i makrocikličkih spojeva. Također, istražen je i utjecaj smanjenja koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata s 50 mM na 10 mM.

5.3.6.1. Provjera stabilnosti otopine amonijevog hidrogenkarbonata

Prije samog istraživanja utjecaja zamjene amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom kao vodenim dijelom pokretne faze, istražena je stabilnost otopine amonijevog hidrogenkarbonata. Naime, nije uobičajena praksa koristiti amonijev

hidrogenkarbonat kao pufer pri neutralnim pH vrijednostima i u literaturi je nađeno tek nekoliko ovakvih primjera (180,181). Razlog tome leži u mogućnosti raspada amonijevog hidrogenkarbonata na hlapljivu ugljičnu kiselinu i amonijak, što može dovesti do smanjenja koncentracije puferske otopine, kao i do porasta njezine pH vrijednosti (182). Ovakve promjene bi potencijalno mogle utjecati na vremena zadržavanja spojeva, što bi narušilo ponovljivost metode za kromatografsko određivanje lipofilnosti. Kako bi se provjerila ova pretpostavka, istražena je ponovljivost vremena zadržavanja za dva makrociklička spoja koji imaju pK_a vrijednost blizu pH 7,40 jer se pretpostavlja kako bi promjena u pH vrijednosti puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze najveći utjecaj imala upravo na takve spojeve. Stoga su za ovo istraživanje odabrani spojevi MAC_16 – josamicin i MAC_19 – midekamicin, oba s izračunatim pK_a vrijednostima bliskima fiziološkoj pH vrijednosti (Dodatak 8.6). Spojevi su analizirani upotrebom CHI metode za određivanje lipofilnosti uz zamjenu amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom kao vodenim dijelom pokretne faze. Slika 5.16 prikazuje kromatografske pikove odabranih spojeva mjerenih upotrebom otopine amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM pri pH 7,40 kao vodenog dijela pokretne faze u rasponu od 35 sati.

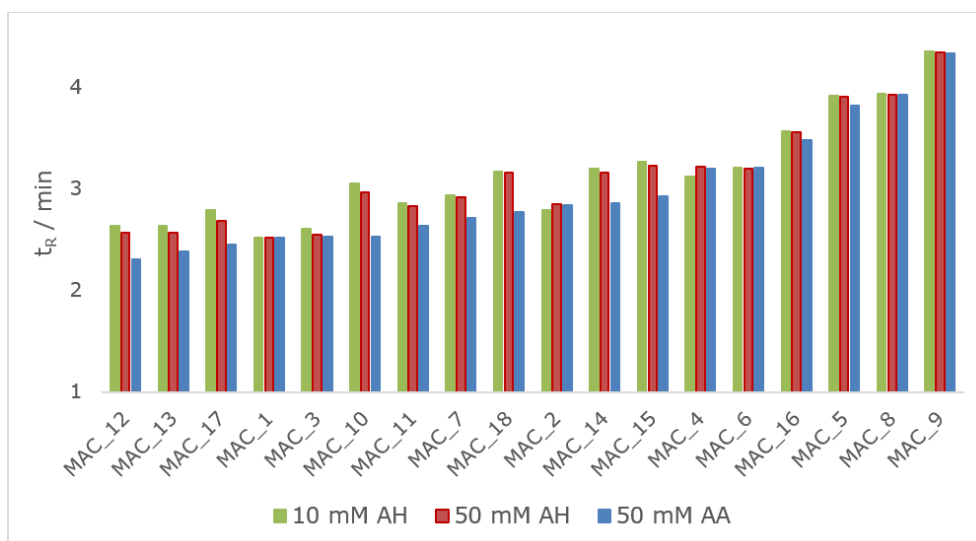


Slika 5.16 Vremena zadržavanja spojeva A) MAC_16 – josamicina i B) MAC_19 – midekamicina upotrebom amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze u rasponu od 35 sati.

Iz Slika 5.16 može se primijetiti kako protokom vremenskog razdoblja od 35 sati upotrebom amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM kao vodenog dijela pokretne faze ne dolazi do značajnih promjena vremena zadržavanja za dva istražena makrociklička spoja. Iz tog razloga pretpostavilo se da je zamjena amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom moguća u smislu ponovljivosti rezultata. Kako bi se osigurali maksimalno pouzdani i ponovljivi rezultati, otopina amonijevog hidrogenkarbonata za kromatografske analize svaki put je pripravljena neposredno prije korištenja.

5.3.6.2. Zamjena amonijevog acetata koncentracije 50 mM s amonijevim hidrogenkarbonatom koncentracije 50 mM odnosno 10 mM upotrebom Luna C18 kromatografske kolone

Kako bi se istražila mogućnost zamjene amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom kao vodenim dijelom pokretne faze, provedena su mjerenja pri kojima je umjesto amonijevog acetata koncentracije 50 mM upotrijebljen amonijev hidrogenkarbonat iste koncentracije kao vodeni dio pokretne faze. Također, istražen je utjecaj smanjenja koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata na 10 mM. U slučaju malih molekula nije primijećena razlika u vremenima zadržavanja ovisno o upotrijebljenoj vrsti puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze (Dodatak 8.8.7). Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva prikazana je u istom dodatku, kao i na Slika 5.17.



Slika 5.17 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM (plavi stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM (crveni stupci) odnosno 10 mM (zeleni stupci) kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze upotrebom Luna C18 kromatografske kolone (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat).

Iz prikazanih rezultata može se primijetiti da zamjena amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom koncentracije 50 mM ne utječe jednako na vremena zadržavanja svih spojeva iz klase makrocikala. Najveće promjene u vremenima zadržavanja uočene su u slučaju makrolidnih spojeva gdje je za spojeve s nižim vremenima zadržavanja došlo do pomaka prema višim vrijednostima. S druge strane, ciklički peptidi, ansamicini i makrolidni spojevi koji se duže zadržavaju na kromatografskoj koloni ne pokazuju značajne promjene u vremenima zadržavanja promjenom vrste puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze.

U poglavlju 5.3.5.1 pokazano je da smanjenje koncentracije puferne otopine amonijevog acetata korištene kao vodeni dio pokretne faze dovodi do povećanja vremena zadržavanja kod većine makrocikličkih spojeva. Zato je cilj bio istražiti može li se isto opažanje primijetiti i smanjenjem koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata s 50 mM na 10 mM. Na Slika 5.17 može se primijetiti kako smanjenjem koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata dolazi do pomaka vremena zadržavanja prema višim vrijednostima, ali su ti pomaci minimalni. Dakle, značajniji pomaci vremena zadržavanja su dobiveni promjenom vrste puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze iz amonijevog acetata u amonijev hidrogenkarbonat, nego smanjenjem njegove koncentracije.

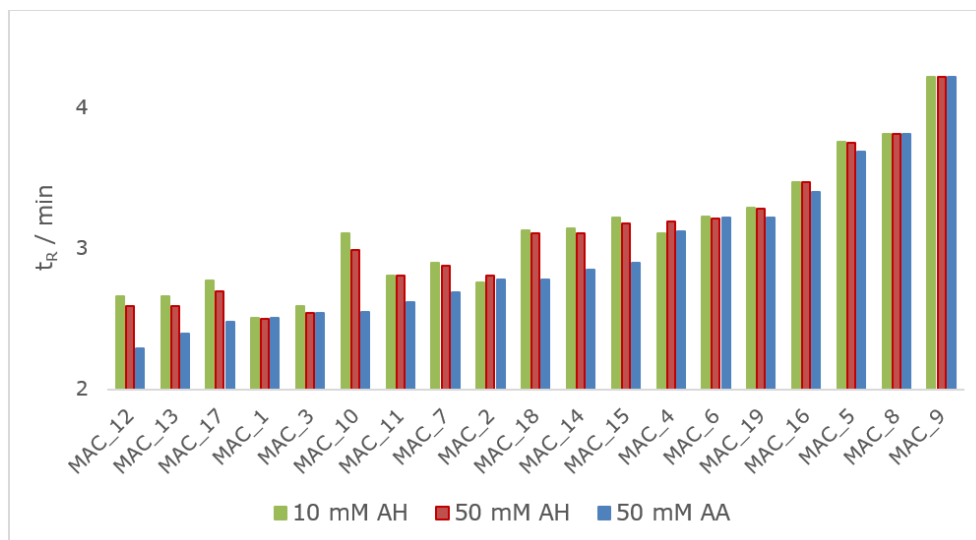
Nadalje, zanimljivo je primijetiti kako dva ansamicina, MAC_2 – rifampicin i MAC_4 – rifapentin, koja su pokazala trend promjene vremena zadržavanja ka nižim vrijednostima smanjenjem koncentracije amonijevog acetata (poglavljje 5.3.5.1), pokazuju isto ponašanje kad se koncentracija amonijevog hidrogenkarbonata smanji s 50 mM na 10 mM.

U poglavlju 5.3.5.1 je opisano kako su vremena zadržavanja spojeva niža te su kromatografski pikovi uži kad se kao vodeni dio pokretne faze koriste više koncentracije amonijevog acetata. Ova opažanja objašnjena su učinkovitijim maskiranjem silanolnih skupina višom koncentracijom amonijevog kationa iz pokretne faze, čime dolazi do smanjenjem broja slobodnih silanolnih grupa za interakciju s analitom (175). Međutim, iz rezultata prikazanih u ovom poglavlju može se uočiti da i vrsta aniona prisutnog u pokretnoj fazi ima važnu ulogu u interakciji analita i nepokretne faze. Zamjena amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom pri istoj koncentraciji od 50 mM je dovela do značajnih pomaka u vremenima zadržavanja makrocikličkih spojeva prema višim vrijednostima. To vodi do zaključka da acetatni i hidrogenkarbonatni ioni vjerojatno ostvaruju interakciju s analitom i time smanjuju njegovu mogućnost sekundarnih interakcija sa silanolnim skupinama. Pritom je mogućnost sprječavanja sekundarnih interakcija sa silanolnim grupama nešto veća u slučaju acetatnog iona, jer se njegovom upotrebom postižu niže vrijednosti vremena zadržavanja za većinu makrocikličkih spojeva. Nadalje, povećanje vrijednosti vremena zadržavanja primijećeno je smanjenjem koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata s 50 mM na 10 mM, što se može pripisati utjecaju smanjenja broja amonijevih kationa u pokretnoj fazi.

5.3.6.3. Zamjena amonijevog acetata koncentracije 50 mM s amonijevim hidrogenkarbonatom koncentracije 50 mM odnosno 10 mM upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone

Isti eksperiment kao u prethodnom poglavlju proveden je na XSelect CSH kromatografskoj koloni kako bi se istražilo hoće li se isto opažanje uočavati i upotrebom ove kromatografske kolone. Rezultati dobiveni ovim analizama nalaze se u dodatku 8.8.8. Može se primijetiti

da je utjecaj ove promjene na vremena zadržavanja malih molekula neznačajan, dok su u slučaju makrocikličkih spojeva opet primijećene značajnije razlike. Slika 5.18 prikazuje usporedbu vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva upotrebom puferske otopine amonijevog acetata i amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM korištene kao vodeni dio pokretne faze, ovaj put na XSelect CSH kromatografskoj koloni.



Slika 5.18 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM (plavi stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM (crveni stupci) i 10 mM (zeleni stupci) kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat).

Vrlo slična opažanja kao na Luna C18 koloni uočena su i na XSelect CSH kromatografskoj koloni. I u ovom slučaju je najjači utjecaj na pomake u vremenima zadržavanja primijećen za spojeve s kraćim vremenima zadržavanja, odnosno za spojeve s nižom lipofilnošću. Smanjenjem koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata ponovno dolazi do manjih pomaka prema višim vrijednostima vremena zadržavanja za iste spojeve. Također, isti spojevi koji su se pokazali neosjetljivi na promjene pokretne faze pri upotrebi Luna C18 kolone, to su pokazali i pri upotrebi XSelect CSH kromatografske kolone. Ovime se može potvrditi da vrsta puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze utječe na vremena zadržavanja pri analizama na obje kromatografske kolone.

5.3.7. Utjecaj vrste organskog otapala u pokretnoj fazi na vremena zadržavanja istraživanih spojeva

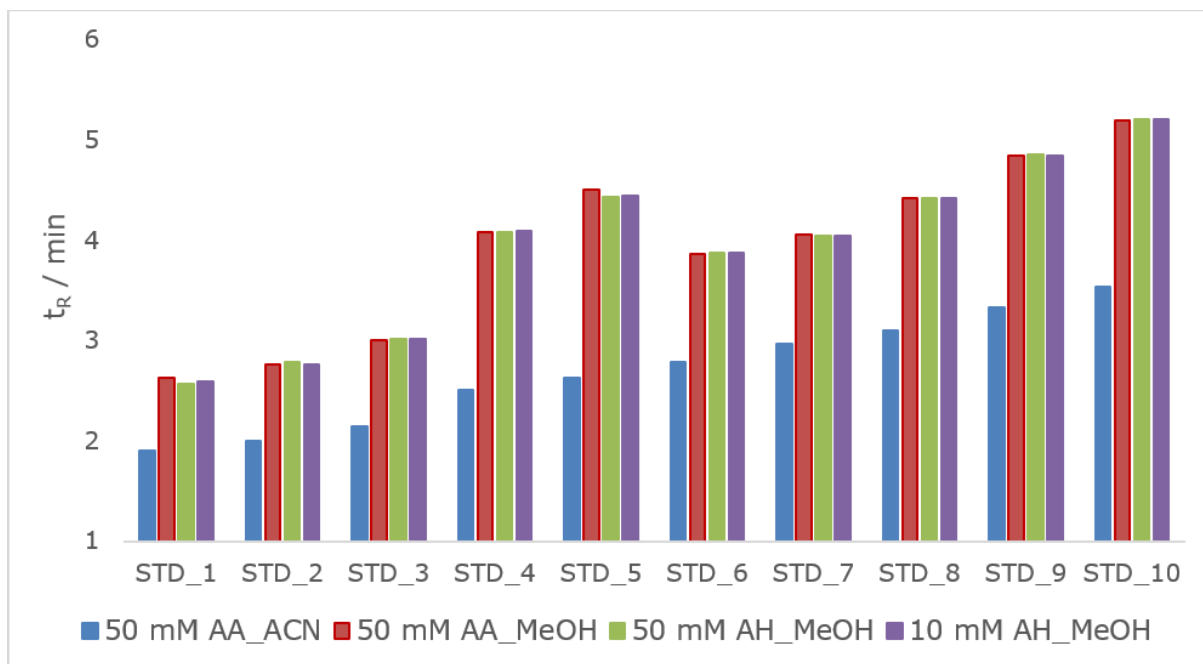
Upotrebom CHI metode koristi se acetonitril kao organsko otapalo u pokretnoj fazi. Najveća prednost acetonitrila leži u njegovoj jačoj snazi ispiranja u usporedbi s metanolom (183) što omogućava primjenu brzih gradijentnih metoda. Također, pri istom gradijentu i protoku, smjesa vodenog dijela pokretne faze i acetonitrila generira niži tlak na

kromatografskoj koloni. Međutim, i metanol ima određene prednosti. U prvom redu, minimalno narušava postojeće vodikove veze vode, odnosno njezinu trodimenzionalnu strukturu, jer je i sam u mogućnosti sudjelovati u istoj (76,184). Po tome je sličniji n-oktanolu od acetonitrila pa bi lipofilnost dobivena kromatografskim metodama upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi mogla imati bolju podudarnost s onom dobivenom u sustavu n-oktanol-voda. Zbog navedenih razloga istražen je utjecaj zamjene acetonitrila metanolom kao organskog otapala u pokretnoj fazi. S obzirom da je u poglavlju 5.3.6 zaključeno da promjena vrste puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze utječe na vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva, istraženi su eventualni utjecaji zamjene acetonitrila metanolom pri istim proučavanim promjenama. Dakle, uz zamjenu acetonitrila metanolom, promatrane su promjene vrste puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze upotrebom amonijevog hidrogenkarbonata umjesto amonijevog acetata pri čemu je proučen i utjecaj smanjenja koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata na vremena zadržavanja istraživanih spojeva. Tako su na obje kromatografske kolone, Luna C18 i XSelect CSH, provedena po četiri eksperimenta s varijacijama pokretne faze:

- amonijev acetat koncentracije 50 mM i acetonitril – eksperimentalni uvjeti CHI metode;
- amonijev acetat koncentracije 50 mM i metanol;
- amonijev hidrogenkarbonat koncentracije 50 mM i metanol;
- amonijev hidrogenkarbonat koncentracije 10 mM i metanol.

5.3.7.1. Zamjena acetonitrila metanolom upotrebom Luna C18 kromatografske kolone

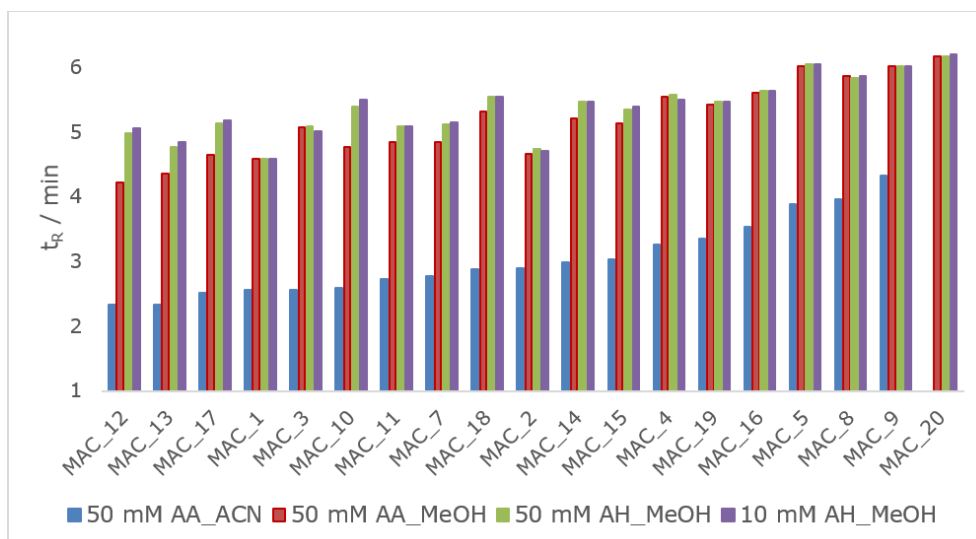
Najprije je istraženo do kakvih promjena u vremenima zadržavanja dolazi zamjenom acetonitrila, koji se koristi kao organsko otapalo u pokretnoj fazi upotrebom CHI metode, metanolom. Također, mijenjala se vrsta, ali i koncentracija puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze. Rezultati dobiveni ovim analizama nalaze se u dodatku 8.8.9. Slika 5.19 pokazuje utjecaj istraženih promjena na vremena zadržavanja malih molekula.



Slika 5.19 Usporedba vremena zadržavanja malih molekula dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na Luna C18 kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).

Na grafu se uočava da zamjenom acetonitrila metanolom dolazi do sustavno viših vrijednosti vremena zadržavanja malih molekula. Ovakvo opažanje je i očekivano zbog slabije snage ispiranja metanola u usporedbi s acetonitriplom. Također, relativni odnos vremena zadržavanja istraživanih spojeva za većinu spojeva ostaje nepromijenjen, dok za STD_4 – kolhicin i STD_5 – 8-fenilteofilin upotrebom metanola dolazi do većeg povećanja u vremenima zadržavanja od očekivanog. Što se tiče promjene vrste i koncentracije puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze uz upotrebu metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi, može se primijetiti da ne dolazi do značajnijih pomaka u vremenima zadržavanja bilo da se amonijev acetat zamjeni s amonijevim hidrogenkarbonatom, bilo da se smanji koncentracija amonijevog hidrogenkarbonata, sve uz upotrebu metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi. Ova opažanja upućuju na zaključak da je vrsta organskog otapala u pokretnoj fazi dominantan čimbenik koji određuje jačinu interakcije malih molekula s nepokretnom fazom.

Isto istraživanje provelo se i na makrocikličkim spojevima te su rezultati prikazani u dodatku 8.8.9 i na Slika 5.20.

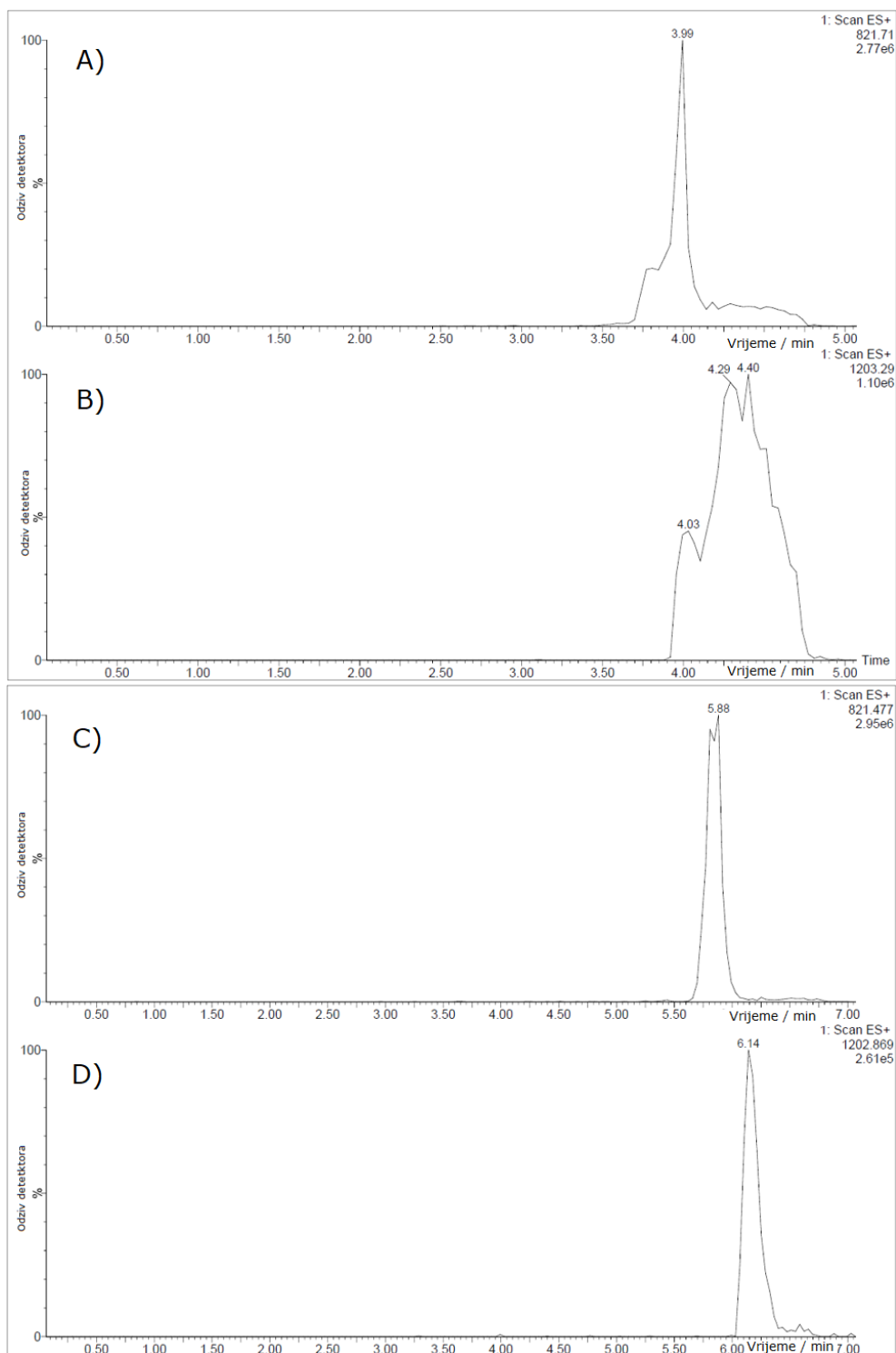


Slika 5.20 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva početne skupine dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na Luna C18 kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).

Kao i u slučaju malih molekula, slabija snaga ispiranja metanola uzrokuje pomake vremena zadržavanja prema većim vrijednostima za sve makrocikličke spojeve. Što se tiče promjena u relativnim odnosima vremena zadržavanja istraživanih spojeva, ovdje se ne uočava neki specifičan trend, odnosno teško je razaznati za koje spojeve dolazi do značajnije promjene. Ali se zato može primijetiti kako, za razliku od malih molekula kod kojih promjena vrste i koncentracije puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze nije pokazala značajan utjecaj na vremena zadržavanja, u slučaju makrocikličkih spojeva ipak dolazi do pomaka prema višim vrijednostima. Pritom najjači utjecaj na vremena zadržavanja ima zamjena amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom u slučaju manje lipofilnih makrolidnih spojeva, dok za cikličke peptide, ansamicine kao i makrolide većih vremena zadržavanja gotovo da nema utjecaja. Nadalje, isti trend povećanja vremena zadržavanja, iako puno manje izražen, može se primijetiti smanjenjem koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata na s 50 mM na 10 mM. Ova opažanja su u skladu s opažanjima primijećenima u poglavlju 5.3.5.1 gdje su se isti eksperimenti promjene vrste i koncentracije puferske otopine provedeni upotrebom acetonitrila kao organskog otapala u pokretnoj fazi.

Još jedno važno opažanje proizašlo je iz ovog istraživanja. Upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi primijećeno je značajno poboljšanje učinkovitosti kromatografske kolone za spojeve koji su upotrebom acetonitrila imali široke kromatografske pikove. Tako se na Slika 5.21 može uočiti značajno sužavanje kromatografskog pika za spojeve MAC_8 – takrolimus i MAC_20 – ciklosporin. Ovakav

izgled pika olakšava jednoznačno očitavanje vremena zadržavanja spoja, što dovodi do točnijeg određivanja kromatografske lipofilnosti.

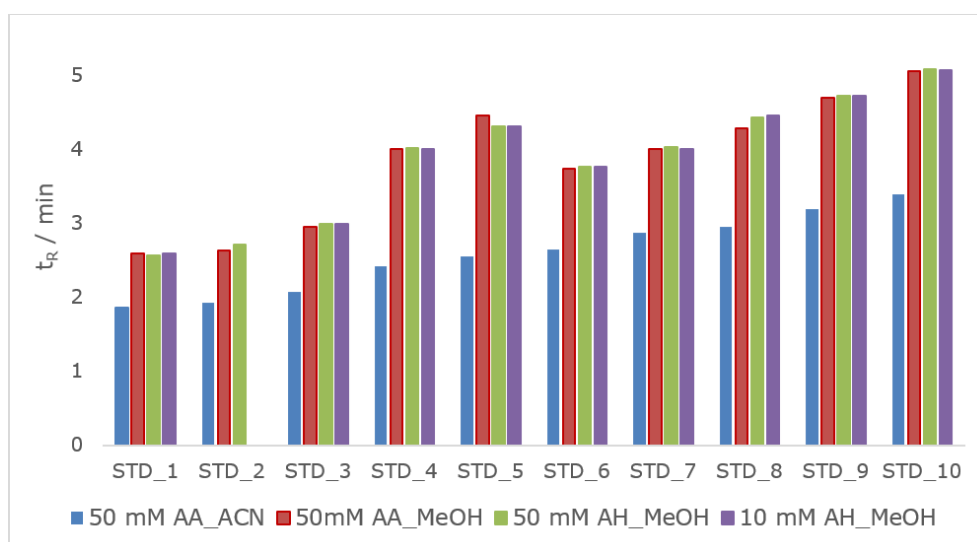


Slika 5.21 Kromatografski pikovi A) MAC_8 – takrolimusa i B) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom acetonitrila te C) MAC_8 – takrolimusa i D) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi na Luna C18 kromatografskoj koloni.

Razlog smanjenja širine kromatografskih pikova leži u činjenici da metanol, za razliku od acetonitrila, zbog svojih proton-donorskih odnosno proton-akceptorskih svojstava može sudjelovati u elektrostatskim interakcijama sa slobodnim silanolnim skupinama nepokretne faze te time onemogućava ostvarivanje sekundarnih interakcija s bazičnim analitima (185).

5.3.7.2. Zamjena acetonitrila metanolom upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone

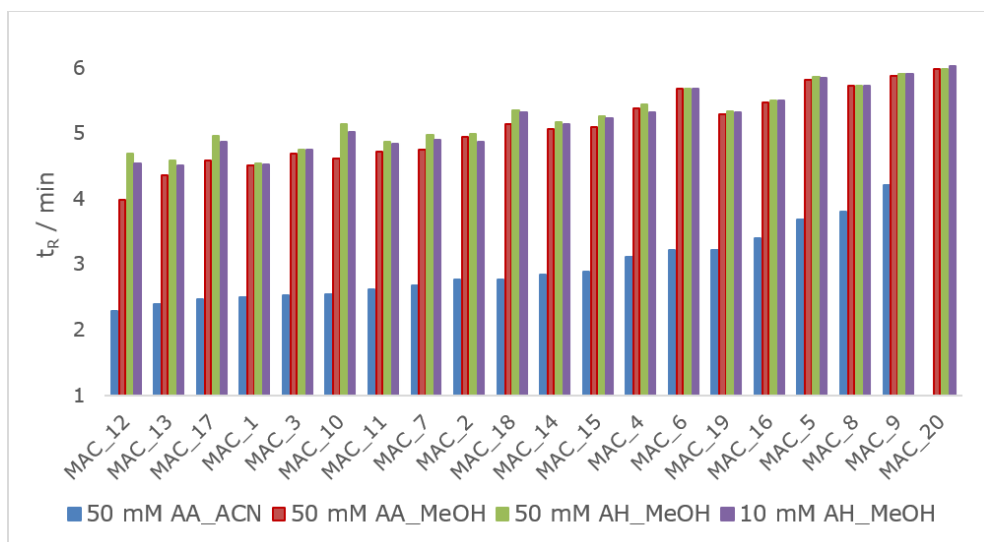
Kako bi se istražilo kakav utjecaj ima zamjena acetonitrila metanolom ako se analize provedu na XSelect CSH kromatografskoj koloni, provedeni su isti eksperimenti kao u prethodnom poglavlju. Rezultati ovog istraživanja dani su u dodatku 8.8.10. Slika 5.22 prikazuje usporedbu vremena zadržavanja malih molekula dobivenu ovim istraživanjem.



Slika 5.22 Usporedba vremena zadržavanja malih molekula dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na XSelect CSH kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).

Isto kao što je primijećeno kod Luna C18 kromatografske kolone, zamjenom acetonitrila metanolom pri upotrebi XSelect CSH kromatografske kolone dolazi do značajnog povećanja vremena zadržavanja za spojeve STD_4 – kolhicin i STD_5 – 8-fenilteofilin uz sustavno povećanje vremena zadržavanja svih spojeva. Naknadnom zamjenom amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom te smanjenjem koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata male molekule nisu pokazale značajne promjene u zadržavanju na nepokretnoj fazi.

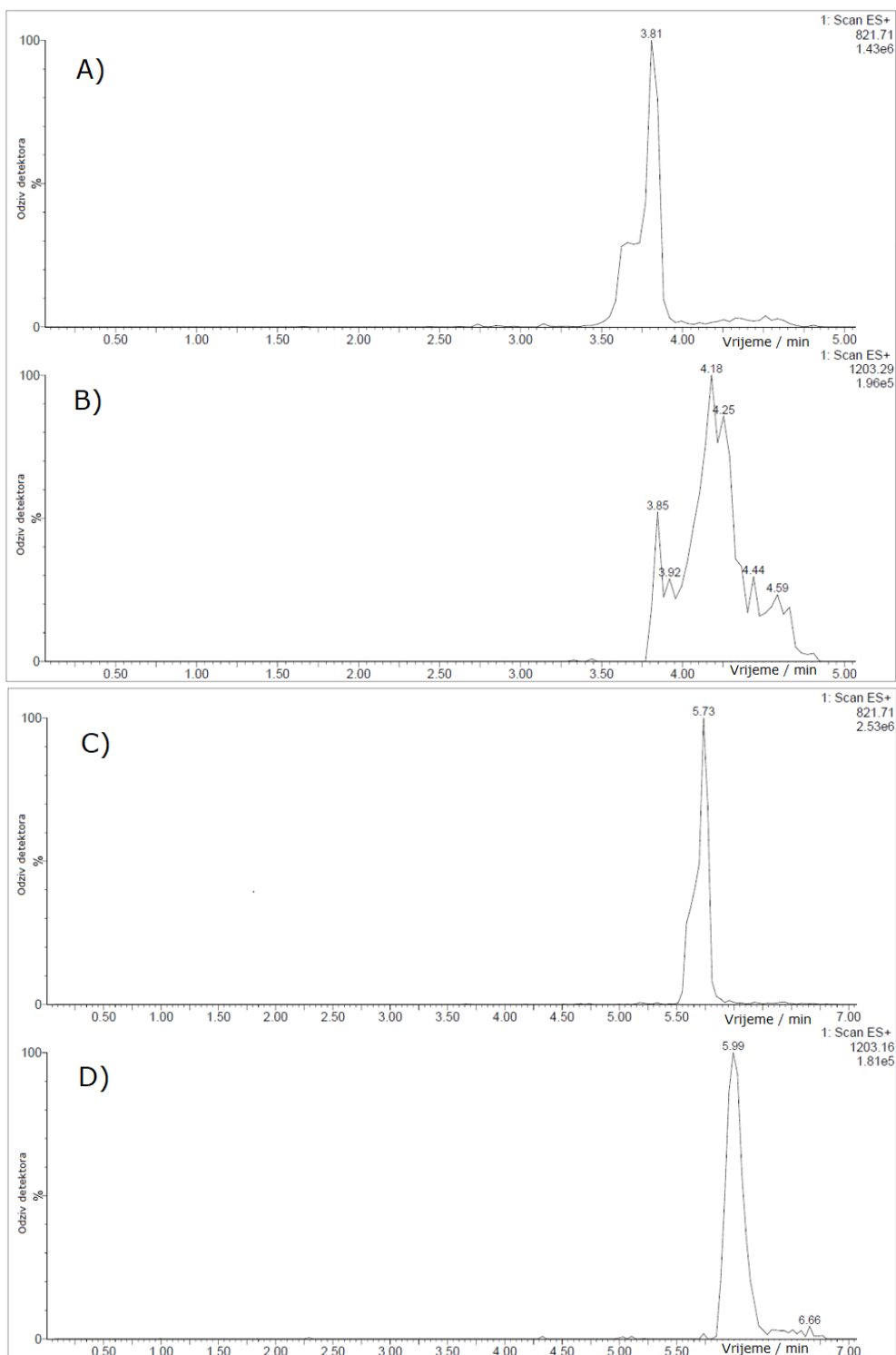
Rezultati ovog ispitivanja provedeni su i na makrocikličkim spojevima te su rezultati prikazani na Slika 5.23.



Slika 5.23 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na XSelect CSH kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).

U slučaju makrocikličkih spojeva primjećuje se slabija snaga ispiranja metanola u usporedbi s acetonitriplom. Rezultati su vrlo slični onima dobivenima na Luna C18 koloni pa se tako opet najveći utjecaj na pomake vremena zadržavanja primjećuje za makrolidne spojevi nižih vremena zadržavanja.

Kromatografske analize makrocikličkih spojeva pri upotrebi metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi na Luna C18 koloni pokazale su povećanu učinkovitosti pri upotrebi metanola u usporedbi s acetonitriplom (Slika 5.21). Uz to, XSelect CSH kolona je pokazala bolju učinkovitost pri analizama makrocikličkih spojeva od Luna C18 kolone upotrebom CHI metode (poglavlje 5.3.4) pa je ispitano kako kombinacija ove dvije promjene utječe na širinu kromatografskih pikova makrocikličkih spojeva. Na Slika 5.24 može se uočiti sužavanje kromatografskih pikova za spojeve MAC_8 – takrolimus i MAC_20 – ciklosporin upotrebom metanola u usporedbi s upotrebom acetonitrila kao organskog otapala u pokretnoj fazi.



Slika 5.24 Kromatografski pikovi A) MAC_8 – takrolimusa i B) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom acetonitrila te C) MAC_8 – takrolimusa i D) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi na XSelect CSH kromatografskoj koloni.

Ovo opažanje ukazuje da je upotreba XSelect CSH kolone u kombinaciji s metanolom kao organskim otapalom u pokretnoj fazi najpogodnija za analize makrocikličkih spojeva ako se u obzir uzme širina i simetrija kromatografskih pikova.

5.3.8. Usporedba kromatografskih uvjeta za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva za predviđanje log *D* vrijednosti

Istraživanjima prikazanim unutar poglavlja 5.3 proučavao se utjecaj promjena u kromatografskim uvjetima na vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva te su dobivene vrijednosti uspoređivane vrijednostima dobivenima upotrebom CHI metode. Osim toga promatrane su i promjene u izgledu kromatografskih pikova za makrocikličke spojeve koji su pri uvjetima CHI metode imali značajniju asimetričnost. U prethodnim poglavljima je pokazano da promjene nekih istraženih kromatografskih uvjeta dovode do promjena u apsolutnim vrijednostima vremena zadržavanja početne skupine makrocikličkih spojeva, ali i u relativnim odnosima istih. Zato je bilo potrebno usporediti gradijentna vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva početne skupine dobivena primjenom istraženih kromatografskih uvjeta s log *D* vrijednostima dobivenima metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode. Na ovaj način je istraženo kojom kombinacijom kromatografskih uvjeta se dobiju pokazatelji lipofilnosti najbliži log *D* vrijednostima. Kako bi se utvrdilo koja kombinacija od gore istraživanje eksperimentalnih kromatografskih uvjeta daje najbolje predviđanje log *D* vrijednosti makrocikličkih spojeva, provedena je regresijska analiza, gdje su kao neovisna varijabla uzete CAMDIS log *D* vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva, dok su kao ovisne varijable uzeta vremena zadržavanja dobivena pri istraženim eksperimentalnim kromatografskim uvjetima prikazanim u poglavlju 5.3. Treba naglasiti da je ovakva analiza provedena isključivo za eksperimentalne uvjete za koje je utvrđeno da njihovom primjenom dolazi do značajnih pomaka u vremenima zadržavanja ili u relativnim odnosima vremena zadržavanja istraženih spojeva. Linearnom regresijom dobiveni su koeficijenti determinacije linearne regresije, R^2 , koji su korišteni kao mjera korisnosti modela za predviđanje log *D* vrijednosti primijenjenom kromatografskom metodom. Vrijednosti R^2 prikazane su u Tablica 5.3. Cilj ovog istraživanja je bio odabrati kromatografske uvjete koji daju najbolje moguće kromatografske pikove za makrocikličke spojeve, uz uvjet da koeficijent determinacije i dalje ostane zadovoljavajuće visok.

Tablica 5.3 Koeficijenti determinacije linearne regresije, R^2 , dobiveni korelacijom CAMDIS log D vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva i njihovih vremena zadržavanja dobivenih primjenom različitih kombinacija nepokretnih i pokretnih faza.

Kromatografska kolona	Primijenjeni eksperimentalni uvjeti	R^2
Luna C18	70 mM AA ^a + ACN ^b	0,9410
	50 mM AA ^a + ACN ^b	0,9368
	30 mM AA ^a + ACN ^b	0,9353
	10 mM AA ^a + ACN ^b	0,9333
	5 mM AA ^a + ACN ^b	0,7375
	50 mM AH ^c + ACN ^b	0,8397
	10 mM AH ^c + ACN ^b	0,7868
	50 mM AA ^a _MeOH ^d	0,7737
	50 mM AH ^c _MeOH ^d	0,6230
	10 mM AH ^c _MeOH ^d	0,5597
XSelect CSH C18	70 mM AA ^a + ACN ^b	0,9350
	50 mM AA ^a + ACN ^b	0,9302
	30 mM AA ^a + ACN ^b	0,9313
	10 mM AA ^a + ACN ^b	0,9183
	5 mM AA ^a + ACN ^b	0,8638
	50 mM AH ^c + ACN ^b	0,8375
	10 mM AH ^c ACN ^b	0,7696
	50 mM AA ^a _MeOH ^d	0,7439
	50 mM AH ^c _MeOH ^d	0,7572
	10 mM AH ^c _MeOH ^d	0,7501

^a AA – amonijev acetat

^b ACN – acetonitril

^c AH – amonijev hidrogenkarbonat

^d MeOH – metanol

Koeficijenti determinacije provedenih regresijskih analiza ukazuju na visoku povezanost između CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja gotovo svih ispitanih eksperimentalnih kromatografskih uvjeta te se kreću u rasponu od 0,5597 do 0,9410. Najviše vrijednosti koeficijenta determinacije ukazuju na kromatografske uvjete koji najbolje predviđaju log D vrijednosti. Može se uočiti kako su najviše R^2 vrijednosti dobivene primjenom acetonitrilnog gradijenta uz amonijev acetat kao vodeni dio pokretne faze u rasponu koncentracija od 10 mM do 70 mM, bilo da je riječ o Luna ili XSelect CSH kromatografskoj koloni. Kad se koncentracija amonijevog acetata smanji na 5 mM, dolazi do značajnijeg sniženja koeficijenta determinacije. Sve ostale promjene u eksperimentalnim uvjetima, bilo da je riječ o upotrebi metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi ili zamjene amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom, rezultirale su nižim R^2 vrijednostima, odnosno njihova mogućnost predviđanja log D vrijednosti je lošija. Ovakvo opažanje nije u skladu s očekivanjima jer metanol kao i n-

oktanol, ima mogućnost stvaranja vodikovih veza te bi trebao biti sličniji n-oktanolu od acetonitrila. Međutim, ovime je pokazano da korištenje acetonitrila kao organskog otapala u pokretnoj fazi prikladnije za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva. Može se zaključiti kako acetonitrilni gradijent uz upotrebu amonijevog acetata kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze daje najbolje slaganje između eksperimentalno određene CAMDIS log *D* vrijednosti i vremena zadržavanja istraživanih makrocikličkih spojeva te su ovi kromatografski uvjeti najbolji za njihovo lipofilno profiliranje.

Vezano uz koncentraciju amonijevog acetata u vodenom dijelu pokretne faze, smanjenje koncentracije je istraženo kako bi se uklonila mogućnost taloženja puferske soli u ionizacijskom izvoru MS detektora te spriječilo moguće smanjene osjetljivosti i začepljenje MS detektora. U sklopu ovog rada analize su se provodile tijekom dužeg vremenskog razdoblja s kontinuiranom upotrebom relativno visokih koncentracija amonijevog acetata kao pokretne faze, međutim, nisu primijećeni značajniji problemi smanjenja osjetljivosti MS detektora, kao ni začepjenja samog ionizacijskog izvora. Razlog tome je vjerojatno i upotreba razdjeljivača pokretne faze nakon kromatografske kolone, a prije MS detektora, koji tek manji dio ukupnog protoka propušta u detektor, dok veći dio odlazi u otpad. Ovakva postavka je moguća zbog dovoljno visoke osjetljivosti MS detektora koja dopušta detekciju nižih količina analita. Također, nakon završetka svake kromatografske analize provodile su se mjere opreza tako što su se provodila ispiranja puferske soli s kromatografske kolone i ionizacijskog izvora vodom, nakon čega se provodilo ispiranje kromatografske kolone acetonitrilom do sljedeće analize. Kako je ustanovljeno da relativno visoka koncentracije amonijevog acetata ipak ne uzrokuje probleme s kromatografskim sustavom ako se provode potrebne mjere predostrožnosti, ostaje mogućnost da se odabere koja koncentracija će se koristiti za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva. Koeficijenti determinacije u ovom slučaju ne daju jasnu sliku o najboljem odabiru koncentracije puferske otopine koja se koristi kao pokretni dio vodene faze, jer su vrlo slični kad je riječ o koncentracija pufera između 10 mM i 70 mM. Međutim, kako je primijećeno da do najvećih promjena u vremenima zadržavanja nekoliko makrocikličkih spojeva dolazi pri koncentracijama amonijevog acetata nižim od 30 mM te da se učinkovitost kromatografske kolone značajno smanjuje pri nižim koncentracijama, zaključeno je da se koncentracija amonijevog acetata zadrži na 50 mM, koja se koristi i upotrebom CHI metode.

Kromatografska kolona se pokazala kao važan čimbenik u analizama makrocikličkih spojeva. Pri analizama na Luna C18 i XSelect CSH kolonama dobiju se vrlo slični koeficijenti determinacije primjenom istih ostalih kromatografskih uvjeta, međutim XSelect CSH kromatografska kolona je bila efikasnija pri analizama makrocikličkih spojeva (poglavlje 5.3.4). Pokazano je da se za MAC_20 – ciklosporin, kao spoj s najširim kromatografskim pikom na Luna C18 koloni, upotrebom XSelect CSH kolone dobije prihvatljiva širina kromatografskog pika, što omogućuje jednoznačno očitavanje vremena zadržavanja. Pri

istraživanju promjena u relativnim odnosima vremena zadržavanja, pokazano je da ne dolazi do značajnih pomaka pri analizama makrocikličkih spojeva. Može se zaključiti da je XSelect CSH kromatografska kolona pogodnija za analize makrocikličkih spojeva od Luna C18 kolone.

Ostali istraženi kromatografski uvjeti, a to su temperatura kromatografske kolone, protok pokretne faze te brzina primijenjenog gradijenta, nisu pokazali značajan utjecaj na relativne odnose vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva te se može zaključiti da odabir tih parametara može biti proizvoljan.

5.4. Određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom optimizirane kromatografske metode

U trećem dijelu ovog doktorskog rada predložena je nova optimizirana kromatografska metoda za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva. Odabrani su makrociklički spojevi koji služe za kalibraciju kromatografskog sustava te je na kraju određena jednadžba kojom bi se vremena zadržavanja novih makrocikličkih spojeva mogla preračunati na log D skalu. Također, proučena je mogućnost ubrzanja kromatografskog određivanja lipofilnosti grupiranjem spojeva za analize. Na kraju, uspoređeni su pokazatelji lipofilnosti dobiveni različitim metodama korištenima u ovom radu.

5.4.1. Optimizirani kromatografski uvjeti za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva

Novi kromatografski uvjeti odabrani su na temelju istraživanja u prethodnim poglavljima, tako da na najbolji mogući način pružaju predviđanje log D vrijednosti makrocikličkih spojeva bez upotrebe klasične metode izmućivanja. Optimalni kromatografski uvjeti za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva prikazani u Tablica 5.4. Kromatografska metoda je nazvana Macro log D te se taj naziv koristi u daljnjem tekstu.

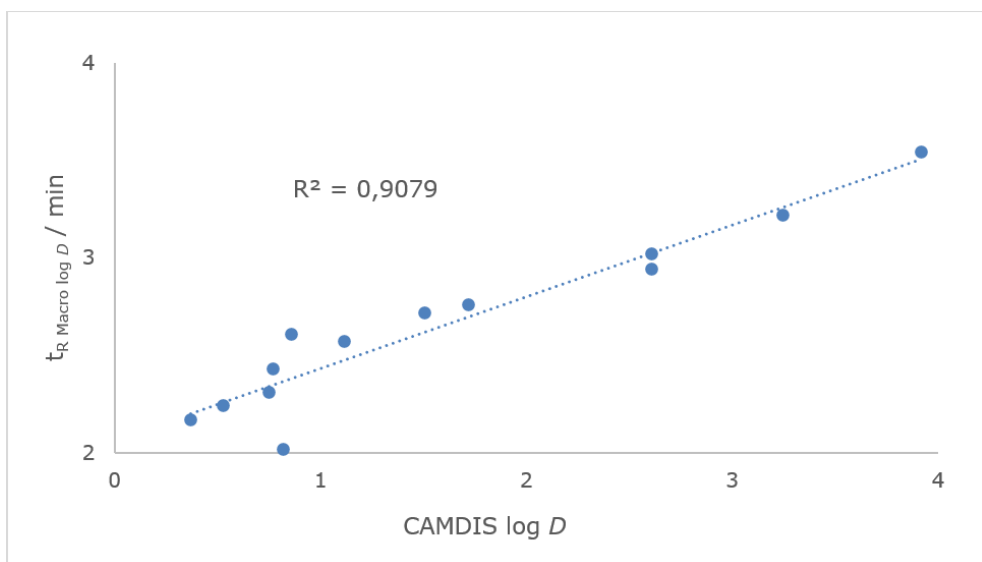
Kromatografski uvjeti su odabrani na temelju kriterija opisanih u poglavlju 5.3.8. Ukratko, XSelect CSH C18 kolona je odabrana zbog boljeg izgleda kromatografskih pikova makrocikličkih spojeva u usporedbi s Luna C18 kromatografskom kolonom, pri čemu su koeficijenti determinacije na obje kolone bili usporedivi. Otopina amonijevog acetata je odabrana kao vodeni dio pokretne faze jer je pokazano da je predviđanje log D vrijednosti upotrebom amonijevog acetata bolje nego kad se koristi amonijev hidrogenkarbonat. Također, koncentracija amonijevog acetata je zadržana na 50 mM jer je korelacija lošija upotrebom niže koncentracije, a dolazi i do značajnije asimetričnosti kromatografskih pikova. Acetonitril je odabran kao organsko otapalo u pokretnoj fazi jer daje značajnije

bolju korelaciju s $\log D$ vrijednostima iako su kromatografski pikovi upotrebom metanola značajno uži i bolje simetrije. Kod gradijentnog programa uveden je udio organskog otapala od 5 % (V / V) u pokretnoj fazi pri početnim uvjetima. Razlog tome je očuvanje svojstava kromatografske kolone jer poznato da pri udjelima vodene faze višim od 98 % (V / V) postoji mogućnost kolapsa nepokretne faze (14,186). Od ostalih kromatografskih uvjeta važno je navesti da je odabrana temperatura kromatografske kolone od 60 °C jer viša temperatura pospješuje dobivanje užih kromatografskih pikova, što se pokazalo važno za analize makrocikličkih spojeva.

Tablica 5.4 Optimalni kromatografski uvjeti za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva – Macro log D kromatografska metoda.

Kromatografska kolona	XSelect CSH C18, duljine 50 mm, unutarnjeg promjera 3 mm, veličine čestica 5 μm , veličine pora 130 Å					
Vodeni dio pokretne faze	50 mM amonijev acetat u vodi pri pH 7,40					
Organski dio pokretne faze	Acetonitril					
Gradijentni program	t / min	0,0	3,0	3,5	3,7	5
	Vodeni dio pokretne faze φ / %	95	0	0	95	95
	Organski dio pokretne faze φ / %	5	100	100	5	5
Protok	1 ml min ⁻¹					
Volumen injektiranja	1 μl					
Temperatura kromatografske kolone	60 °C					

Metoda izmućkivanja je zlatni standard za određivanje lipofilnosti te je u ovom radu jedan od ciljeva bio pronaći kromatografsku metodu koja će omogućiti dobivanje podataka o lipofilnosti spojeva koji bi bili usporedivi s $\log D$ vrijednostima dobivenima upotrebom metode izmućkivanja. Stoga je bilo potrebno provjeriti u kojoj mjeri vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivena Macro log D metodom koreliraju s CAMDIS log D vrijednostima. Slika 5.25 prikazuje korelaciju između CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja dobivenih Macro log D metodom za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.



Slika 5.25 Korelacija između CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja dobivenih upotrebom Macro log D metode za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.

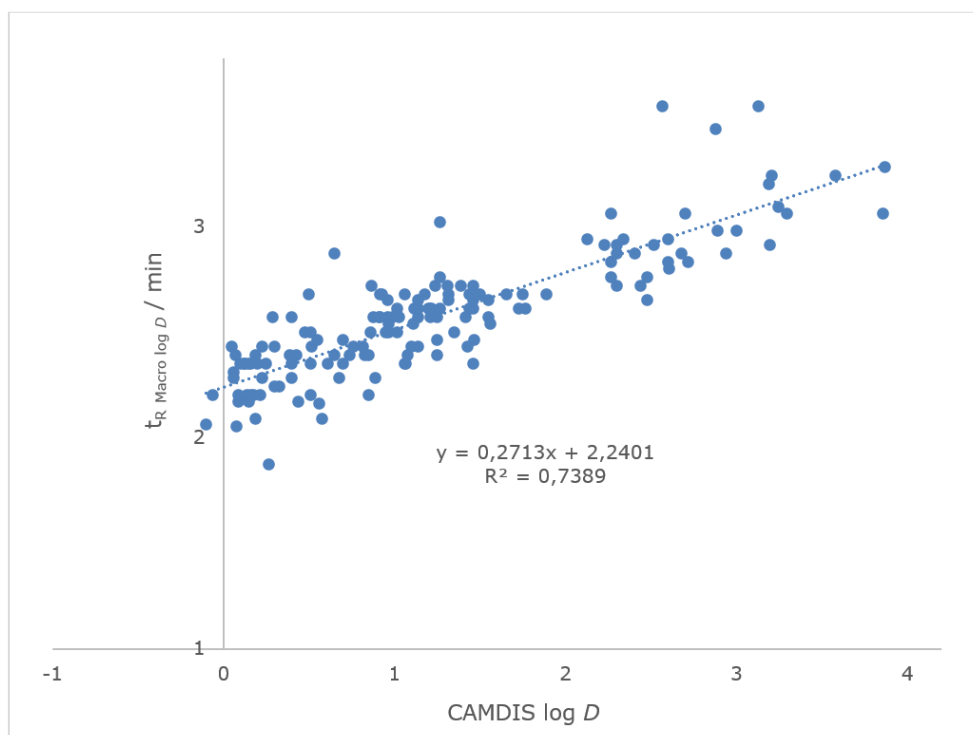
Vrlo dobra korelacija s visokim koeficijentom determinacije ($R^2 = 0,9079$) ukazuje da Macro log D kromatografska metoda dobro predviđa log D vrijednosti za početnu skupinu makrocikličkih spojeva. Iako je upotrebom CHI metode dobivena nešto bolja korelacija s $R^2 = 0,9436$ (Slika 5.2), upotrebom Macro log D metode dobiju se uži kromatografski pikovi bolje simetrije s mogućnošću jednoznačnog očitavanja vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva.

5.4.2. Provjera primjene Macro log D kromatografske metode na proširenu skupinu makrocikličkih spojeva

Primjenjivost optimizirane Macro log D kromatografske metode za određivanje log D vrijednosti makrocikličkih spojeva testirana je na proširenoj skupini koja se sastojala od 236 strukturno raznolikih makrocikličkih spojeva iz Fidelta Macro™ platforme. Prvi korak bio je određivanje log D vrijednosti svih spojeva upotrebom CAMDIS metode. Od 236 testiranih makrocikličkih spojeva, 50 ih je bilo izuzetno hidrofilno pa se točna brojčana log D vrijednost nije mogla odrediti jer je njihova log D vrijednost izvan granice određivanja CAMDIS metodom. Ovim spojevima je pridružena log D vrijednost $< -0,2$. Nadalje, za 10 spojeva analiza uzoraka nije bila moguća zbog neuspješne optimizacije parametara rada MS detektora. Za 21 spoj je primijećen prevelik rasap dobivenih log D vrijednosti pa je naznačeno da su dobiveni neprecizni rezultati. Jedan spoj je istaložio prilikom dodatka u otopinu fosfatnog pufera koji se koristi u CAMDIS pokusu. Nakon što su navedeni spojevi isključeni iz daljnjeg razmatranja, konačni broj spojeva proširene skupine kojima je uspješno određena CAMDIS log D vrijednost bio je 154.

Sljedeći korak je bio određivanje vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log D kromatografske metode. Analizirano je svih 236 spojeva proširene skupine, kako bi se provjerila sposobnost Macro log D metode za dobivanje pokazatelja lipofilnosti makrocikličkih spojeva. Vremena zadržavanja uspješno su određena za cijelu proširenu skupinu makrocikličkih spojeva što pokazuje veliku prednost koju kromatografska metoda ima u usporedbi s metodom izmućivanja u lipofilnom profiliranju spojeva makrocikličke klase. CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva prikazana su u dodatku 8.9.

U prethodnom poglavlju pokazano je kako za početnu skupinu makrocikličkih spojeva Macro log D kromatografska metoda dobro korelira s CAMDIS log D vrijednostima pa su ove dvije metode uspoređene i za proširenu skupinu spojeva iz klase makrocikala. Dobivene CAMDIS log D vrijednosti korelirane su s vremenima zadržavanja kako je prikazano na Slika 5.26.



Slika 5.26 Korelacija između CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja dobivenih upotrebom Macro log D metode za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.

Koeficijent determinacije od $R^2 = 0,7389$ je nešto niži nego u slučaju početne skupine makrocikličkih spojeva, ali i dalje pokazuje vrlo dobru povezanost ova dva pokazatelja lipofilnosti, što ukazuje na to da se lipofilnost, odnosno log D vrijednost makrocikličkih spojeva može dobro predvidjeti upotrebom Macro log D kromatografske metode uspostavljenom u ovom radu.

5.4.3. Odabir makrocikličkih spojeva kao kalibracijskih standarda i prijedlog jednadžbe za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log *D* metode

Kako bi se kromatografska metoda za određivanje lipofilnosti mogla prenijeti na bilo koji kromatografski sustav, potrebno je provesti kalibraciju sustava. S obzirom da vremena zadržavanja spoja ovise o mnogim parametrima kromatografskog sustava, nije ih ispravno koristiti kao jedinstvenu usporedivu vrijednost za određivanje lipofilnosti spojeva. Iz tog razloga se prije svakog kromatografskog određivanja lipofilnosti CHI metodom provodi kalibracija sustava tako što se vremena zadržavanja standarda prevedu u CHI vrijednosti, iz kojih se zatim može izračunati Chrom log *D* vrijednost istraživanog spoja.

Kalibracijski standardi koji se koriste upotrebom CHI metode su male molekule i, kako je pokazano u istraživanjima u poglavlju 5.3, njihova vremena zadržavanja su relativno robusna te promjene u kromatografskim uvjetima najčešće ne utječu na njihova vremena zadržavanja. S druge strane, utvrđeno je da je analitičko ponašanje makrocikličkih spojeva drugačije. Njihova vremena zadržavanja, ali i oblici kromatografskih pikova, puno su osjetljiviji na promjene u eksperimentalnim kromatografskim uvjetima. Nadalje, nekoliko kalibracijskih standarda koje koristi CHI metoda nemaju sposobnost ionizacije te se ne mogu detektirati MS detektorom. Iz navedenih razloga u ovom doktorskom radu uvedeni su makrociklički kalibracijski standardi za kalibraciju Macro log *D* metode.

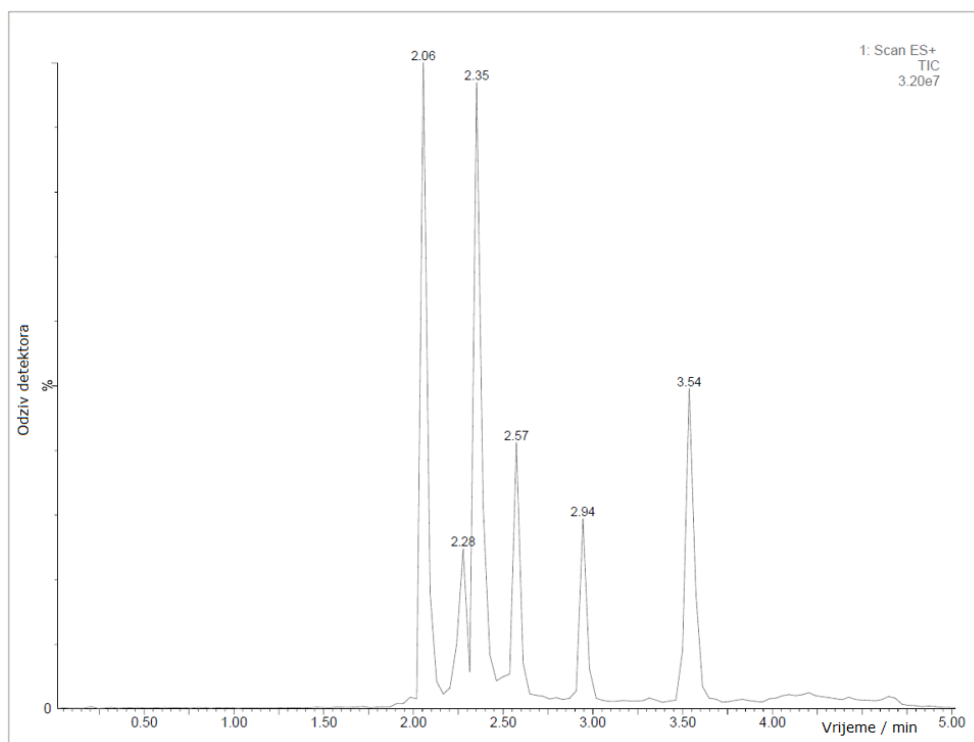
Kalibracijski standardi odabrani su iz početne skupine makrocikličkih spojeva, vodeći računa o sljedećim kriterijima:

- što širi raspon vremena zadržavanja kako bi se osigurala pouzdanost metode u širokom rasponu lipofilnosti;
- dobra ionizacija i odziv upotrebom MS detektora;
- strukturna raznolikost;
- dobar oblik kromatografskog pika zbog mogućnosti jednoznačnog očitavanja maksimuma kromatografskog pika;
- komercijalna dostupnost.

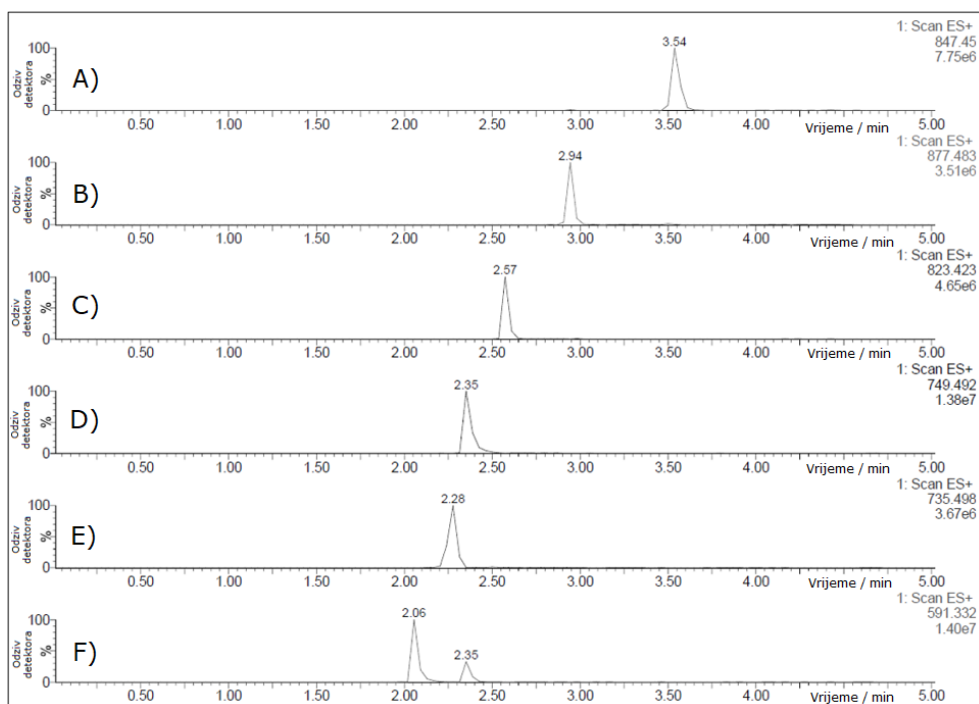
Osim navedenih parametara, pri odabiru makrocikličkih standarda istražio se utjecaj malih promjena u pH vrijednosti acetatnog pufera kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze. Naime, makrociklički spojevi, a osobito oni iz makrolidne skupine, često imaju pK_a vrijednosti između 6 i 9 (Dodatak 8.6) te bi male promjene u pH vrijednosti puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze mogle značajno utjecati na vremena zadržavanja takvih spojeva. Zato je provedeno istraživanje u kojima je primijenjena Macro log *D* kromatografska metoda, a pH vrijednost puferske otopine

korištene kao vodeni dio pokretne faze je podešena na 7,30, 7,40 i 7,50 te je promatran utjecaj promjene na vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva (Dodatak 8.10). Promjene u vremenima zadržavanja primijećene su kod dva makrociklička spoja, MAC_10 – azitromicina i MAC_12 – dekladinozil azitromicina, dok su vremena zadržavanja ostalih spojeva ostala nepromijenjena. Ovi spojevi su zato odabrani za članove kalibracijske skupine kako bi osigurali kontrolu pH vrijednosti pokretne faze.

Nakon analize svih navedenih čimbenika, odabrano je 6 makrocikličkih spojeva koji su pogodni za korištenje kao standardi za kalibraciju kromatografskog sustava upotrebom Macro log *D* metode, a to su MAC_12 – dekladinozil azitromicin, MAC_17 – N'-demetil azitromicin, MAC_10 – azitromicin, MAC_2 – rifampicin, MAC_4 – rifapentin i MAC_5 – rifabutin. Slika 5.27 prikazuje tipičan kromatogram dobiven analizom smjese odabranih makrocikličkih kalibracijskih standarda upotrebom Macro log *D* metode, dok su na Slika 5.28 pokazani kromatogrami dobiveni iz TIC kromatograma odabirom odgovarajuće *m/z* vrijednosti koja odgovara ionu odabranog standarda. Vremena zadržavanja su očitana na MS detektoru čija upotreba je neophodna pri analizama makrocikličkih spojeva. Na ovaj način se uvelo korištenje isključivo MS detektora za detekciju kromatografskih pikova spojeva iz klase makrocikala, tako da se pri upotrebi Macro log *D* kromatografske metode za određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrom masa (engl. *high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer*, HPLC-MS).



Slika 5.27 Tipičan kromatogram kalibracijske smjese dobiven upotrebom Macro log *D* kromatografske metode.



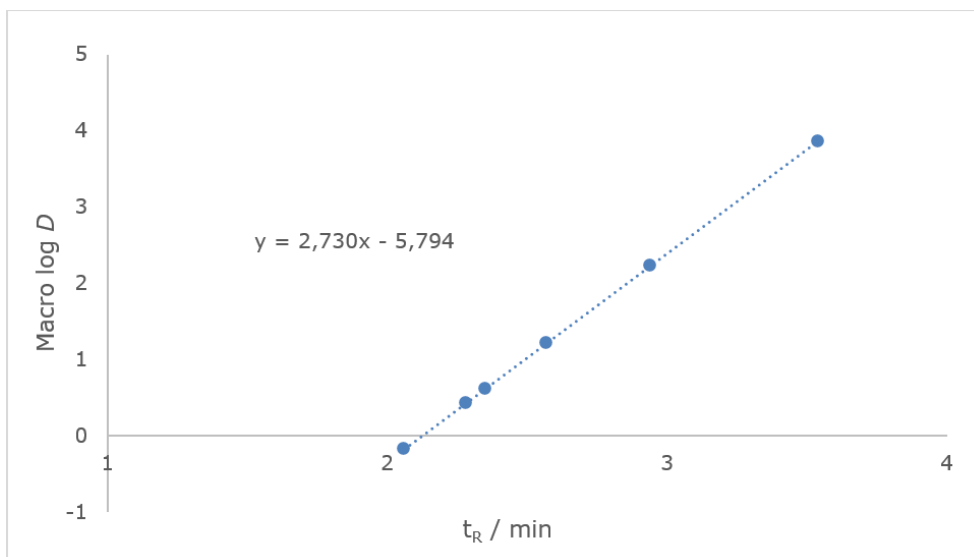
Slika 5.28 Kromatogrami dobiveni iz TIC kromatograma odabirom odgovarajuće m/z vrijednosti koja odgovara ionu odabranog standarda.

Sljedeći korak bio je određivanje Macro log D vrijednosti za makrocikličke standarde koje će se koristiti pri svakom novom mjerenju kao referentne vrijednosti za kalibraciju sustava. U tu svrhu su se iz jednadžbe korelacije CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva (Slika 5.26) izračunale teoretske log D vrijednosti nazvane Macro log D , koje su prikazane u Tablica 5.5.

Tablica 5.5 Odabrani makrociklički standardi za kalibraciju kromatografskog sustava za određivanje lipofilnosti upotrebom Macro log D metode, njihova tipična vremena zadržavanja i Macro log D vrijednosti.

Oznaka spoja	Naziv spoja	t_R / min	Macro log D
MAC_12	Dekladinozil azitromicin	2,06	-0,17
MAC_17	N'-Demetil azitromicin	2,28	0,43
MAC_10	Azitromicin	2,35	0,62
MAC_2	Rifampicin	2,57	1,22
MAC_4	Rifapentin	2,94	2,23
MAC_5	Rifabutin	3,54	3,87

Kako bi se dobila jednadžba za izračunavanje Macro log D vrijednosti novih makrocikličkih spojeva, napravljena je korelacija vremena zadržavanja makrocikličkih standarda i njihovih Macro log D vrijednosti (Slika 5.29).



Slika 5.29 Tipičan kalibracijski pravac s jednadžbom za kromatografsko određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva dobiven upotrebom Macro log D metode.

Na ovaj način je dobivena jednadžba za izračunavanje pokazatelja lipofilnosti makrocikličkih spojeva Macro log D bilo kojeg novog makrocikličkog spoja (Jednadžba 5.1).

$$\text{Macro log } D = 2,730 \times t_R - 5,794$$

Jednadžba 5.1 Računanje Macro log D vrijednosti.

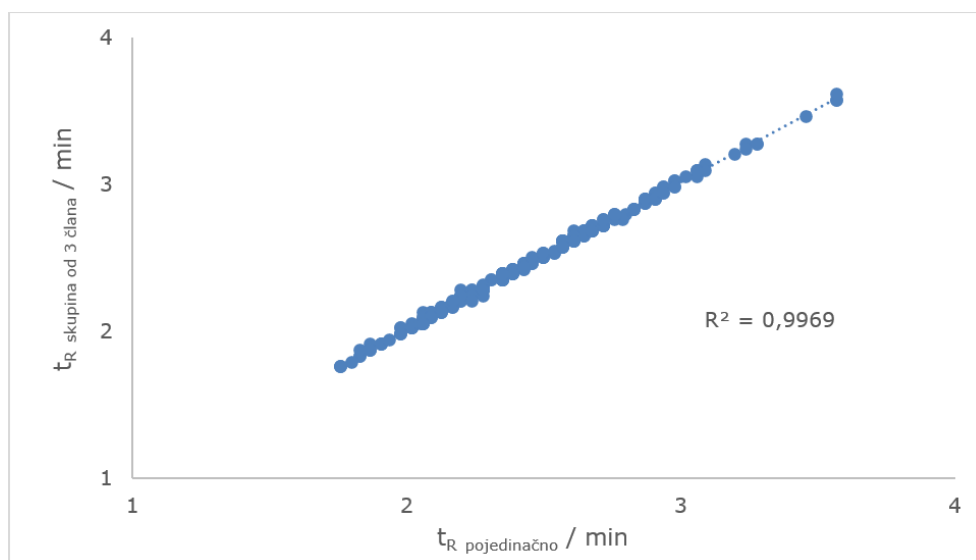
gdje je:

- Macro log D – pokazatelj lipofilnosti novog makrocikličkog spoja;
- t_R – vrijeme zadržavanja analita.

5.4.4. Određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log D kromatografske metode grupiranjem spojeva u skupine od tri člana

Tekućinska kromatografija koristi relativno veliku količinu pokretnih faza, a i vrijeme trajanja analiza može biti ograničavajući čimbenik kad su u pitanju analize velikog broja spojeva. Stoga se teži tome da sve metode u ranijim fazama istraživanja lijekova budu visokoprotočne i učinkovite. Kako bi se istražila mogućnost smanjenja utroška pokretne faze te skraćivanja trajanja kromatografskih analiza za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva, provedeno je istraživanje gdje su se spojevi proširene skupine analizirali pojedinačno te u skupinama od po tri člana. Cilj je bio usporediti dobivene rezultate te provjeriti može li se u jednoj analizi profilirati više spojeva istovremeno. Članovi skupina su odabrani tako da je jedini uvjet za grupiranje bio da se molekulske mase članova grupe razlikuju za najmanje 5 Da kako bi se izbjegle potencijalne interferencije pri očitavanju

vremena zadržavanja pomoću MS detektora. Vremena zadržavanja su dana u dodatku 8.11 te je na Slika 5.30 prikazana korelacija vremena zadržavanja pojedinačnih i grupiranih analiza.



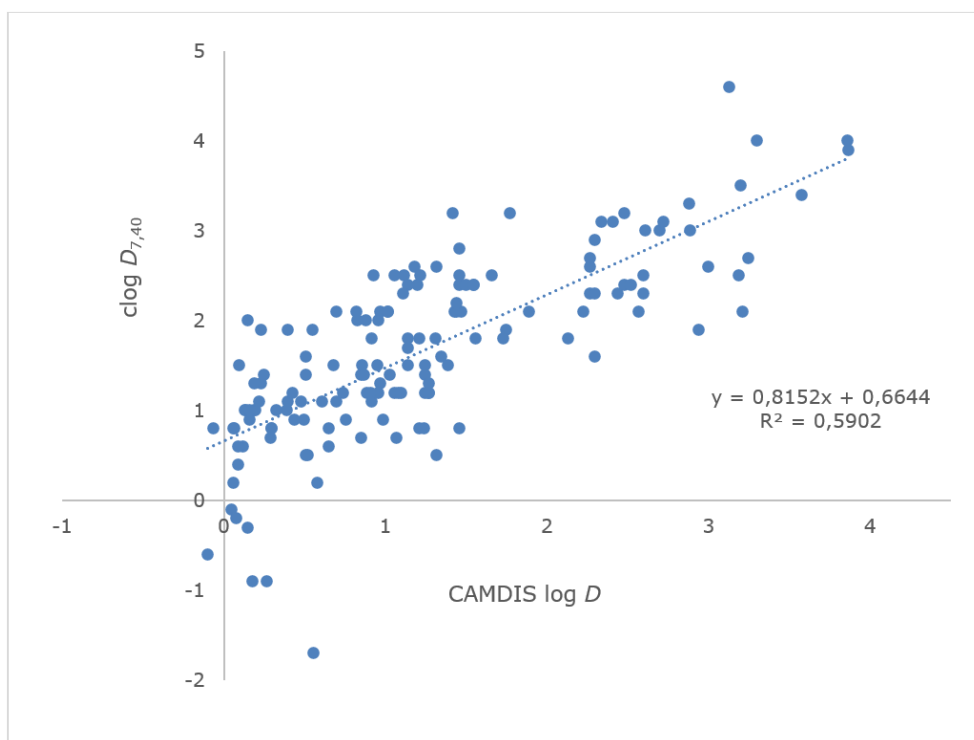
Slika 5.30 Korelacija između vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom Macro log D metode analiziranih samostalno i u skupinama od tri člana.

Vrlo visoki koeficijent determinacije ($R^2 = 0,9969$) ukazuje da su vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva dobivena pri pojedinačnim analizama te u skupinama od tri člana gotovo identična te da je ovim pristupom moguće značajno skratiti vrijeme analize za kromatografsko određivanje lipofilnosti. Ovo je važno osobito kad se analiziraju velike skupine spojeva. U ovom radu je za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva koja se sastoji od 236 članova vrijeme analize skraćeno s 43 sata na 14,5 sati, što je smanjenje od 66 %. Ušteda nije postignuta samo u vremenu analiza, već i u potrebnom volumenu pokretne faze, volumenu otpadnog otapala koje se generira, upotrijebljenim posudicama i plastici za pripremu uzoraka te smanjenju vremena rada kromatografske kolone.

5.5. Usporedba pokazatelja lipofilnosti dobivenih različitim metodama

U literaturi je opisano da programi za *in silico* računanje fizikalno-kemijskih svojstava pa tako i log D vrijednosti, imaju nižu mogućnost predviđanja kad je riječ o strukturno kompleksnim spojevima (63). Za proširenu skupinu je izračunata clog D vrijednost pri pH od 7,40 upotrebom ACD/Labs Percepta računalnog programa (Dodatak 8.12), kako bi se proučila mogućnost *in silico* predviđanja log D vrijednosti za makrocikličke spojeve. U ovom

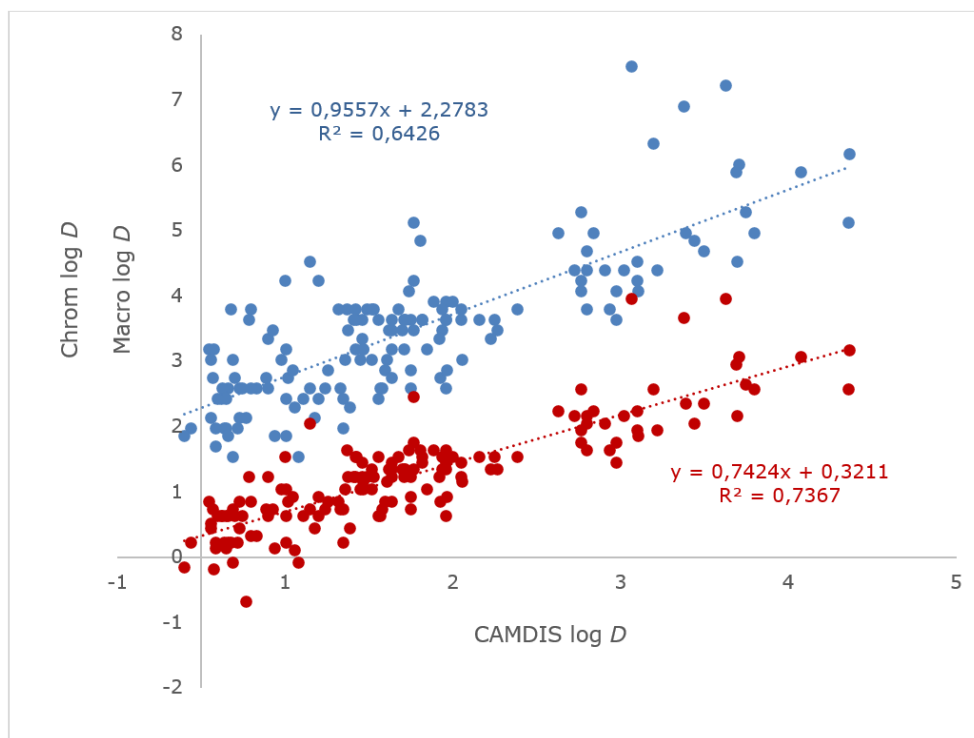
radu CAMDIS log D vrijednosti odabrane su kao referentne vrijednosti lipofilnosti pa se zato pouzdanost *in silico* predviđanja provjerila korelacijom između CAMDIS log D vrijednosti i $\text{clog } D_{7,40}$ (Slika 5.31).



Slika 5.31 Korelacija između CAMDIS log D i $\text{clog } D_{7,40}$ vrijednosti za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.

Koeficijent determinacije $R^2 = 0,5902$ ukazuje da povezanost između ovih pokazatelja lipofilnosti postoji, ali da njihova veza nije osobito jaka. Ovime je pokazano da je mogućnost predviđanja log D vrijednosti upotrebom računalnog programa, u ovom slučaju ACD/Labs Percepte, vrlo ograničena za makrocikličke spojeve.

Budući da *in silico* računanje log D vrijednosti nije pokazao visoku povezanost s eksperimentalnim CAMDIS log D vrijednostima, potrebno je ipak za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva provesti eksperimentalno mjerenje. Najprije je istraženo kakvu mogućnost predviđanja lipofilnosti makrocikličkih spojeva daje CHI metoda pa su cijeloj proširenoj skupini makrocikličkih spojeva određene Chrom log D vrijednosti. Zatim je proširena skupina profilirana i upotrebom Macro log D metode razvijene u ovom radu kako bi se provjerila primjenjivost nove kromatografske metode za profiliranje makrocikličkih spojeva. Rezultati ovih mjerenja su dani u dodatku 8.12. Korelacija Chrom log D i Macro log D s CAMDIS log D vrijednostima prikazana je na Slika 5.32.

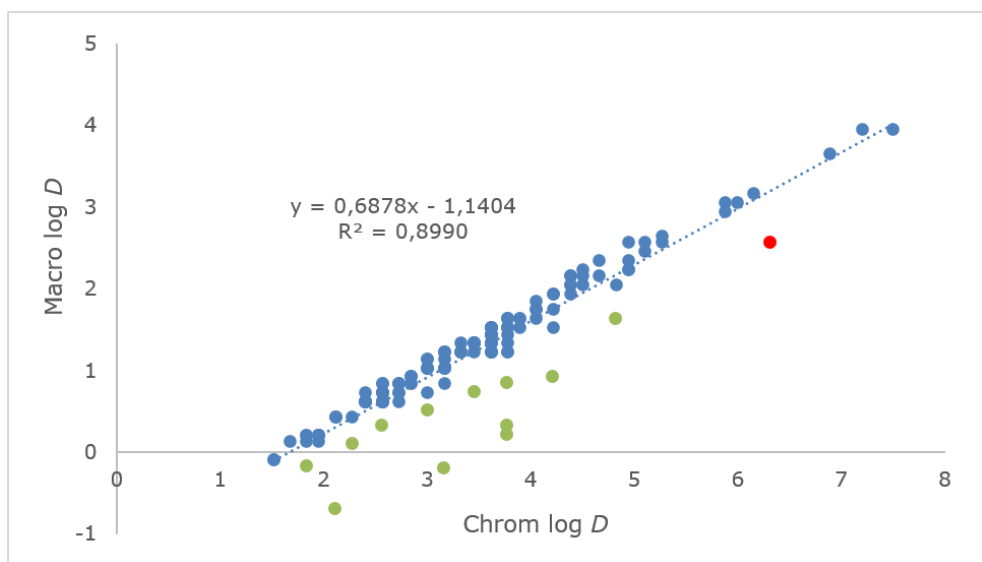


Slika 5.32 Korelacija između CAMDIS log D vrijednosti s Chrom log D vrijednostima dobivenima upotrebom CHI metode (plavo) te s Macro log D vrijednostima dobivenima upotrebom metode razvijene u ovom radu (crveno) za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.

Iz koeficijenata determinacije dobivenih korelacijom CAMDIS log D i Chrom log D vrijednosti ($R^2 = 0,6426$), odnosno Macro log D vrijednosti ($R^2 = 0,7367$) može se zaključiti da je bolja korelacija primijećena upotrebom Macro log D metode razvijena u ovom radu. Također, može se primijetiti da upotrebom CHI metode, Chrom log D vrijednosti pokazuju više apsolutne vrijednosti od CAMDIS log D vrijednosti i to u prosjeku za dvije logaritamske jedinice, što je već opisano u literaturi (38). Međutim, u slučaju Macro log D metode, pomak ne postoji jer je ovaj pokazatelj lipofilnosti sveden na istu skalu na kojoj je i log D dobiven metodom izmućkivanja.

Macro log D metoda ima velike prednosti u usporedbi s CHI metodom. Ona daje bolju korelaciju s referentnim CAMDIS log D vrijednostima i ima mogućnost profiliranja makrocikličkih spojeva velike strukturne raznolikosti što je primijećeno pri analizama proširene skupine makrocikličkih spojeva. Upotrebom Macro log D metode dobiju se uži kromatografski pikovi bolje simetrije, čime je olakšano jednoznačno i precizno određivanje maksimuma kromatografskog pika.

Kako bi se procijenilo slaganje Chrom log D i Macro log D vrijednosti za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva, može se promotriti korelacija ovih dvaju parametara lipofilnosti (Slika 5.33).



Slika 5.33 Korelacija između Chrom log D vrijednosti dobivenih upotrebom CHI metode s Macro log D vrijednostima dobivenima upotrebom metode razvijene u ovom radu za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.

Regresijska analiza ovih parametara pokazala je jako dobru korelaciju s $R^2 = 0,8990$. Pri tom je uočljiva skupina spojeva čije točke leže ispod regresijskog pravca (prikazana crvenom i zelenom bojom na grafu). Osim jedne iznimke (prikazan crvenom bojom na grafu), svi ostali spojevi koji odstupaju od regresijskog pravca (zeleno) su hidrofilnog karaktera. Za te spojeve je Macro log D vrijednost neočekivano niža od one koja bi se očekivala na temelju njihove Chrom log D vrijednosti. Ova pojava potječe najvjerojatnije od upotrjebljene kromatografske kolone, jer je u poglavlju 5.3.4 opisano kako XSelect CSH kromatografska kolona pokazuje bolju učinkovitost pri analizama makrocikličkih spojeva u usporedbi s Luna C18 kolonom. Iz ovih opažanja konačno se može zaključiti da je Macro log D metoda razvijena u ovom radu prikladnija za lipofilno profilirane makrocikličkih spojeva od CHI metode.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanje određivanja lipofilnosti makrocikličkih spojeva provedeno je u ovom radu proučavanjem više metoda za određivanje lipofilnosti. Pritom je ispitana primjenjivost literaturne kromatografske CHI metode kao i metode izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode za lipofilno profiliranje spojeva iz klase makrocikala. Također, proučen je utjecaj promjena u eksperimentalnim kromatografskim uvjetima na vremena zadržavanja te na oblik i simetriju kromatografskih pikova makrocikličkih spojeva. Razvijena je nova kromatografska metoda, nazvana Macro log D metoda, primjenjiva specifično za lipofilno profiliranje spojeva iz klase makrocikala.

Određivanje lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode provedeno je na 20 makrocikličkih spojeva početne skupine kako bi se dobile referentne log D vrijednosti za usporedbu s kromatografskim pokazateljima lipofilnosti. Za 15 spojeva početne skupine log D vrijednost je uspješno određena, dok se za njih pet nije mogla odrediti zbog ograničenja metode. Ista skupina spojeva je profilirana upotrebom literaturne CHI metode za kromatografsko određivanje lipofilnosti kako bi se provjerila primjenjivost metode za makrocikličke spojeve pri čemu su dobivene Chrom log D vrijednosti koje su pokazale dobru korelaciju s CAMDIS log D vrijednostima ($R^2 = 0,9436$). Međutim, pokazano je da primjena kromatografskih uvjeta pri upotrebi CHI metode za određivanje lipofilnosti nije u potpunosti primjenjiva za makrocikličke spojeve zbog značajne širine i asimetričnosti kromatografskih pikova, u nekim slučajevima do te mjere da je otežano očitavanje vremena zadržavanja. Stoga su se provela istraživanja za optimizaciju kromatografske metode za određivanje lipofilnosti prikladne za profiliranje makrocikličkih spojeva.

Istraživanjem utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja početne skupine makrocikličkih spojeva doneseni su sljedeći zaključci:

- I. Temperatura kromatografske kolone ne utječe značajno na vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva, odnosno povećanjem temperature njihovi relativni odnosi ostaju nepromijenjeni. Međutim, povišena temperatura omogućava povećanje učinkovitosti kromatografske analize makrocikličkih spojeva, što je značajno za makrocikličke spojeve koji imaju široke pikove prilikom profiliranja CHI metodom. Pritom se pri višoj temperaturi dobiju uži kromatografski pikovi bolje simetrije, što omogućava jednoznačno očitavanje vremena zadržavanja.
- II. Brzina gradijenta nema utjecaja na relativne odnose vremena zadržavanja, ali se apsolutne vrijednosti vremena zadržavanja svih spojeva povećavaju s povećanjem trajanja gradijentnog programa.
- III. Proučavanjem utjecaja protoka pokretne faze na vremena zadržavanja istraživanih spojeva nisu primijećene promjene u relativnim odnosima, međutim apsolutne vrijednosti su se povećanjem protoka pomaknule ka nižim vrijednostima.

- IV. Primjenom pet alternativnih kromatografskih kolona uočeno je kako upotreba kromatografskih kolona s većim porama (XTerra RP18 i XSelect CSH) dovodi do značajnog poboljšanja u simetriji kromatografskih pikova. Pritom je najbolji oblik kromatografskih pikova azitromicina i ciklosporina dobiven upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone pa je ova kolona odabrana za daljnja istraživanja. Pokazano je i kako se upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone dobiju nešto niže zadržavanje makrocikličkih spojeva uz nepromijenjene relativne odnose.
- V. Smanjenjem koncentracije otopine amonijevog acetata kao vodenog dijela pokretne faze dolazi do povećanja vrijednosti vremena zadržavanja za većinu makrocikličkih spojeva, dok ova promjena ne utječe na tek nekolicinu njih. Razlog tome je što smanjenje koncentracije amonijevog acetata dovodi do solvatacije analita, što je posebno izraženo za polarne spojeve s najkraćim vremenima zadržavanja, te one koji pripadaju klasi makrolida. Za iste spojeve je primijećeno da smanjenjem koncentracije dolazi i do značajnije asimetričnosti kromatografskih pikova, što je, osim navedenog efekta solvatacije, posljedica i jačih interakcija sa slobodnim silanolnim skupinama na površini punila kolone. Pritom je isti trend primijećen i na Luna C18 i na XSelect CSH kromatografskoj koloni, samo što je na drugoj značajno slabije izražen.
- VI. Zamjena amonijevog acetata s amonijevim hidrogenkarbonatom koji se upotrebljava za pripravu vodenog dijela pokretne faze uzrokovala je jačanje interakcija analita s nepokretnom fazom zbog čega su se vremena zadržavanja pomaknula prema višim vrijednostima za većinu spojeva. Uslijed smanjenja koncentracije amonijevog hidrogenkarbonata sa 50 mM na 10 mM dolazi do dodatnog povećanja u vremenima zadržavanja većine spojeva.
- VII. Zamjena acetonitrila metanolom kao organskog otapala koje se koristi u pokretnoj fazi uzorkovalo je značajne promjene u vremenima zadržavanja istraživanih spojeva. Upotrebom metanola dobile su se sustavno više vrijednosti vremena zadržavanja, a dolazi i do promjena u relativnim odnosima istih. Prilikom analiza upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi, dobiveni su uži pikovi bolje simetrije u usporedbi s upotrebom acetonitrila. Vrlo slični zaključci su izvedeni bilo da se koristi Luna C18 ili na XSelect CSH kromatografska kolona.

Na temelju koeficijenata determinacije dobivenih korelacijom CAMDIS log D vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva i njihovih vremena zadržavanja dobivenih primjenom različitih kombinacija nepokretnih i pokretnih faza zaključeno je da acetonitrilni gradijent uz amonijev acetat kao vodeni dio pokretne faze ima najjaču sposobnost predviđanja log D vrijednosti. Pritom je na temelju bolje širine i simetrije kromatografskih pikova zaključeno da je XSelect CSH pogodnija za analizu makrocikličkih spojeva od Luna

C18 kromatografske kolone. Što se tiče ostalih eksperimentalnih kromatografskih parametara, temperatura kromatografske kolone od 60 °C je odabrana kao optimalna jer pospješuje dobivanje uži kromatografskih pikova. Nadalje, gradijentni program u trajanju od 5 minuta, s tim da je početak programa podešen tako da se u početnim uvjetima koristi 5 % (V / V) udio organskog otapala u pokretnoj fazi, odabran je zbog produženja vijeka trajanja kromatografske kolone. Protok pokretne faze od 1 ml min⁻¹ je ostao isti kao kod CHI metode.

Koeficijent determinacije dobiven korelacijom između CAMDIS log *D* vrijednosti i vremena zadržavanja dobivenih upotrebom Macro log *D* metode za početnu skupinu makrocikličkih spojeva od $R^2 = 0,9079$ pokazuje vrlo dobru korelaciju između ova dva pokazatelja lipofilnosti. Uz to, upotrebom optimizirane metode dobiveni su uži pikovi bolje simetrije u usporedbi s pikovima dobivenima upotrebom CHI metode.

Kromatografska metoda razvijena u ovom radu primijenjena je za određivanje vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva te su istoj skupini određene log *D* vrijednosti upotrebom CAMDIS metode. Korelacijom ova dva pokazatelja lipofilnosti pokazana je vrlo dobra povezanost ($R^2 = 0,7389$) što ukazuje na mogućnost pouzdanog određivanja lipofilnosti makrocikličkih spojeva upotrebom optimizirane metode.

Odabrano je 6 molekula iz početne skupine makrocikličkih spojeva koje se mogu koristiti kao kalibracijski standardi Macro log *D* metode. Macro log *D* vrijednosti kalibracijskih standarda mogu se koristiti kao referentne vrijednosti za kalibraciju Macro log *D* metode prije svakog mjerenja lipofilnosti novih makrocikličkih spojeva. Upotrebom jednadžbe predložene u ovom radu za računanje Macro log *D* vrijednosti moguće je odrediti lipofilnost bilo kojeg novog makrocikličkog spoja.

Ubrzanje kromatografskog određivanja lipofilnosti makrocikličkih spojeva, ali i značajna ušteda upotrijebljenih materijala, postignuto je grupiranjem spojeva u skupine od tri člana. Pokazano je kako su vremena zadržavanja dobivena pri samostalnim analizama i analizama u skupinama od tri člana gotovo identična.

In silico clog *D* vrijednosti pokazale su se manje pouzdanima za predviđanje log *D* vrijednosti makrocikličkih spojeva ($R^2 = 0,5902$). Usporedba predviđanja log *D* vrijednosti upotrebom CHI metode i Macro log *D* metode pokazala je da je Macro log *D* metoda pouzdanija pri predviđanju log *D* vrijednosti makrocikala. Za kraj, korelacijom Chrom log *D* i Macro log *D* vrijednosti za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva pokazano je da su metode vrlo usporedive što se tiče predviđanja log *D* vrijednosti makrocikličkih spojeva, ali velika prednost Macro log *D* metode je što daje mogućnost provođenja efikasnijih analiza makrocikličkih spojeva.

7. LITERATURNI IZVORI

1. Sun D, Gao W, Hu H, Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?. *Acta Pharm Sin B*. 2022;12(7):3049–62.
2. Simoens S, Huys I. R&D Costs of New Medicines: A Landscape Analysis. *Front Med*. 2021;8:760–2.
3. Avdeef A, Testa B. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(10):1681–9.
4. Caron G, Ermondi G. Lipophilicity: Chemical Nature and Biological Relevance. In: Mannhold R, editor. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. 1st ed. Wiley; 2007. p. 313–29.
5. Arnott JA, Planey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov*. 2012;7(10):863–75.
6. Di L, Kerns EH. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7(3):402–8.
7. Hansch C, Dunn WJ. Linear Relationships between Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs. *J Pharm Sci*. 1972;61(1):1–19.
8. Liu X, Testa B, Fahr A. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharm Res*. 2011;28(5):962–77.
9. Kerns EH, Di L. Physicochemical profiling: overview of the screens. *Drug Discov Today Technol*. 2004;1(4):343–8.
10. Helen Chan O, Stewart BH. Physicochemical and drug-delivery considerations for oral drug bioavailability. *Drug Discov Today*. 1996;1(11):461–73.
11. Tute MS. Lipophilicity: A History. In: Pliška V, Testa B, Van De Waterbeemd H, editors. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. 1st ed. Wiley; 1996. p. 7–26.
12. Hidalgo-Rodríguez M, Fuguet E, Ràfols C, Rosés M. Estimation of Biological Properties by Means of Chromatographic Systems: Evaluation of the Factors That Contribute to the Variance of Biological–Chromatographic Correlations. *Anal Chem*. 2010;82(24):10236–45.
13. Nasal A, Siluk D, Kaliszan R. Chromatographic Retention Parameters in Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology. *Curr Med Chem*. 2003;10(5):381–426.
14. Valkó K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J Chromatogr A*. 2004;1037(1–2):299–310.
15. Liang C, Lian H zhen. Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal Chem*. 2015;68:28–36.
16. Soares JX, Santos Á, Fernandes C, Pinto MMM. Liquid Chromatography on the Different Methods for the Determination of Lipophilicity: An Essential Analytical Tool in Medicinal Chemistry. *Chemosensors*. 2022;10(8):340.
17. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method (https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-117-partition-coefficient-n-octanol-water-hplc-method_9789264069824-en).

18. Valeur E, Guéret SM, Adihou H, Gopalakrishnan R, Lemurell M, Waldmann H, et al. New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed.* 2017;56(35):10294–323.
19. Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery — an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(7):608–24.
20. Giordanetto F, Kihlberg J. Macrocyclic Drugs and Clinical Candidates: What Can Medicinal Chemists Learn from Their Properties? *J Med Chem.* 2014;57(2):278–95.
21. Alihodžić S, Bukvić M, Elenkov IJ, Hutinec A, Koštrun S, Pešić D, et al. Current Trends in Macrocyclic Drug Discovery and beyond -Ro5. In: *Progress in Medicinal Chemistry.* Elsevier; 2018. p. 113–233.
22. Valkó K, Bevan C, Reynolds D. Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to log P/log D. *Anal Chem.* 1997;69(11):2022–9.
23. Di L, Edward H. Kerns. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods.* Elsevier Science; 2010.
24. Di L, Kerns E, Carter G. *Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design.* *Curr Pharm Des.* 2009;15(19):2184–94.
25. Zhong HA. ADMET Properties: Overview and Current Topics. In: Grover A, editor. *Drug Design: Principles and Applications.* Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 113–33.
26. *Physico-chemical methods in drug discovery and development.* Zagreb: IAPC Publishing; 2012.
27. Gleeson MP, Hersey A, Montanari D, Overington J. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(3):197–208.
28. Hop CECA. Role of ADME Studies in Selecting Drug Candidates: Dependence of ADME Parameters on Physicochemical Properties. In: *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions.* 1st ed. Wiley; 2012. p. 1–43.
29. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):711–6.
30. Kerns E. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2003;8(7):316–23.
31. Kerns EH. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *J Pharm Sci.* 2001;90(11):1838–58.
32. Gold V. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book* (<https://goldbook.iupac.org/>).
33. Testa B, Carrupt P, Gaillard P, Billois F, Weber P. Lipophilicity in molecular modeling. *Pharm Res.* 1996;13(3):335–43.

34. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;23(1-3):3-25.
35. Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method (https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-107-partition-coefficient-n-octanol-water-shake-flask-method_9789264069626-en).
36. Manallack DT. The pK(a) Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect Med Chem.* 2007;1:25-38.
37. Hann MM, Keserü GM. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(5):355-65.
38. Young RJ, Green DVS, Luscombe CN, Hill AP. Getting physical in drug discovery II: the impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity. *Drug Discov Today.* 2011;16(17-18):822-30.
39. Øie S. Drug Distribution and Binding. *J Clin Pharmacol.* 1986;26(8):583-6.
40. Lázníček M, Lázníčková A. The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. *J Pharm Biomed Anal.* 1995;13(7):823-8.
41. Cardoso T, Almeida AS, Remião F, Fernandes C. Enantioresolution and Binding Affinity Studies on Human Serum Albumin: Recent Applications and Trends. *Chemosensors.* 2021;9(11):304.
42. Gleeson MP. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J Med Chem.* 2008;51(4):817-34.
43. Waring MJ. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2010;5(3):235-48.
44. Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(11):881-90.
45. Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, DeCrescenzo GA, Devraj RV, et al. Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(17):4872-5.
46. Stocks M. The small molecule drug discovery process – from target selection to candidate selection. In: *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development.* Elsevier; 2013. p. 81-126.
47. Hartmann T, Schmitt J. Lipophilicity – beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):431-9.
48. Pliška V, Testa B, Waterbeemd H van de, editors. *Lipophilicity in drug action and toxicology.* Weinheim ; New York: VCH; 1996. 438 p.
49. Tashima T. Carrier-Mediated Delivery of Low-Molecular-Weight N-Containing Drugs across the Blood-Brain Barrier or the Blood-Retinal Barrier Using the Proton-Coupled Organic Cation Antiporter. *Future Pharmacol.* 2023;3(4):742-62.
50. Faassen F. Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *Int J Pharm.* 2003;263(1-2):113-22.

51. Miller RR, Madeira M, Wood HB, Geissler WM, Raab CE, Martin IJ. Integrating the Impact of Lipophilicity on Potency and Pharmacokinetic Parameters Enables the Use of Diverse Chemical Space during Small Molecule Drug Optimization. *J Med Chem.* 2020;63(21):12156–70.
52. Kempieńska D, Chmiel T, Kot-Wasik A, Mróz A, Mazerska Z, Namieśnik J. State of the art and prospects of methods for determination of lipophilicity of chemical compounds. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019;113:54–73.
53. Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. Chichester ; New York: Wiley; 1997. 170 p.
54. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44(1):235–49.
55. Wenlock MC, Potter T, Barton P, Austin RP. A Method for Measuring the Lipophilicity of Compounds in Mixtures of 10. *SLAS Discov.* 2011;16(3):348–55.
56. Schmidt AB, Fine RM. Applicability of a continuum solvation model to the octanol water transfer: CFF91 based model for amino acids. *Biopolymers.* 1995;36(5):599–605.
57. Bodor N, Buchwald P. Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;36(2–3):229–54.
58. <https://www.quora.com/What-is-the-definition-of-phospholipid-bilayer>.
59. Andrés A, Rosés M, Ràfols C, Bosch E, Espinosa S, Segarra V, et al. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur J Pharm Sci.* 2015;76:181–91.
60. Dearden JC, Bresnen GM. The Measurement of Partition Coefficients. *Quant Struct-Act Relatsh.* 1988;7(3):133–44.
61. Román IP, Mastromichali A, Tyrovola K, Canals A, Psillakis E. Rapid determination of octanol–water partition coefficient using vortex-assisted liquid–liquid microextraction. *J Chromatogr A.* 2014;1330:1–5.
62. Godard T, Grushka E. The use of phospholipid modified column for the determination of lipophilic properties in high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2011;1218(9):1211–8.
63. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2007;31(1):79–96.
64. Yamashita T, Yamamoto E, Kushida I. Frozen water phase method for logD measurement using a 96-well plate. *Talanta.* 2011;84(3):809–13.
65. Dohta Y, Yamashita T, Horiike S, Nakamura T, Fukami T. A System for LogD Screening of 96-Well Plates Using a Water-Plug Aspiration/Injection Method Combined with High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2007;79(21):8312–5.
66. Hitzel L, Watt AP, Locker KL. An Increased Throughput Method for the Determination of Partition Coefficients. *Pharm Res.* 2000;17(11):1389–95.

67. Wilson D, Wang X, Walsh E, Rourick R. High Throughput Log D Determination Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2001;4(6):511-9.
68. Nishimura I, Hirano A, Yamashita T, Fukami T. Improvement of the high-speed logD assay using an injection marker for the water plug aspiration/injection method. *J Chromatogr A.* 2009;1216(15):2984-8.
69. Yang M, Terakawa E, Tanaka Y, Sotani T, Matsuo S. Solid-liquid phase equilibria in binary (1-octanol + n-alkane) mixtures under high pressure. *Fluid Phase Equilibria.* 2002;194-197:1119-29.
70. Cantwell FF, Mohammed HY. Photometric acid-base titrations in the presence of an immiscible solvent. *Anal Chem.* 1979;51(2):218-23.
71. Tomlinson E. Filter-Probe Extractor: A Tool for the Rapid Determination of Oil-Water Partition Coefficients. *J Pharm Sci.* 1982;71(5):602-4.
72. Faller B, Grimm HP, Loeuillet-Ritzler F, Arnold S, Briand X. High-Throughput Lipophilicity Measurement with Immobilized Artificial Membranes. *J Med Chem.* 2005;48(7):2571-6.
73. Wagner B, Fischer H, Kansy M, Seelig A, Assmus F. Carrier Mediated Distribution System (CAMDIS): A new approach for the measurement of octanol/water distribution coefficients. *Eur J Pharm Sci.* 2015;68:68-77.
74. Liang C, Han S ying, Qiao J qin, Lian H zhen, Ge X. Determination of the *n* - octanol/water partition coefficients of weakly ionizable basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography with neutral model compounds: Liquid Chromatography. *J Sep Sci.* 2014;37(22):3226-34.
75. Testa B, van de Waterbeemd, Han, Folkers, Gerd, Guy Richard, editors. *Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies.* Zürich: Verl. Helvetica Chimica Acta; 2001. 655 p.
76. Karger BL, Gant JR, Martkopf A, Weiner PH. Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1976;128(1):65-78.
77. Valko K, Du C, Bevan C, Reynolds D, Abraham M. Rapid Method for the Estimation of Octanol / Water Partition Coefficient (Log P_{oct}) from Gradient RP-HPLC Retention and a Hydrogen Bond Acidity Term (Sigma alpha_{2H}). *Curr Med Chem.* 2001;8(9):1137-46.
78. Eadsforth CV, Moser P. Assessment of reverse-phase chromatographic methods for determining partition coefficients. *Chemosphere.* 1983;12(11-12):1459-75.
79. Zhang L, Li Z, Huang R, Wang Q. Lipophilicity determination of *N*-(benzothiazol-2-yl)- α -amino alkyl phosphonic diesters by RP-HPLC and RP-HPTLC. *Chin J Chem.* 2000;18(6):872-6.
80. Terada H. Determination of Log P_{oct} by High-Performance Liquid Chromatography, and its Application in the Study of Quantitative Structure-Activity Relationships. *Quant Struct-Act Relatsh.* 1986;5(3):81-8.
81. Minick DJ, Frenz JH, Patrick MA, Brent DA. A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Med Chem.* 1988;31(10):1923-33.

82. Minick DJ, Brent DA, Frenz J. Modeling octanol–water partition coefficients by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1989;461:177–91.
83. Du CM, Valko K, Bevan C, Reynolds D, Abraham MH. Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient ($\log P_{\text{oct}}$) from isocratic RP-HPLC and a hydrogen bond acidity term (A). *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2001;24(5):635–49.
84. Valkó K. The role of chromatography in drug design. *TrAC Trends Anal Chem*. 1987;6(8):214–9.
85. Cserháti T, Valkó K. Chromatographic determination of molecular interactions: applications in biochemistry, chemistry, and biophysics. Boca Raton London: CRC Press; 1994. 341 p.
86. Valkó K, Snyder LR, Glajch JL. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. *J Chromatogr A*. 1993;656(1–2):501–20.
87. Hsieh MM, Dorsey JG. Accurate determination of $\log k'_{\text{w}}$ in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1993;631(1–2):63–78.
88. Poole SK, Poole CF. Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients. *J Chromatogr B*. 2003;797(1–2):3–19.
89. Katz E, editor. *Handbook of HPLC*. New York: M. Dekker; 1998. 989 p.
90. Valkó K, Slégel P. New chromatographic hydrophobicity index (φ_0) based on the slope and the intercept of the $\log k'$ versus organic phase concentration plot. *J Chromatogr A*. 1993;631(1–2):49–61.
91. Ashton DS, Beddell C, Ray AD, Valkó K. Quantitative structure-retention relationships of acyclovir esters using immobilised albumin high-performance liquid chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1995;707(2):367–72.
92. Du CM, Valko K, Bevan C, Reynolds D, Abraham MH. Rapid Gradient RP-HPLC Method for Lipophilicity Determination: A Solvation Equation Based Comparison with Isocratic Methods. *Anal Chem*. 1998;70(20):4228–34.
93. Valkó KL. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;130:35–54.
94. Wiczling P, Kawczak P, Nasal A, Kaliszan R. Simultaneous Determination of pK_{a} and Lipophilicity by Gradient RP HPLC. *Anal Chem*. 2006;78(1):239–49.
95. Markuszewski M, Wiczling P, Kaliszan R. High-throughput Evaluation of Lipophilicity and Acidity by New Gradient HPLC Methods. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2004;7(4):281–9.
96. Kubik Ł, Struck-Lewicka W, Kaliszan R, Wiczling P. Simultaneous determination of hydrophobicity and dissociation constant for a large set of compounds by gradient reverse phase high performance liquid chromatography–mass spectrometry technique. *J Chromatogr A*. 2015;1416:31–7.
97. Valko KL. Application of biomimetic HPLC to estimate *in vivo* behavior of early drug discovery compounds. *Future Drug Discov*. 2019;1(1):FDD11.

98. Valko K, Du CM, Bevan CD, Reynolds DP, Abraham MH. Rapid-Gradient HPLC Method for Measuring Drug Interactions with Immobilized Artificial Membrane: Comparison with Other Lipophilicity Measures. *J Pharm Sci.* 2000;89(8):1085–96.
99. Taillardat-Bertschinger A, Carrupt PA, Barbato F, Testa B. Immobilized Artificial Membrane HPLC in Drug Research. *J Med Chem.* 2003;46(5):655–65.
100. Noctor TAG, Diaz-Perez MJ, Wainer IW. Use of a Human Serum Albumin-Based Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography as a Tool for the Rapid Determination of Drug–Plasma Protein Binding. *J Pharm Sci.* 1993;82(6):675–6.
101. Buchholz L, Cai CH, Andress L, Cleton A, Brodfuehrer J, Cohen L. Evaluation of the human serum albumin column as a discovery screening tool for plasma protein binding. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15(2):209–15.
102. Valko K, Nunhuck S, Bevan C, Abraham MH, Reynolds DP. Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity. *J Pharm Sci.* 2003;92(11):2236–48.
103. Reinhard M, Drefahl A. Handbook for estimating physicochemical properties of organic compounds. New York: Wiley; 1999. 228 p.
104. Valkó K. Physicochemical and biomimetic properties in drug discovery: chromatographic techniques for lead optimization. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2014. 435 p.
105. Borchardt RT, Kerns EH, Lipinski CA, Thakker DR, Wang B, editors. Pharmaceutical profiling in drug discovery for lead selection. Arlington, Va: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004. 482 p.
106. Hansch C, Leo A, Hoekman DH, editors. Exploring QSAR. Fundamentals and applications in chemistry and biology. Hydrophobic, electronic and steric constants. Washington, DC: American Chemical Society; 1995. 2 p.
107. Mannhold R, Poda GI, Ostermann C, Tetko IV. Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of LogP Methods on more than 96,000 Compounds. *J Pharm Sci.* 2009;98(3):861–93.
108. Lombardo F, Shalaeva MY, Tupper KA, Gao F, Abraham MH. ElogP_{oct}: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. *J Med Chem.* 2000;43(15):2922–8.
109. Pinto P, Machado CM, Moreira J, Almeida JDP, Silva PMA, Henriques AC, et al. Chalcone derivatives targeting mitosis: synthesis, evaluation of antitumor activity and lipophilicity. *Eur J Med Chem.* 2019;184:111752.
110. Terrett NK. Methods for the synthesis of macrocycle libraries for drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2010;7(2):e97–104.
111. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(9):727–30.
112. Rask-Andersen M, Masuram S, Schiöth HB. The Druggable Genome: Evaluation of Drug Targets in Clinical Trials Suggests Major Shifts in Molecular Class and Indication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54(1):9–26.

113. Surade S, Blundell TL. Structural Biology and Drug Discovery of Difficult Targets: The Limits of Ligandability. *Chem Biol.* 2012;19(1):42–50.
114. Doak BC, Zheng J, Dobritzsch D, Kihlberg J. How Beyond Rule of 5 Drugs and Clinical Candidates Bind to Their Targets. *J Med Chem.* 2016;59(6):2312–27.
115. Villar EA, Beglov D, Chennamadhavuni S, Porco JA, Kozakov D, Vajda S, et al. How proteins bind macrocycles. *Nat Chem Biol.* 2014;10(9):723–31.
116. Perola E, Herman L, Weiss J. Development of a Rule-Based Method for the Assessment of Protein Druggability. *J Chem Inf Model.* 2012;52(4):1027–38.
117. Garcia Jimenez D, Poongavanam V, Kihlberg J. Macrocycles in Drug Discovery—Learning from the Past for the Future. *J Med Chem.* 2023;66(8):5377–96.
118. Matsson P, Doak BC, Over B, Kihlberg J. Cell permeability beyond the rule of 5. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;101:42–61.
119. Marsault E, Peterson ML. Macrocycles Are Great Cycles: Applications, Opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *J Med Chem.* 2011;54(7):1961–2004.
120. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem.* 2002;45(12):2615–23.
121. Yudin AK. Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chem Sci.* 2015;6(1):30–49.
122. Mallinson J, Collins I. Macrocycles in new drug discovery. *Future Med Chem.* 2012;4(11):1409–38.
123. Alehashem MS, Ariffin AB, Savage PB, Yehya Dabdawb WA, Thomas NF. Treasures old and new: what we can learn regarding the macrocyclic problem from past and present efforts in natural product total synthesis. *RSC Adv.* 2020;10(19):10989–1012.
124. Mortensen KT, Osberger TJ, King TA, Sore HF, Spring DR. Strategies for the Diversity-Oriented Synthesis of Macrocycles. *Chem Rev.* 2019;119(17):10288–317.
125. Fajdetić A, Matanović Škugor M, Jivkov Elenkov I, Kragol G, Bukvić M, Marušić Ištuk Z, et al. Seco macrolide compounds. WO2017194452A1, 2021.
126. Danelius E, Poongavanam V, Peintner S, Wieske LHE, Erdélyi M, Kihlberg J. Solution Conformations Explain the Chameleonic Behaviour of Macrocyclic Drugs. *Chem – Eur J.* 2020;26(23):5231–44.
127. Whitty A, Zhong M, Viarengo L, Beglov D, Hall DR, Vajda S. Quantifying the chameleonic properties of macrocycles and other high-molecular-weight drugs. *Drug Discov Today.* 2016;21(5):712–7.
128. Marjanović N, Čikoš A, Koštrun S. A new screening tool to determine chameleonic properties of macrocycles. *J Mol Struct.* 2019;1198:1269–29.
129. Corbett KM, Ford L, Warren DB, Pouton CW, Chalmers DK. Cyclosporin Structure and Permeability: From A to Z and Beyond. *J Med Chem.* 2021;64(18):13131–51.

130. Wang CK, Swedberg JE, Harvey PJ, Kaas Q, Craik DJ. Conformational Flexibility Is a Determinant of Permeability for Cyclosporin. *J Phys Chem B*. 2018;122(8):2261–76.
131. Witek J, Keller BG, Blatter M, Meissner A, Wagner T, Riniker S. Kinetic Models of Cyclosporin A in Polar and Apolar Environments Reveal Multiple Congruent Conformational States. *J Chem Inf Model*. 2016;56(8):1547–62.
132. Rossi Sebastiano M, Doak BC, Backlund M, Poongavanam V, Over B, Ermondi G, et al. Impact of Dynamically Exposed Polarity on Permeability and Solubility of Chameleonic Drugs Beyond the Rule of 5. *J Med Chem*. 2018;61(9):4189–202.
133. Bhardwaj G, O'Connor J, Rettie S, Huang YH, Ramelot TA, Mulligan VK, et al. Accurate de novo design of membrane-traversing macrocycles. *Cell*. 2022;185(19):3520–32.
134. Tyagi M, Poongavanam V, Lindhagen M, Pettersen A, Sjö P, Schiesser S, et al. Toward the Design of Molecular Chameleons: Flexible Shielding of an Amide Bond Enhances Macrocycle Cell Permeability. *Org Lett*. 2018;20(18):5737–42.
135. Garcia Jimenez D, Vallaro M, Rossi Sebastiano M, Apprato G, D'Agostini G, Rossetti P, et al. Chamelogk: A Chromatographic Chameleonicity Quantifier to Design Orally Bioavailable Beyond-Rule-of-5 Drugs. *J Med Chem*. 2023;66(15):10681–93.
136. Ermondi G, Jimenez DG, Rossi Sebastiano M, Kihlberg J, Caron G. Conformational Sampling Deciphers the Chameleonic Properties of a VHL-Based Degradator. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):272.
137. Sethio D, Poongavanam V, Xiong R, Tyagi M, Duy Vo D, Lindh R, et al. Simulation Reveals the Chameleonic Behavior of Macrocycles. *J Chem Inf Model*. 2023;63(1):138–46.
138. Bogdan AR, Davies NL, James K. Comparison of diffusion coefficients for matched pairs of macrocyclic and linear molecules over a drug-like molecular weight range. *Org Biomol Chem*. 2011;9(22):7727–33.
139. Doak BC, Over B, Giordanetto F, Kihlberg J. Oral Druggable Space beyond the Rule of 5: Insights from Drugs and Clinical Candidates. *Chem Biol*. 2014;21(9):1115–42.
140. White AM, Craik DJ. Discovery and optimization of peptide macrocycles. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(12):1151–63.
141. Arkin MR, Tang Y, Wells JA. Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality. *Chem Biol*. 2014;21(9):1102–14.
142. Furukawa A, Schwochert J, Pye CR, Asano D, Edmondson QD, Turmon AC, et al. Drug-Like Properties in Macrocycles above MW 1000: Backbone Rigidity versus Side-Chain Lipophilicity. *Angew Chem Int Ed*. 2020;59(48):21571–7.
143. Nožinić D, Milić A, Mikac L, Ralić J, Padovan J. Assessment of macrolide transport using PAMPA, Caco-2 and MDCKII-hMDR1 assays. *Croat Chem Acta CCAchempmfhr Vol83 No3*. 2010;83.
144. Milić A, Mihaljević VB, Ralić J, Bokulić A, Nožinić D, Tavčar B, et al. A comparison of in vitro ADME properties and pharmacokinetics of azithromycin and selected 15-membered ring macrolides in rodents. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;39(4):263–76.

145. Kiki-Mvouaka S, Ménez C, Borin C, Lyazrhi F, Foucaud-Vignault M, Dupuy J, et al. Role of P-Glycoprotein in the Disposition of Macrocyclic Lactones: A Comparison between Ivermectin, Eprinomectin, and Moxidectin in Mice. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(4):573–80.
146. Bockus AT, Lexa KW, Pye CR, Kalgutkar AS, Gardner JW, Hund KCR, et al. Probing the Physicochemical Boundaries of Cell Permeability and Oral Bioavailability in Lipophilic Macrocycles Inspired by Natural Products. *J Med Chem.* 2015;58(11):4581–9.
147. Naylor MR, Ly AM, Handford MJ, Ramos DP, Pye CR, Furukawa A, et al. Lipophilic Permeability Efficiency Reconciles the Opposing Roles of Lipophilicity in Membrane Permeability and Aqueous Solubility. *J Med Chem.* 2018;61(24):11169–82.
148. Faris JH, Adaligil E, Popovych N, Ono S, Takahashi M, Nguyen H, et al. Membrane Permeability in a Large Macrocyclic Peptide Driven by a Saddle-Shaped Conformation. *J Am Chem Soc.* 2024;146(7):4582–91.
149. Guimarães CRW, Mathiowetz AM, Shalaeva M, Goetz G, Liras S. Use of 3D Properties to Characterize Beyond Rule-of-5 Property Space for Passive Permeation. *J Chem Inf Model.* 2012;52(4):882–90.
150. Bonnet P, Agrafiotis DK, Zhu F, Martin E. Conformational Analysis of Macrocycles: Finding What Common Search Methods Miss. *J Chem Inf Model.* 2009;49(10):2242–59.
151. Valko KL, Ivanova-Berndt G, Beswick P, Kindey M, Ko D. Application of biomimetic HPLC to estimate lipophilicity, protein and phospholipid binding of potential peptide therapeutics. *ADMET DMPK.* 2018;6(2):162–75.
152. Schrödinger Release 2017. 4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY,. 2017.
153. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des.* 2004;18(3):167–73.
154. Goetz GH, Shalaeva M. Leveraging chromatography based physicochemical properties for efficient drug design. *ADMET DMPK.* 2018;6(2):85–104.
155. Pye CR, Hewitt WM, Schwochert J, Haddad TD, Townsend CE, Etienne L, et al. Nonclassical Size Dependence of Permeation Defines Bounds for Passive Adsorption of Large Drug Molecules. *J Med Chem.* 2017;60(5):1665–72.
156. Rand AC, Leung SSF, Eng H, Rotter CJ, Sharma R, Kalgutkar AS, et al. Optimizing PK properties of cyclic peptides: the effect of side chain substitutions on permeability and clearance. *MedChemComm.* 2012;3(10):1282–9.
157. Morikawa G, Suzuka C, Shoji A, Shibusawa Y, Yanagida A. High-throughput determination of octanol/water partition coefficients using a shake-flask method and novel two-phase solvent system. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;117:338–44.
158. Gulaboski R, Scholz F. Lipophilicity of Peptide Anions: An Experimental Data Set for Lipophilicity Calculations. *J Phys Chem B.* 2003;107(23):5650–7.
159. Katz D, Fike K, Longenberger J, Placko S, Philippe-Venec L, Chervenak A. AlphaLogD determination: An optimized Reversed-Phase Liquid Chromatography method to

- measure lipophilicity on neutral and basic small and Beyond-Rule-of-Five compounds. *J Chromatogr A*. 2022;1674:463146.
160. Lombardo et al. - 2001 - ElogD o ct A Tool for Lipo.pdf.
 161. Ermondi G, Vallaro M, Goetz G, Shalaeva M, Caron G. Experimental lipophilicity for beyond Rule of 5 compounds. *Future Drug Discov*. 2019;1(1):FDD10.
 162. Wang CK, Northfield SE, Swedberg JE, Colless B, Chaousis S, Price DA, et al. Exploring experimental and computational markers of cyclic peptides: Charting islands of permeability. *Eur J Med Chem*. 2015;97:202–13.
 163. Essaid D, Chaminade P, Maillard Ph, Kasselouri A. Lipophilicity of porphyrins and their retention in IAM, C8–C18 and HILIC chromatographic systems. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;114:227–40.
 164. Stepanić V, Žihor D, Gabelica-Marković V, Jelić D, Nunhuck S, Valko K, et al. Physicochemical profile of macrolides and their comparison with small molecules. *Eur J Med Chem*. 2012;47:462–72.
 165. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. Macrolides, Ketolides, and Glycylcyclines: Azithromycin, Clarithromycin, Telithromycin, Tigecycline. *Infect Dis Clin North Am*. 2009;23(4):997–1026.
 166. Stepanić V, Koštrun S, Malnar I, Hlevnjak M, Butković K, Čaleta I, et al. Modeling Cellular Pharmacokinetics of 14- and 15-Membered Macrolides with Physicochemical Properties. *J Med Chem*. 2011;54(3):719–33.
 167. Bocian S, Buszewski B. Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC – a contribution for a better understanding. *J Sep Sci*. 2012;35(10–11):1191–200.
 168. Gritti F, Guiochon G. Effect of the pH and the ionic strength on overloaded band profiles of weak bases onto neutral and charged surface hybrid stationary phases in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2013;1282:113–26.
 169. Guillarme D, Heinisch S, Rocca JL. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004;1052(1–2):39–51.
 170. D. Antia F, Horváth C. High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for the rapid separation of large molecules. *J Chromatogr A*. 1988;435:1–15.
 171. <http://phenomenex.belvr.by/docs/11-Luna.pdf>.
 172. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003928en.pdf>.
 173. https://www.waters.com/waters/en_US/XSelect-Columns/nav.htm?cid=10165804&locale=en_US.
 174. Kazakevich Y, LoBrutto R, editors. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2007. 1104 p.
 175. Calabuig-Hernández S, García-Alvarez-Coque MC, Ruiz-Angel MJ. Performance of amines as silanol suppressors in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2016;1465:98–106.

176. Lide DR, Baysinger G, Chemistry S, Berger LI, Goldberg RN, Kehiaian HV. CRC Handbook of Chemistry and Physics. :2661.
177. Konermann L. Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH "Buffer" for Native Electrospray Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2017 Sep;28(9):1827–35.
178. Iavarone AT, Udekwu OA, Williams ER. Buffer Loading for Counteracting Metal Salt-Induced Signal Suppression in Electrospray Ionization. :7.
179. Shieh IF, Lee CY, Shiea J. Eliminating the Interferences from TRIS Buffer and SDS in Protein Analysis by Fused-Droplet Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 2005 Apr;4(2):606–12.
180. McCalley DV. Comparison of peak shapes obtained with volatile (mass spectrometry-compatible) buffers and conventional buffers in reversed-phase high-performance liquid chromatography of bases on particulate and monolithic columns. *J Chromatogr A.* 2003;987(1–2):17–28.
181. Hedges JB, Vahidi S, Yue X, Konermann L. Effects of Ammonium Bicarbonate on the Electrospray Mass Spectra of Proteins: Evidence for Bubble-Induced Unfolding. *Anal Chem.* 2013;85(13):6469–76.
182. Espada A, Rivera-Sagredo A. Ammonium hydrogencarbonate, an excellent buffer for the analysis of basic drugs by liquid chromatography–mass spectrometry at high pH. *J Chromatogr A.* 2003;987(1–2):211–20.
183. Neue UD, Méndez A. Selectivity in reversed-phase separations: General influence of solvent type and mobile phase pH. *J Sep Sci.* 2007 May;30(7):949–63.
184. Du CM, Valko K, Bevan C, Reynolds D, Abraham MH. Characterizing the Selectivity of Stationary Phases and Organic Modifiers in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Systems by a General Solvation Equation Using Gradient Elution. *J Chromatogr Sci.* 2000;38(11):503–11.
185. Henchoz Y, Guillarme D, Martel S, Rudaz S, Veuthey JL, Carrupt PA. Fast log *P* determination by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with UV and mass spectrometry detections. *Anal Bioanal Chem.* 2009;394(7):1919–30.
186. Dross K, Rekker RF, De Vries G, Mannhold R. The lipophilic behaviour of organic compounds: 3. The search for interconnections between reversed-phase chromatographic data and log *P* _{oct} values. *Quant Struct-Act Relatsh.* 1998;17(06):549–57.

8. DODACI

8.1. Popis slika

Slika 2.1 Shema raspodjele spoja između organske i vodene faze.	8
Slika 2.2 Usporedba n-oktanola i fosfolipidnog dvosloja. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (58).	13
Slika 2.3 Shematski prikaz distribucijskog sustava uz pomoć nosača.	15
Slika 2.4 Shematski prikaz eksperimentalne postavke za provedbu CAMDIS eksperimenta.	16
Slika 2.5 Oktadecil (C18) nepokretna faza vezana na silikagel. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (16).	18
Slika 2.6 Ovisnost izokratnog indeksa lipofilnosti log k o volumnom udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi ϕ za strukturno različite spojeve.....	19
Slika 2.7 Ovisnost log D vrijednosti dobivene metodom izmućkivanja o Chrom log D vrijednosti. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (38).	24
Slika 2.8 Kategorizacija spojeva ovisno o njihovom kiselobaznom karakteru pomoću CHI vrijednosti ovisno o pH vrijednosti puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (105).	25
Slika 2.9 Korelacija literaturnih i izračunatih log $D_{7,40}$ vrijednosti (koristeći Prolog D računalni program) za 70 komercijalnih lijekova. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (24).	27
Slika 2.10 Usporedba strukturnih karakteristika i farmakoloških meta koje su podložne modulaciji za male molekule, makrocikličke spojeve i biomolekule. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (110). ..	29
Slika 2.11 Broj makrocikličkih spojeva ovisno o godini odobrenja od FDA; A) Raspodjela prema načinu primjene; B) Raspodjela prema porijeklu. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (117).	30
Slika 2.12 FideltaMacro™ platforma. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (21).	32
Slika 2.13 Kameleonski makrociklički spoj s prikazanim konformacijama dominantnim u A) vodenom mediju (bioaktivna konformacija) i u B) biološkoj membrani (konformacija s intramolekulskim vodikovim vezama). Preuzeto i prilagođeno prema izvoru (128).	33
Slika 5.1 Usporedba CAMDIS log D (plavi stupci) i Chrom log D (crveni stupci) vrijednosti za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.	79
Slika 5.2 Korelacija između CAMDIS log D i Chrom log D vrijednosti za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.	79
Slika 5.3 Kromatogrami malih molekula A) STD_4 – kolhicina i B) STD_5 – 8-fenilteofilina te makrocikličkih spojeva C) MAC_10 – azitromicina i D) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom CHI metode.	81
Slika 5.4 Usporedba vremena zadržavanja A) malih molekula i B) makrocikličkih spojeva s pri temperaturama kromatografske kolone od 40 °C (crveni stupci), 50 °C (zeleni stupci) i 60 °C (ljubičasti stupci) s vrijednostima pri temperaturi od 25 °C (plavi stupci).	84
Slika 5.5 Usporedba vremena zadržavanja A) malih molekula i B) makrocikličkih spojeva primjenom dvominutnog (plavo), petominutnog (crveno) i sedmominutnog (zeleno) gradijenta s vrijednostima pri trominutnim gradijentom.	85
Slika 5.6 Usporedba vremena zadržavanja A) malih molekula i B) makrocikličkih spojeva pri protocima pokretne faze od 0,5 ml min ⁻¹ (plavo), 1,5 ml min ⁻¹ (crveno) te 2 ml min ⁻¹ (zeleno) s vrijednostima pri protoku od 1 ml min ⁻¹	86
Slika 5.7 Prikaz kromatografskih pikova MAC_10 – azitromicina primjenom A) Luna C18, B) Luna HST, C) XTerra RP18, D) Atlantis dC18, E) XBridge BEH i F) XSelect CSH kromatografskih kolona.	88
Slika 5.8 Prikaz kromatografskih pikova MAC_20 – ciklosporina primjenom A) Luna C18, B) Luna HST, C) XTerra RP18, D) Atlantis dC18, E) XBridge BEH i F) XSelect CSH kromatografskih kolona.	89

Slika 5.9 Usporedba vremena zadržavanja malih molekula (crveno) i makrocikličkih spojeva (plavo) dobivenih upotrebom XSelect CSH kromatografske kolone s vremenima zadržavanja dobivenim upotrebom Luna C18 kromatografske kolone.	91
Slika 5.10 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 5 mM (plavi stupci), 10 mM (crveni stupci), 30 mM (zeleni stupci), 50 mM (ljubičasti stupci) i 70 mM (žuti stupci) kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na Luna C18 kromatografskoj koloni.	92
Slika 5.11 Kromatografski pikovi MAC_10 – azitromicina dobiveni upotrebom amonijevog acetata koncentracije A) 10 mM, B) 30 mM, C) 50 mM i D) 70 mM kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na Luna C18 kromatografskoj koloni.	94
Slika 5.12 Kromatografski pikovi MAC_13 – azahomoeritromicina dobiveni upotrebom amonijevog acetata koncentracije A) 10 mM i B) 70 mM kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na Luna C18 kromatografskoj koloni.	95
Slika 5.13 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 5 mM (plavi stupci), 10 mM (crveni stupci), 30 mM (zeleni stupci), 50 mM (ljubičasti stupci) i 70 mM (žuti stupci) kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni.	96
Slika 5.14 Kromatografski pikovi MAC_10 – azitromicina dobiveni upotrebom amonijevog acetata koncentracije A) 5 mM, B) 10 mM, C) 30 mM, D) 50 mM i E) 70 mM amonijevog acetata kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni.	97
Slika 5.15 Kromatografski pikovi MAC_13 – azahomoeritromicin dobiveni upotrebom A) 5 mM i B) 70 mM amonijevog acetata kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect kromatografskoj koloni.	98
Slika 5.16 Vremena zadržavanja spojeva A) MAC_16 – josamicina i B) MAC_19 – midekamicina upotrebom amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze u rasponu od 35 sati.	100
Slika 5.17 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM (plavi stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM (crveni stupci) odnosno 10 mM (zeleni stupci) kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze upotrebom Luna C18 kromatografske kolone (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat).	101
Slika 5.18 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM (plavi stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM (crveni stupci) i 10 mM (zeleni stupci) kao puferne otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat).	103
Slika 5.19 Usporedba vremena zadržavanja malih molekula dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na Luna C18 kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).	105
Slika 5.20 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva početne skupine dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na Luna C18 kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).	106
Slika 5.21 Kromatografski pikovi A) MAC_8 – takrolimusa i B) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom acetonitrila te C) MAC_8 – takrolimusa i D) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi na Luna C18 kromatografskoj koloni.	107

Slika 5.22 Usporedba vremena zadržavanja malih molekula dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na XSelect CSH kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).	108
Slika 5.23 Usporedba vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila (plavi stupci), amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola (crveni stupci), amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola (zeleni stupci) te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola (ljubičasti stupci) na XSelect CSH kromatografskoj koloni (AA – amonijev acetat, AH – amonijev hidrogenkarbonat, ACN – acetonitril, MeOH – metanol).	109
Slika 5.24 Kromatografski pikovi A) MAC_8 – takrolimusa i B) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom acetonitrila te C) MAC_8 – takrolimusa i D) MAC_20 – ciklosporina dobiveni upotrebom metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi na XSelect CSH kromatografskoj koloni.	110
Slika 5.25 Korelacija između CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja dobivenih upotrebom Macro log D metode za početnu skupinu makrocikličkih spojeva.	116
Slika 5.26 Korelacija između CAMDIS log D vrijednosti i vremena zadržavanja dobivenih upotrebom Macro log D metode za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.	117
Slika 5.27 Tipičan kromatogram kalibracijske smjese dobiven upotrebom Macro log D kromatografske metode.	119
Slika 5.28 Kromatogrami dobiveni iz TIC kromatograma odabirom odgovarajuće m/z vrijednosti koja odgovara ionu odabranog standarda.	120
Slika 5.29 Tipičan kalibracijski pravac s jednadžbom za kromatografsko određivanje lipofilnosti makrocikličkih spojeva dobiven upotrebom Macro log D metode.	121
Slika 5.30 Korelacija između vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva dobivenih upotrebom Macro log D metode analiziranih samostalno i u skupinama od tri člana.	122
Slika 5.31 Korelacija između CAMDIS log D i clog D _{7,40} vrijednosti za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.	123
Slika 5.32 Korelacija između CAMDIS log D vrijednosti s Chrom log D vrijednostima dobivenima upotrebom CHI metode (plavo) te s Macro log D vrijednostima dobivenima upotrebom metode razvijene u ovom radu (crveno) za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.	124
Slika 5.33 Korelacija između Chrom log D vrijednosti dobivenih upotrebom CHI metode s Macro log D vrijednostima dobivenima upotrebom metode razvijene u ovom radu za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva.	125

8.2. Popis tablica

Tablica 2.1 Ovisnost fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava o log D _{7,40} vrijednosti spoja.	11
Tablica 2.2 Usporedba dopuštenih vrijednosti molekulskih deskriptora za oralnu bioraspoloživost malih i makrocikličkih molekula (34,120,139).	34
Tablica 4.1 Početna skupina makrocikličkih spojeva.	46
Tablica 4.2 Gradijent pokretne faze za analizu istraživanih i kontrolnih spojeva te vanjskog standarda iz CAMDIS pokusa	66
Tablica 4.3 Gradijent pokretne faze za kromatografsko određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode.	68

Tablica 4.4 Kalibracijski standardi i njihovi kromatografski indeksi hidrofobnosti CHI pri pH 7,40 koji se koriste za kalibraciju RP-HPLC sustava upotrebom CHI metode za određivanje lipofilnosti.	69
Tablica 4.5 Gradijenti pokretne faze za istraživanje utjecaja odabrane kromatografske kolona na vrijeme zadržavanja istraživanih spojeva.....	71
Tablica 5.1 CAMDIS log D vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva.....	76
Tablica 5.2 Vremena zadržavanja, CHI te Chrom log D vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva dobivene upotrebom CHI metode.	78
Tablica 5.3 Koeficijenti determinacije linearne regresije, R^2 , dobiveni korelacijom CAMDIS log D vrijednosti početne skupine makrocikličkih spojeva i njihovih vremena zadržavanja dobivenih primjenom različitih kombinacija nepokretnih i pokretnih faza.....	112
Tablica 5.4 Optimalni kromatografski uvjeti za lipofilno profiliranje makrocikličkih spojeva – Macro log D kromatografska metoda.....	115
Tablica 5.5 Odabrani makrociklički standardi za kalibraciju kromatografskog sustava za određivanje lipofilnosti upotrebom Macro log D metode, njihova tipična vremena zadržavanja i Macro log D vrijednosti.....	120

8.3. Popis jednadžbi

Jednadžba 2.1 Logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele.	8
Jednadžba 2.2 Logaritamska vrijednost koeficijenta distribucije.	9
Jednadžba 2.3 Računanje faktora zadržavanja, k	18
Jednadžba 2.4 Ovisnost logaritamske vrijednosti izokratnog indeksa lipofilnosti log k o volumnom udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi.	20
Jednadžba 2.5 Ovisnost logaritamske vrijednosti koeficijenta raspodjele log P o nagibu S i polikratnom indeksu lipofilnosti log k_w	20
Jednadžba 2.6 Računanje izokratnog indeksa hidrofobnosti ϕ_0	21
Jednadžba 2.7 Kalibracijska jednadžba za računanje CHI vrijednosti.....	22
Jednadžba 2.8 Računanje Chrom log D vrijednosti.....	23
Jednadžba 4.1 Računanje log D vrijednosti upotrebom CAMDIS metode.....	67
Jednadžba 4.2 Računanje afiniteta spoja za plastiku upotrebom CAMDIS metode.....	67
Jednadžba 5.1 Računanje Macro log D vrijednosti.....	121

8.4. Popis oznaka, simbola i kratica

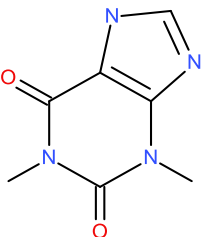
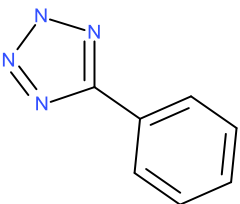
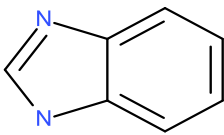
AA	amonijev acetat
ACN	acetonitril
ADME	apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (engl. <i>absorption, distribution, metabolism, and excretion</i>)
AGP	α -1-kiseli glikoprotein (engl. <i>α-1-acid glycoprotein</i>)
AH	amonijev hidrogenkarbonat
BEH	hibrid s etilenskim premoštenjima (engl. <i>ethylene bridged hybrid</i>)

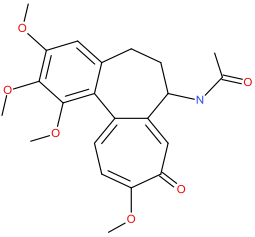
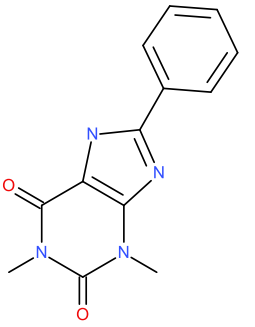
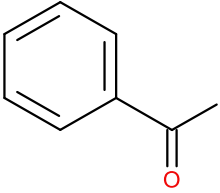
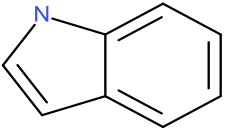
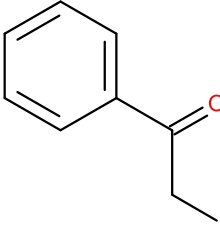
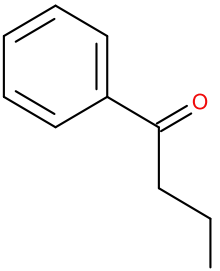
bRo5	izvan Lipinskijevih pet pravila (engl. <i>beyond rule-of-5</i>)
CAMDIS	distribucijski sustav uz pomoć nosača (engl. <i>carrier mediated distribution system</i>)
CAMDIS log <i>D</i>	log <i>D</i> vrijednost dobivena upotrebom CAMDIS metode
CE	kolizijska energija (engl. <i>collision energy</i>)
CHI	kromatografski indeks hidrofobnosti (engl. <i>chromatographic hydrophobicity index</i>)
Chrom log <i>D</i>	kromatografski pokazatelj lipofilnosti dobiven upotrebom CHI metode
CPD	spoj (engl. <i>compound</i>)
CSH	hibridna nabijena površina (eng. <i>charged surface hybrid</i>)
Da	Dalton
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>diode array detector</i>)
DIFI	difuzija i filtracija (engl. <i>diffusion-filtration</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
DP	potencijal deklasteriranja (engl. <i>declustering potential</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
GPCR	receptor spregnut s G-proteinom (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrom masa (engl. <i>high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer</i>)
HSA	ljudski serumski albumin (engl. <i>human serum albumin</i>)
HST	tehnologija visoke brzine (engl. <i>high speed technology</i>)
IAM	imobilizirana umjetna membrana (engl. <i>immobilized artificial membrane</i>)
log <i>D</i>	logaritamska vrijednost koeficijenta distribucije (engl. <i>distribution coefficient</i>)
log <i>D</i> _{7,40}	logaritamska vrijednost koeficijenta distribucije pri pH vrijednosti od 7,40
log <i>k</i>	logaritamska vrijednost faktora zadržavanja, izokratni indeks lipofilnosti
log <i>k</i> _w	faktor zadržavanja pri 100 % vodene otopine u pokretnoj fazi, polikratni indeks lipofilnosti
log <i>P</i>	logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele (engl. <i>partition coefficient</i>)
M	mol l ⁻¹
m/z	omjera mase i naboja (engl. <i>mass-to-charge ratio</i>)

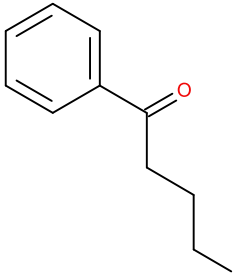
MAC	makrociklički spoj
MeOH	metanol
mM	10^{-3} mol l ⁻¹
MRM	tehnika snimanja višestrukih reakcija (engl. <i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	spektrometrija masa (engl. <i>mass spectrometry</i>)
M _w	molekulska masa (engl. <i>molecular weight</i>)
OECD	Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. <i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>)
P-gp	P-glikoprotein (engl. <i>P-glycoprotein</i>)
PAMPA	test permeabilnosti upotrebom paralelne umjetne membrane (engl. <i>parallel artificial membrane permeability assay</i>)
pK _a	negativni bazni logaritam 10 konstante disocijacije kiseline (K _a) otopine
PSA	polarna površina molekule (engl. <i>polar surface area</i>)
PTFE	politetrafluoretilen
PVDF	poliviniliden fluorid
QSAR	kvantitativni odnos strukture i aktivnosti spoja (engl. <i>quantitative structure-activity relationship</i>)
QSPR	kvantitativni odnos strukture i svojstva spoja (engl. <i>quantitative structure-property relationship</i>)
R ²	koeficijent determinacije
Ro5	Lipinskijevih pet pravila (engl. <i>rule of five</i>)
RP-HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza (engl. <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>)
RP-HPLC-DAD-MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza s detektorom s nizom dioda u sprezi sa spektrometrom masa (engl. <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detector coupled with mass spectrometer</i>)
rpm	okretaji po minuti (engl. <i>revolutions per minute</i>)
STD	standard
t ₀	vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja (engl. <i>dead retention time</i>)
t _R	vrijeme zadržavanja analita
TIC	ukupna ionska struja (engl. <i>total-ion current</i>)
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (engl. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)

UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>ultra-performance liquid chromatography</i>)
UPLC-MS/MS	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti u sprezi sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom (engl. <i>ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>)
USP	Farmakopeja Sjedinjenih Država (eng. <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV/Vis	ultraljubičasti / vidljivi dio spektra (engl. <i>ultraviolet / visible light</i>)
V / V	volumna koncentracija
ϵ_r	relativna dielektrična permitivnost
φ	volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi
φ_0	izokratni indeks hidrofobnosti

8.5. Kalibracijski standardi koji se koriste za kalibraciju RP-HPLC sustava za određivanje lipofilnosti upotrebom CHI metode

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Molekulska formula	M _w / g mol ⁻¹	Donori vodikovih veza ^a	Akceptori vodikovih veza ^a
STD_1	Teofilin		C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,16	1	6
STD_2	5-Feniltetrazol		C ₇ H ₆ N ₄	146,15	1	4
STD_3	Benzimidazol		C ₇ H ₆ N ₂	118,14	1	2

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Molekulska formula	M _w / g mol ⁻¹	Donori vodikovih veza ^a	Akceptori vodikovih veza ^a
STD_4	Kolhicin		C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	399,44	1	7
STD_5	8-Fenilteofilin		C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₂	256,26	1	6
STD_6	Acetofenon		C ₈ H ₈ O	120,15	0	1
STD_7	Indol		C ₈ H ₇ N	117,15	1	1
STD_8	Propiofenon		C ₉ H ₁₀ O	134,18	0	1
STD_9	Butirofenon		C ₁₀ H ₁₂ O	148,20	0	1

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska struktura	Molekulska formula	M _w / g mol ⁻¹	Donori vodikovih veza ^a	Akceptori vodikovih veza ^a
STD_10	Valerofenon		C ₁₁ H ₁₄ O	162,23	0	1

^a ACD/Labs Percepta *in silico* izračun

8.6. Makrociklički spojevi početne skupine korištenih za istraživanje utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta na vremena zadržavanja te oblik i simetriju kromatografskih pikova

Oznaka spoja	Naziv spoja	Molekulska formula	Molekulska masa / g mol ⁻¹	Donori vodikovih veza ¹	Akceptori vodikovih veza ¹	clog <i>D</i> _{7,40} ^a	Naboj pri pH 7,40 ^a	p <i>K</i> _a ^a
MAC_1	Karbetocin	C ₄₅ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₂ S	988,16	13	23	-3,11	0	-0,6
MAC_2	Rifampicin	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂	822,94	6	16	-0,19	+1	7,3
MAC_3	Oktreotid	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	1019,24	15	20	-2,47	+1	6,8
MAC_4	Rifapentin	C ₄₇ H ₆₄ N ₄ O ₁₂	877,03	6	16	0,95	+1	7,7
MAC_5	Rifabutin	C ₄₆ H ₆₂ N ₄ O ₁₁	847,00	5	15	/	+1	/
MAC_6	Anidulafungin	C ₅₈ H ₇₃ N ₇ O ₁₇	1140,24	14	24	-2,32	0	-1,6
MAC_7	Telitromicin	C ₄₃ H ₆₅ N ₅ O ₁₀	812,00	1	15	3,68	+1	8,1
MAC_8	Takrolimus	C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂	804,02	3	13	4,08	0	-2,4
MAC_9	Pimekrolimus	C ₄₃ H ₆₈ ClNO ₁₁	810,45	2	12	5,09	0	-2,4
MAC_10	Azitromicin	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748,98	5	14	1,36	+2	8,6 / 8,2
MAC_11	Eritromicin	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,93	5	14	1,69	+1	8,2
MAC_12	Dekladinozil azitromicin	C ₃₀ H ₅₈ N ₂ O ₉	590,79	5	11	0,11	+2	8,6 / 8,2
MAC_13	Azahomoeritromicin	C ₃₆ H ₆₆ N ₂ O ₁₃	734,91	5	15	1,39	+1	8,2
MAC_14	Klaritromicin	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	747,95	4	14	2,37	+1	8,2
MAC_15	Roksitromicin	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837,05	5	17	2,80	+1	8,2
MAC_16	Josamicin	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₅	828,00	3	16	2,81	(+1)	7,4
MAC_17	N'-Demetil azitromicin	C ₃₇ H ₇₀ N ₂ O ₁₂	734,96	6	14	0,11	+2	9,8 / 8,2
MAC_18	Spiramicin	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	843,05	4	16	0,46	+1(+2)	8,6 / 7,4
MAC_19	Midekamicin	C ₄₁ H ₆₇ NO ₁₅	813,97	3	16	2,58	(+1)	7,4
MAC_20	Ciklosporin	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	1202,61	5	23	1,81	0	-0,8

^a ACD/Labs Percepta *in silico* izračun

8.7. MRM prijelazi unutarnjeg i vanjskog standarda, kontrolnih spojeva i spojeva testiranih u pokusu od određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
/	/	Unutarnji standard	314,2 → 295,9	31 / 31
			311,9 → 242,0 (-) ^a	-70 / -20
Vanjski standard	/	Imipramin	281,1 → 193,2	10 / 55
Kontrolni spoj	/	Primidon	219,0 → 162,1	59 / 16
Kontrolni spoj	/	Testosteron	289,3 → 97,1	63 / 32
Početna skupina	MAC_1	Karbetocin	988,6 → 704,3	70 / 35
	MAC_2	Rifampicin	823,4 → 791,4	50 / 25
	MAC_3	Oktreotid	510,4 → 120,1	50 / 45
	MAC_4	Rifapentin	877,5 → 845,5	60 / 25
	MAC_5	Rifabutin	847,4 → 815,4	70 / 35
	MAC_7	Anidulafungin	/ ^b	/ ^b
	MAC_8	Telitromicin	802,3 → 560,2 (-) ^a	-50 / -35
	MAC_9	Takrolimus	/ ^b	/ ^b
	MAC_10	Pimekrolimus	749,5 → 591,5	90 / 45
	MAC_11	Azitromicin	734,5 → 576,4	60 / 25
	MAC_12	Eritromicin	591,4 → 158,1	70 / 45
	MAC_13	Dekladinozin azitromicin	735,6 → 577,4	70 / 35
	MAC_14	Azahomoeritromicin	748,5 → 158,1	60 / 35
	MAC_15	Klaritromicin	837,5 → 679,4	70 / 35
	MAC_16	Roksitromicin	828,4 → 109,1	70 / 75
	MAC_17	Josamicin	735,5 → 577,4	70 / 45
	MAC_18	N'-Demetil azitromicin	843,5 → 174,2	70 / 45
	MAC_19	Spiramicin	814,5 → 109,1	70 / 75
	MAC_20	Midekamicin	1202,8 → 425,3	40 / 75
	Proširena skupina	MAC_CPD_1	/	942,5 → 98,0
MAC_CPD_2		/	829,3 → 98,0	90 / 55
MAC_CPD_3		/	660,3 → 502,3	70 / 25
MAC_CPD_4		/	528,3 → 158,1	90 / 35
MAC_CPD_5		/	688,3 → 530,2	70 / 25
MAC_CPD_6		/	437,4 → 83,0	50 / 45
MAC_CPD_7		/	946,2 → 341,1	110 / 45
MAC_CPD_8		/	914,6 → 98,0	100 / 75
MAC_CPD_9		/	789,3 → 98,0	90 / 75
MAC_CPD_10		/	893,3 → 98,0	100 / 75

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
Proširena skupina	MAC_CPD_11	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_12	/	756,4 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_13	/	941,3 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_14	/	542,2 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_15	/	787,3 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_16	/	604,3 → 446,2	50 / 25
	MAC_CPD_17	/	488,2 → 158,1	60 / 25
	MAC_CPD_18	/	775,3 → 617,2	90 / 35
	MAC_CPD_19	/	617,3 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_20	/	702,3 → 544,2	70 / 25
	MAC_CPD_21	/	516,1 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_22	/	556,3 → 158,1	70 / 45
	MAC_CPD_23	/	573,3 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_24	/	528,3 → 158,1	90 / 35
	MAC_CPD_25	/	696,2 → 158,1	90 / 35
	MAC_CPD_26	/	675,3 → 517,2	100 / 35
	MAC_CPD_27	/	784,3 → 626,2	70 / 25
	MAC_CPD_28	/	992,3 → 98,1	110 / 75
	MAC_CPD_29	/	927,3 → 98,1	110 / 75
	MAC_CPD_30	/	934,2 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_31	/	808,3 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_32	/	770,3 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_33	/	844,2 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_34	/	913,4 → 98,0	110 / 75
	MAC_CPD_35	/	1060,1 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_36	/	661,4 → 503,2	80 / 35
	MAC_CPD_37	/	844,5 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_38	/	913,5 → 98,2	100 / 75
	MAC_CPD_39	/	1039,3 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_40	/	800,4 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_41	/	901,4 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_42	/	798,5 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_43	/	949,5 → 98,0	100 / 55
	MAC_CPD_44	/	914,5 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_45	/	888,5 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_46	/	1054,2 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_47	/	787,3 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_48	/	955,2 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_49	/	990,3 → 171,0	90 / 75
	MAC_CPD_50	/	1041,3 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_51	/	972,4 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_52	/	786,3 → 339,1	90 / 35
	MAC_CPD_53	/	931,5 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_54	/	874,3 → 98,0	100 / 75

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
Proširena skupina	MAC_CPD_55	/	992,4 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_56	/	873,3 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_57	/	931,3 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_58	/	899,4 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_59	/	945,5 → 98,1	110 / 75
	MAC_CPD_60	/	956,4 → 98,0	110 / 75
	MAC_CPD_61	/	747,3 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_62	/	718,3 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_63	/	959,4 → 98,1	110 / 75
	MAC_CPD_64	/	748,4 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_65	/	987,4 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_66	/	801,4 → 98,1	100 / 75
	MAC_CPD_67	/	787,4 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_68	/	931,5 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_69	/	1044,4 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_70	/	915,4 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_71	/	837,4 → 116,1	100 / 75
	MAC_CPD_72	/	928,3 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_73	/	947,4 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_74	/	930,4 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_75	/	803,4 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_76	/	802,4 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_77	/	932,4 → 98,0	110 / 75
	MAC_CPD_78	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_79	/	742,3 → 98,0	80 / 75
	MAC_CPD_80	/	918,4 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_81	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_82	/	876,5 → 98,0	100 / 75
	MAC_CPD_83	/	532,2 → 158,1	60 / 35
	MAC_CPD_84	/	716,3 → 558,2	80 / 25
	MAC_CPD_85	/	716,3 → 158,1	80 / 35
	MAC_CPD_86	/	434,2 → 300,2	90 / 45
	MAC_CPD_87	/	748,3 → 158,1	80 / 35
	MAC_CPD_88	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_89	/	749,3 → 591,3	110 / 45
	MAC_CPD_90	/	690,2 → 158,1	90 / 35
	MAC_CPD_91	/	928,3 → 98,1	90 / 75
	MAC_CPD_92	/	498,1 → 158,1	70 / 25
	MAC_CPD_93	/	750,2 → 550,2	70 / 35
	MAC_CPD_94	/	646,4 → 446,2	50 / 15
	MAC_CPD_95	/	702,4 → 200,0	50 / 25
	MAC_CPD_96	/	646,2 → 488,3	70 / 25
	MAC_CPD_97	/	503,3 → 158,1	60 / 25
	MAC_CPD_98	/	503,2 → 158,1	60 / 25

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
Proširena skupina	MAC_CPD_99	/	675,3 → 158,1	90 / 35
	MAC_CPD_100	/	754,4 → 554,3	70 / 25
	MAC_CPD_101	/	415,1 → 119,3	40 / 45
	MAC_CPD_102	/	474,4 → 158,1	60 / 35
	MAC_CPD_103	/	674,2 → 516,3	60 / 25
	MAC_CPD_104	/	634,0 → 158,0	80 / 35
	MAC_CPD_105	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_106	/	802,5 → 602,4	60 / 25
	MAC_CPD_107	/	704,4 → 546,3	60 / 25
	MAC_CPD_108	/	794,5 → 636,4	70 / 25
	MAC_CPD_109	/	767,2 → 609,4	100 / 45
	MAC_CPD_110	/	832,6 → 674,4	80 / 35
	MAC_CPD_111	/	688,4 → 530,3	70 / 25
	MAC_CPD_112	/	754,5 → 596,3	70 / 35
	MAC_CPD_113	/	784,4 → 626,3	60 / 25
	MAC_CPD_114	/	626,0 → 158,1	70 / 45
	MAC_CPD_115	/	754,4 → 596,3	60 / 25
	MAC_CPD_116	/	693,3 → 535,2	70 / 25
	MAC_CPD_117	/	742,3 → 542,3	90 / 45
	MAC_CPD_118	/	836,6 → 678,5	100 / 45
	MAC_CPD_119	/	607,3 → 449,3	70 / 35
	MAC_CPD_120	/	825,4 → 667,4	80 / 35
	MAC_CPD_121	/	667,2 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_122	/	816,5 → 616,3	60 / 25
	MAC_CPD_123	/	857,6 → 699,5	70 / 35
	MAC_CPD_124	/	714,4 → 556,3	50 / 25
	MAC_CPD_125	/	759,2 → 98,1	80 / 75
	MAC_CPD_126	/	787,4 → 629,4	70 / 35
	MAC_CPD_127	/	662,3 → 158,1	80 / 55
	MAC_CPD_128	/	831,5 → 673,4	60 / 25
	MAC_CPD_129	/	608,4 → 158,2	80 / 35
	MAC_CPD_130	/	629,1 → 98,1	70 / 55
	MAC_CPD_131	/	733,4 → 575,3	70 / 35
	MAC_CPD_132	/	672,4 → 457,3	90 / 35
	MAC_CPD_133	/	699,3 → 98,1	80 / 75
	MAC_CPD_134	/	544,1 → 158,1	60 / 25
	MAC_CPD_135	/	615,3 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_136	/	527,2 → 158,1	60 / 25
	MAC_CPD_137	/	775,4 → 617,3	60 / 25
	MAC_CPD_138	/	601,2 → 158,1	60 / 35
	MAC_CPD_139	/	600,0 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_140	/	648,0 → 158,1	70 / 35
MAC_CPD_141	/	632,3 → 474,2	70 / 25	
MAC_CPD_142	/	674,3 → 516,2	70 / 25	

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
Proširena skupina	MAC_CPD_143	/	686,4 → 293,1 (-) ^a	-70 / -35
	MAC_CPD_144	/	713,3 → 309,1	70 / 45
	MAC_CPD_145	/	557,3 → 513,2	50 / 25
	MAC_CPD_146	/	816,5 → 616,4	60 / 25
	MAC_CPD_147	/	556,2 → 158,1	60 / 35
	MAC_CPD_148	/	606,3 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_149	/	498,1 → 158,1	50 / 25
	MAC_CPD_150	/	770,4 → 612,3	90 / 35
	MAC_CPD_151	/	516,0 → 158,1	60 / 25
	MAC_CPD_152	/	379,3 → 158,1	30 / 25
	MAC_CPD_153	/	715,3 → 557,3	70 / 35
	MAC_CPD_154	/	713,5 → 555,3	70 / 35
	MAC_CPD_155	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_156	/	758,5 → 558,4	50 / 25
	MAC_CPD_157	/	727,4 → 569,3	70 / 35
	MAC_CPD_158	/	685,4 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_159	/	617,1 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_160	/	555,2 → 309,1	60 / 25
	MAC_CPD_161	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_162	/	528,3 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_163	/	773,7 → 98,1	60 / 75
	MAC_CPD_164	/	825,8 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_165	/	628,1 → 158,2	70 / 35
	MAC_CPD_166	/	871,6 → 713,5	70 / 35
	MAC_CPD_167	/	663,3 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_168	/	821,5 → 663,4	90 / 45
	MAC_CPD_169	/	807,4 → 649,4	90 / 45
	MAC_CPD_170	/	897,6 → 739,5	70 / 35
	MAC_CPD_171	/	814,4 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_172	/	714,7 → 556,3	40 / 25
	MAC_CPD_173	/	575,4 → 417,3	50 / 25
	MAC_CPD_174	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_175	/	671,2 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_176	/	804,4 → 646,4	80 / 35
	MAC_CPD_177	/	556,5 → 158,1	50 / 25
	MAC_CPD_178	/	556,1 → 158,1	60 / 35
MAC_CPD_179	/	677,2 → 519,3	90 / 35	
MAC_CPD_180	/	569,3 → 98,1	50 / 75	
MAC_CPD_181	/	769,3 → 569,3	60 / 25	
MAC_CPD_182	/	569,2 → 158,1	60 / 35	
MAC_CPD_183	/	608,3 → 158,1	90 / 45	
MAC_CPD_184	/	713,5 → 98,1	80 / 75	
MAC_CPD_185	/	739,4 → 98,2	80 / 75	
MAC_CPD_186	/	714,4 → 556,3	60 / 25	

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
Proširena skupina	MAC_CPD_187	/	556,2 → 158,1	70 / 35
	MAC_CPD_188	/	662,3 → 158,1	80 / 35
	MAC_CPD_189	/	716,4 → 558,3	50 / 25
	MAC_CPD_190	/	558,3 → 158,1	60 / 35
	MAC_CPD_191	/	601,4 → 158,1	80 / 45
	MAC_CPD_192	/	773,5 → 615,4	70 / 35
	MAC_CPD_193	/	972,6 → 98,2	80 / 75
	MAC_CPD_194	/	528,3 → 158,1	80 / 35
	MAC_CPD_195	/	925,5 → 98,0	90 / 75
	MAC_CPD_196	/	717,3 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_197	/	856,5 → 698,5	80 / 35
	MAC_CPD_198	/	842,5 → 684,5	80 / 35
	MAC_CPD_199	/	514,3 → 158,1	50 / 35
	MAC_CPD_200	/	947,6 → 789,5	70 / 35
	MAC_CPD_201	/	916,6 → 591,4	90 / 45
	MAC_CPD_202	/	702,3 → 158,1	60 / 35
	MAC_CPD_203	/	940,5 → 591,4	90 / 45
	MAC_CPD_204	/	661,4 → 503,3	70 / 25
	MAC_CPD_205	/	674,4 → 516,3	50 / 25
	MAC_CPD_206	/	708,3 → 550,3	50 / 35
	MAC_CPD_207	/	742,4 → 542,3	60 / 25
	MAC_CPD_208	/	702,4 → 502,3	50 / 25
	MAC_CPD_209	/	646,3 → 488,3	50 / 25
	MAC_CPD_210	/	646,4 → 488,3	50 / 25
	MAC_CPD_211	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_212	/	/ ^b	/ ^b
	MAC_CPD_213	/	500,2 → 307,1	50 / 25
	MAC_CPD_214	/	767,3 → 98,0	70 / 75
	MAC_CPD_215	/	900,4 → 98,1	80 / 75
	MAC_CPD_216	/	928,5 → 98,1	80 / 75
	MAC_CPD_217	/	946,5 → 341,1	70 / 35
	MAC_CPD_218	/	902,5 → 98,2	80 / 55
	MAC_CPD_219	/	945,5 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_220	/	774,4 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_221	/	905,6 → 98,1	80 / 75
MAC_CPD_222	/	925,5 → 98,1	80 / 75	
MAC_CPD_223	/	906,5 → 98,1	80 / 75	
MAC_CPD_224	/	778,3 → 578,3	50 / 25	
MAC_CPD_225	/	960,5 → 98,1	80 / 55	
MAC_CPD_226	/	716,4 → 516,3	60 / 25	
MAC_CPD_227	/	919,6 → 98,1	80 / 75	
MAC_CPD_228	/	446,2 → 158,1	50 / 25	
MAC_CPD_229	/	981,6 → 98,1	90 / 75	
MAC_CPD_230	/	882,4 → 98,1	80 / 75	

Skupina	Oznaka spoja	Naziv spoja	MRM prijelaz	DP/CE
Proširena skupina	MAC_CPD_231	/	995,6 → 116,1	80 / 75
	MAC_CPD_232	/	911,6 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_233	/	770,4 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_234	/	832,4 → 171,1	70 / 75
	MAC_CPD_235	/	955,5 → 98,1	70 / 75
	MAC_CPD_236	/	900,6 → 98,1	70 / 75

^a Negativni način

^b Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora

8.8. Rezultati istraživanja utjecaja eksperimentalnih kromatografskih uvjeta

8.8.1. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim temperaturama kromatografske kolone: 25 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C

Oznaka spoja	t _R 25 °C / min	t _R 40 °C / min	t _R 50 °C / min	t _R 60 °C / min
STD_1	1,95	1,92	1,91	1,90
STD_2	2,05	2,02	2,00	1,98
STD_3	2,20	2,16	2,15	2,12
STD_4	2,50	2,50	2,51	2,51
STD_5	2,65	2,64	2,63	2,61
STD_6	2,84	2,80	2,79	2,76
STD_7	3,04	3,00	2,97	2,94
STD_8	3,14	3,12	3,10	3,07
STD_9	3,37	3,35	3,33	3,31
STD_10	3,58	3,56	3,54	3,51
MAC_1	2,56	2,56	2,57	2,57
MAC_2	2,86	2,88	2,90	2,91
MAC_3	2,57	2,57	2,57	2,57
MAC_4	3,21	3,25	3,27	3,28
MAC_5	3,84	3,87	3,89	3,91
MAC_6	3,24	3,26	3,26	3,27
MAC_7	2,73	2,75	2,77	2,78
MAC_8	3,99	3,96	3,96	3,92
MAC_9	4,40	4,36	4,33	4,29
MAC_10	2,55	2,55	2,59	2,62
MAC_11	2,66	2,70	2,73	2,73
MAC_12	2,33	2,33	2,33	2,36
MAC_13	2,44	2,44	2,48	2,47
MAC_14	2,92	2,96	2,99	2,99

Oznaka spoja	t _R 25°C / min	t _R 40°C / min	t _R 50°C / min	t _R 60°C / min
MAC_15	2,96	2,99	3,03	3,07
MAC_16	3,50	3,53	3,54	3,55
MAC_17	2,48	2,48	2,51	2,51
MAC_18	2,77	2,83	2,88	2,93
MAC_19	3,30	3,33	3,35	3,36
MAC_20	/	/	/	/

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja imaju istu m/z vrijednost koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa i MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 - ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.2. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva primjenom dvominutnog, trominutnog, petominutnog i sedmominutnog linearnog gradijenta

Oznaka spoja	t _R 2 min / min	t _R 3 min / min	t _R 5 min / min	t _R 7 min / min
STD_1	1,80	1,94	2,17	2,37
STD_2	1,87	2,04	2,31	2,54
STD_3	1,99	2,19	2,52	2,80
STD_4	2,17	2,49	3,09	3,64
STD_5	2,29	2,63	3,26	3,83
STD_6	2,45	2,82	3,46	4,02
STD_7	2,57	3,03	3,83	4,55
STD_8	2,65	3,13	3,97	4,74
STD_9	2,80	3,37	4,37	5,28
STD_10	2,94	3,57	4,71	5,76
MAC_1	2,19	2,55	3,23	3,85
MAC_2	2,40	2,84	3,66	3,87
MAC_3	2,21	2,57	3,27	4,46
MAC_4	2,64	3,18	4,17	5,18
MAC_5	3,12	3,83	5,14	6,38
MAC_6	2,67	3,24	4,32	5,31
MAC_7	2,34	2,76	3,55	4,19

Oznaka spoja	t _R 2 min / min	t _R 3 min / min	t _R 5 min / min	t _R 7 min / min
MAC_8	3,20	3,99	5,38	6,72
MAC_9	3,50	4,40	6,05	7,72
MAC_10	2,23	2,57	3,23	3,72
MAC_11	2,27	2,68	3,42	4,02
MAC_12	2,05	2,34	2,83	3,21
MAC_13	2,14	2,46	3,09	3,50
MAC_14	2,46	2,94	3,79	4,61
MAC_15	2,49	2,97	3,86	4,50
MAC_16	2,86	3,50	4,67	5,76
MAC_17	2,20	2,53	3,20	3,61
MAC_18	2,37	2,78	3,50	4,27
MAC_19	2,72	3,30	4,35	5,33
MAC_20	/	/	/	/

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa i MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 - ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.3. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim protocima pokretne faze: 0,5 ml min⁻¹, 1 ml min⁻¹, 1,5 ml min⁻¹ te 2 ml min⁻¹

Oznaka spoja	t _R 0,5 ml min ⁻¹ / min	t _R 1 ml min ⁻¹ / min	t _R 1,5 ml min ⁻¹ / min	t _R 2 ml min ⁻¹ / min
STD_1	3,55	2,17	1,63	1,36
STD_2	3,74	2,31	1,75	1,46
STD_3	4,05	2,52	1,93	1,62
STD_4	4,59	3,09	2,56	2,28
STD_5	4,86	3,26	2,68	2,37
STD_6	5,21	3,46	2,79	2,41
STD_7	5,56	3,83	3,17	2,79
STD_8	5,75	3,97	3,30	2,92
STD_9	6,14	4,37	3,69	3,30
STD_10	6,50	4,71	4,03	3,65
MAC_1	4,66	3,23	2,74	2,48

Oznaka spoja	t_R 0,5 ml min ⁻¹ / min	t_R 1 ml min ⁻¹ / min	t_R 1,5 ml min ⁻¹ / min	t_R 2 ml min ⁻¹ / min
MAC_2	4,73	3,66	2,79	2,52
MAC_3	5,15	3,27	3,13	2,87
MAC_4	5,71	4,17	3,63	3,33
MAC_5	/	5,14	4,48	4,13
MAC_6	5,83	4,32	3,78	3,49
MAC_7	5,06	3,55	3,05	2,78
MAC_8	/	5,38	4,73	4,37
MAC_9	/	6,05	5,44	5,08
MAC_10	4,85	3,23	2,77	2,49
MAC_11	4,96	3,42	2,92	2,63
MAC_12	4,44	2,83	2,36	2,08
MAC_13	4,66	3,09	2,62	2,34
MAC_14	5,48	3,79	3,33	3,04
MAC_15	5,41	3,86	3,29	2,97
MAC_16	6,32	4,67	4,07	3,74
MAC_17	4,74	3,20	2,70	2,41
MAC_18	5,12	3,50	3,08	2,80
MAC_19	5,97	4,35	3,77	3,45
MAC_20	/	/	/	/

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_5 - rifabutina, MAC_8 – takrolimusa i MAC_9 – pimekrolimusa nisu očitana pri protoku od 0,5 ml min⁻¹ jer ni u jednom slučaju analit se nije isprao s kromatografske kolone tijekom analize.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa i MAC_9 – pimekrolimusa pri protocima od 1 ml min⁻¹, 1,5 ml min⁻¹ i 2 ml min⁻¹ očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.4. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri upotrebi CHI metode s Luna C18 i XSelect CSH kromatografskim kolonama

Oznaka spoja	t_R Luna C18 / min	t_R XSelect CSH / min
STD_1	1,95	1,86
STD_2	2,06	1,93

Oznaka spoja	t _R Luna C18 / min	t _R XSelect CSH / min
STD_3	2,20	2,08
STD_4	2,33	2,29
STD_5	2,47	2,40
STD_6	2,51	2,42
STD_7	2,51	2,48
STD_8	2,57	2,51
STD_9	2,58	2,54
STD_10	2,65	2,55
MAC_1	2,55	2,55
MAC_2	2,70	2,62
MAC_3	2,83	2,65
MAC_4	2,74	2,69
MAC_5	2,86	2,78
MAC_6	2,78	2,78
MAC_7	2,92	2,85
MAC_8	3,03	2,88
MAC_9	2,95	2,90
MAC_10	3,13	2,96
MAC_11	3,21	3,12
MAC_12	3,36	3,19
MAC_13	3,23	3,22
MAC_14	3,29	3,22
MAC_15	3,56	3,40
MAC_16	3,49	3,40
MAC_17	3,83	3,69
MAC_18	3,96	3,81
MAC_19	4,40	4,22
MAC_20	/	/

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa, MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.5. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim koncentracijama amonijevog acetata: 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM i 70 mM

Oznaka spoja	t _R 5 mM AA ^a / min	t _R 10 mM AA ^a / min	t _R 30 mM AA ^a / min	t _R 50 mM AA ^a / min	t _R 70 mM AA ^a / min
STD_1	1,94	1,95	1,94	1,95	1,95
STD_2	1,99	2,04	2,05	2,06	2,05
STD_3	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
STD_4	2,50	2,51	2,51	2,51	2,51
STD_5	2,63	2,65	2,65	2,65	2,65
STD_6	2,83	2,83	2,83	2,83	2,83
STD_7	3,05	3,04	3,04	3,03	3,03
STD_8	3,15	3,14	3,14	3,13	3,13
STD_9	3,38	3,36	3,36	3,36	3,36
STD_10	3,59	3,57	3,57	3,56	3,56
MAC_1	2,56	2,57	2,56	2,57	2,56
MAC_2	2,78	2,84	2,86	2,86	2,86
MAC_3	2,94	2,61	2,59	2,58	2,57
MAC_4	3,08	3,16	3,19	3,21	3,20
MAC_5	3,90	3,83	3,83	3,83	3,82
MAC_6	3,26	3,25	3,24	3,23	3,22
MAC_7	3,03	2,80	2,76	2,74	2,73
MAC_8	3,98	3,95	3,96	3,96	3,96
MAC_9	4,40	4,40	4,40	4,40	4,40
MAC_10	/	2,70	2,59	2,55	2,55
MAC_11	2,95	2,73	2,70	2,70	2,66
MAC_12	/	2,47	2,36	2,33	2,33
MAC_13	/	2,59	2,47	2,47	2,44
MAC_14	3,27	2,99	2,92	2,92	2,92
MAC_15	3,32	3,03	2,99	2,95	2,95
MAC_16	3,55	3,48	3,50	3,49	3,48
MAC_17	/	2,59	2,51	2,51	2,47
MAC_18	/	2,89	2,83	2,78	2,77
MAC_19	3,37	3,30	3,30	3,29	3,29
MAC_20	/	/	/	/	/

^a AA – amonijev acetat

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa, MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima te MAC_7 – telitromicina i MAC_11 – eritromicina pri koncentraciji

amonijevog acetata od 5 mM očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.

- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_13 – azahomoeritromicina i MAC_18 – spiramicina nisu očitana pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM zbog širine kromatografskog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_10 – azitromicina, MAC_12 - dekladinozil azitromicina i MAC_17 – N'-demetil azitromicina nisu očitana pri koncentraciji amonijevog acetata od 5 mM jer ni u jednom slučaju analit se nije isprao s kromatografske kolone tijekom analize.

8.8.6. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva pri različitim koncentracijama amonijevog acetata: 5 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM i 70 mM na XSelect CSH kromatografskoj koloni

Oznaka spoja	t _R 5 mM AA ^a / min	t _R 10 mM AA ^a / min	t _R 30 mM AA ^a / min	t _R 50 mM AA ^a / min	t _R 70 mM AA ^a / min
STD_1	1,87	1,84	1,85	1,86	1,85
STD_2	1,87	1,88	1,92	1,93	1,93
STD_3	2,09	2,06	2,07	2,08	2,07
STD_4	2,42	2,42	2,42	2,42	2,41
STD_5	2,59	2,54	2,55	2,55	2,54
STD_6	2,66	2,64	2,64	2,65	2,64
STD_7	2,89	2,87	2,87	2,88	2,87
STD_8	2,97	2,95	2,95	2,96	2,95
STD_9	3,20	3,18	3,19	3,19	3,19
STD_10	3,41	3,40	3,39	3,40	3,39
MAC_1	2,51	2,48	2,51	2,51	2,51
MAC_2	2,71	2,73	2,78	2,78	2,78
MAC_3	2,64	2,52	2,54	2,54	2,53
MAC_4	3,00	3,08	3,11	3,12	3,13
MAC_5	3,74	3,71	3,70	3,69	3,68
MAC_6	3,24	3,24	3,23	3,22	3,21
MAC_7	2,79	2,74	2,70	2,69	2,68
MAC_8	3,84	3,85	3,81	3,81	3,81
MAC_9	4,23	4,22	4,22	4,22	4,22
MAC_10	2,77	2,70	2,59	2,55	2,51
MAC_11	2,73	2,66	2,62	2,62	2,62
MAC_12	2,48	2,40	2,33	2,29	2,29
MAC_13	2,55	2,44	2,40	2,40	2,40
MAC_14	3,03	2,92	2,88	2,85	2,85
MAC_15	3,06	2,96	2,92	2,90	2,89
MAC_16	3,45	3,43	3,41	3,40	3,40

Oznaka spoja	t _R 5 mM AA ^a / min	t _R 10 mM AA ^a / min	t _R 30 mM AA ^a / min	t _R 50 mM AA ^a / min	t _R 70 mM AA ^a / min
MAC_17	2,72	2,51	2,48	2,48	2,44
MAC_18	2,94	2,88	2,81	2,78	2,76
MAC_19	3,27	3,24	3,22	3,22	3,21
MAC_20	/	/	/	/	/

^a AA – amonijev acetat

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa, MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.7. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i 10 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze

Oznaka spoja	t _R 50 mM AA ^a / min	t _R 50 mM AH ^b / min	t _R 10 mM AH ^b / min
STD_1	1,90	1,89	1,89
STD_2	2,00	2,01	1,97
STD_3	2,15	2,17	2,16
STD_4	2,47	2,47	2,47
STD_5	2,60	2,55	2,56
STD_6	2,77	2,78	2,77
STD_7	2,97	2,99	2,97
STD_8	3,08	3,09	3,08
STD_9	3,31	3,32	3,31
STD_10	3,52	3,53	3,53
MAC_1	2,52	2,52	2,52
MAC_2	2,84	2,85	2,79
MAC_3	2,53	2,55	2,61
MAC_4	3,20	3,22	3,12
MAC_5	3,82	3,91	3,92
MAC_6	3,21	3,20	3,21

Oznaka spoja	t _R 50 mM AA ^a / min	t _R 50 mM AH ^b / min	t _R 10 mM AH ^b / min
MAC_7	2,71	2,92	2,94
MAC_8	3,93	3,93	3,94
MAC_9	4,33	4,34	4,35
MAC_10	2,53	2,97	3,05
MAC_11	2,64	2,83	2,86
MAC_12	2,31	2,57	2,64
MAC_13	2,38	2,57	2,64
MAC_14	2,86	3,16	3,20
MAC_15	2,93	3,23	3,27
MAC_16	3,48	3,56	3,57
MAC_17	2,45	2,68	2,79
MAC_18	2,77	3,16	3,17
MAC_19	3,30	/	/
MAC_20	/	/	/

^a AA – amonijev acetat

^b AH – amonijev hidrogenkarbonat

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa, MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_19 – midekamicina pri upotrebi amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i od 10 mM nije određeno zbog greške u injektiranju instrumenta.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.8. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM te amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i 10 mM kao puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze na XSelect CSH kromatografskoj koloni

Oznaka spoja	$t_{R\ 50\ mM\ AA^a}$ / min	$t_{R\ 50\ mM\ AH^b}$ / min	$t_{R\ 10\ mM\ AH^b}$ / min
STD_1	1,86	1,84	1,84
STD_2	1,93	1,93	1,89
STD_3	2,08	2,09	2,08
STD_4	2,42	2,42	2,42
STD_5	2,55	2,48	2,50
STD_6	2,65	2,65	2,64
STD_7	2,88	2,87	2,87
STD_8	2,96	2,95	2,95
STD_9	3,19	3,19	3,19
STD_10	3,40	3,39	3,39
MAC_1	2,51	2,50	2,51
MAC_2	2,78	2,81	2,76
MAC_3	2,54	2,54	2,59
MAC_4	3,12	3,19	3,11
MAC_5	3,69	3,75	3,76
MAC_6	3,22	3,21	3,23
MAC_7	2,69	2,88	2,90
MAC_8	3,81	3,81	3,81
MAC_9	4,22	4,22	4,22
MAC_10	2,55	2,99	3,11
MAC_11	2,62	2,81	2,81
MAC_12	2,29	2,59	2,66
MAC_13	2,40	2,59	2,66
MAC_14	2,85	3,11	3,14
MAC_15	2,90	3,18	3,22
MAC_16	3,40	3,47	3,47
MAC_17	2,48	2,70	2,77
MAC_18	2,78	3,11	3,13
MAC_19	3,22	3,28	3,29
MAC_20	/	/	/

^a AA – amonijev acetat

^b AH – amonijev hidrogenkarbonat

Napomene:

- Za spojeve MAC_6 - anidulafungin i MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa, MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri svim istraženim uvjetima nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog širine kromatografskog pika.

8.8.9. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila, amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola, zatim amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM, odnosno 10 mM i metanola kao pokretnih faza

Oznaka spoja	t _R 50 mM AA ^a +ACN ^b / min	t _R 50 mM AA ^a +MeOH ^c / min	t _R 50 mM AH ^d +MeOH ^c / min	t _R 10 mM AH ^d +MeOH ^c / min
STD_1	1,91	2,63	2,57	2,59
STD_2	2,00	2,76	2,79	2,77
STD_3	2,15	3,01	3,02	3,02
STD_4	2,51	4,08	4,09	4,10
STD_5	2,63	4,51	4,44	4,45
STD_6	2,79	3,87	3,88	3,88
STD_7	2,97	4,06	4,05	4,05
STD_8	3,10	4,43	4,43	4,43
STD_9	3,33	4,85	4,86	4,85
STD_10	3,54	5,20	5,21	5,21
MAC_1	2,57	4,59	4,59	4,59
MAC_2	2,90	4,67	4,74	4,71
MAC_3	2,57	5,08	5,10	5,02
MAC_4	3,27	5,55	5,58	5,51
MAC_5	3,89	6,03	6,05	6,05
MAC_6	/	/	/	/
MAC_7	2,77	4,85	5,13	5,15
MAC_8	3,96	5,88	5,84	5,88
MAC_9	4,33	6,03	6,03	6,03
MAC_10	2,59	4,77	5,40	5,51
MAC_11	2,73	4,85	5,10	5,10
MAC_12	2,33	4,22	4,99	5,07

Oznaka spoja	t _R 50 mM AA ^a +ACN ^b / min	t _R 50 mM AA ^a +MeOH ^c / min	t _R 50 mM AH ^d +MeOH ^c / min	t _R 10 mM AH ^d +MeOH ^c / min
MAC_13	2,33	4,36	4,77	4,85
MAC_14	2,99	5,22	5,47	5,47
MAC_15	3,03	5,14	5,36	5,40
MAC_16	3,54	5,61	5,65	5,65
MAC_17	2,51	4,66	5,14	5,18
MAC_18	2,88	5,33	5,55	5,55
MAC_19	3,35	5,43	5,48	5,48
MAC_20	/	6,18	6,18	6,21

^a AA – amonijev acetat

^b ACN – acetonitril

^c AH – amonijev hidrogenkarbonat

^d MeOH - metanol

Napomene:

- Za spoj MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spoja MAC_6 - anidulafungina pri svim istraženim uvjetima nije očitano zbog degradacije.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri upotrebi amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila nije moglo biti očitano iz kromatograma širine kromatografskog pika, dok je pri drugim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.

8.8.10. Vremena zadržavanja malih molekula i početne skupine makrocikličkih spojeva upotrebom amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila, amonijevog acetata koncentracije 50 mM i metanola, zatim amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mM i metanola te 10 mM amonijevog hidrogenkarbonata i metanola kao pokretnih faza na XSelect CSH kromatografskoj koloni

Oznaka spoja	t _R 50 mM AA ^a +ACN ^b / min	t _R 50 mM AA ^a +MeOH ^c / min	t _R 50 mM AH ^d +MeOH ^c / min	t _R 10 mM AH ^d +MeOH ^c / min
STD_1	1,86	2,60	2,57	2,59
STD_2	1,93	2,64	2,71	/
STD_3	2,08	2,95	3,00	2,99

Oznaka spoja	t _R 50 mM AA ^a +ACN ^b / min	t _R 50 mM AA ^a +MeOH ^c / min	t _R 50 mM AH ^d +MeOH ^c / min	t _R 10 mM AH ^d +MeOH ^c / min
STD_4	2,42	4,00	4,02	4,01
STD_5	2,55	4,46	4,31	4,31
STD_6	2,65	3,74	3,77	3,76
STD_7	2,88	4,00	4,03	4,01
STD_8	2,96	4,29	4,43	4,46
STD_9	3,19	4,70	4,72	4,72
STD_10	3,40	5,06	5,08	5,07
MAC_1	2,51	4,52	4,54	4,53
MAC_2	2,78	4,95	4,99	4,88
MAC_3	2,54	4,70	4,76	4,76
MAC_4	3,12	5,39	5,45	5,32
MAC_5	3,69	5,83	5,87	5,86
MAC_6	3,22	5,68	5,68	5,68
MAC_7	2,69	4,75	4,98	4,91
MAC_8	3,81	5,73	5,73	5,73
MAC_9	4,22	5,88	5,92	5,92
MAC_10	2,55	4,62	5,14	5,03
MAC_11	2,62	4,73	4,88	4,85
MAC_12	2,29	3,99	4,70	4,55
MAC_13	2,40	4,36	4,59	4,51
MAC_14	2,85	5,07	5,18	5,14
MAC_15	2,90	5,10	5,26	5,23
MAC_16	3,40	5,48	5,51	5,50
MAC_17	2,48	4,59	4,96	4,88
MAC_18	2,78	5,14	5,35	5,32
MAC_19	3,22	5,30	5,34	5,33
MAC_20	/	5,99	5,99	6,03

^a AA – amonijev acetat

^b ACN – acetonitril

^c AH – amonijev hidrogenkarbonat

^d MeOH - metanol

Napomene:

- Vrijeme zadržavanja spoja STD_2 – 5-feniltetrazola pri upotrebi amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 10 mM i metanola nije moglo biti očitano iz kromatograma zbog greške pri injektiranju uzorka.
- Za spoj MAC_13 – azahomoeritromicin su u kromatogramima pri svim istraženim uvjetima primijećena dva kromatografska pika koja odgovara vrijednosti očekivanoj za istraživani spoj te su za daljnju usporedbu uzeta vremena zadržavanja dominantnog pika.
- Vremena zadržavanja spojeva MAC_8 – takrolimusa i MAC_9 – pimekrolimusa pri svim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.

- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_20 – ciklosporina pri upotrebi amonijevog acetata koncentracije 50 mM i acetonitrila nije moglo biti očitano iz kromatograma širine kromatografskog pika, dok je pri drugim istraženim uvjetima očitana su iz maksimuma kromatografskih pikova iako su dobiveni široki kromatografski pikovi.

8.9. Rezultati određivanja lipofilnosti metodom izmućkivanja upotrebom CAMDIS metode te vremena zadržavanja upotrebom Macro log *D* metode za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva

Oznaka spoja	CAMDIS				Marco log <i>D</i>
	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_1	2,68	0,01	3		2,87
MAC_CPD_2	2,48	0,03	3		2,65
MAC_CPD_3	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,06
MAC_CPD_4	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,91
MAC_CPD_5	0,51	0,09	3		2,20
MAC_CPD_6	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,06
MAC_CPD_7	1,27	0,01	3		2,61
MAC_CPD_8	0,29	/	2		2,57
MAC_CPD_9	0,12	0,05	3		2,35
MAC_CPD_10	3,25	0,05	4		3,09
MAC_CPD_11	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,31
MAC_CPD_12	0,05	/	2		2,43
MAC_CPD_13	1,56	0,05	4		2,54
MAC_CPD_14	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,06
MAC_CPD_15	0,97	0,07	3		2,50
MAC_CPD_16	0,68	0,02	3		2,28
MAC_CPD_17	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,87
MAC_CPD_18	2,88	0,05	4		3,46
MAC_CPD_19	1,06	0,04	3		2,35
MAC_CPD_20	0,51	/	2		2,35
MAC_CPD_21	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,98
MAC_CPD_22	0,85	0,05	3		2,20

CAMDIS					Marco log <i>D</i>
Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_23	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,83
MAC_CPD_24	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,98
MAC_CPD_25	1,12	0,05	3		2,61
MAC_CPD_26	0,96	0,05	3		2,57
MAC_CPD_27	1,77	0,01	3		2,61
MAC_CPD_28	3,86	0,06	3		3,06
MAC_CPD_29	3,21	0,03	3		3,24
MAC_CPD_30	3,58	0,02	3		3,24
MAC_CPD_31	1,89	0,04	5		2,68
MAC_CPD_32	1,25	0,05	3		2,39
MAC_CPD_33	3,00	/	2		2,98
MAC_CPD_34	3,19	0,02	3		3,20
MAC_CPD_35	3,13	0,05	3		3,57
MAC_CPD_36	0,33	/	2		2,24
MAC_CPD_37	2,30	0,03	3		2,91
MAC_CPD_38	1,39	0,02	3		2,72
MAC_CPD_39	/	/	/	Neprecizni rezultati	3,57
MAC_CPD_40	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,28
MAC_CPD_41	0,23	/	2		2,43
MAC_CPD_42	0,50	/	2		2,68
MAC_CPD_43	2,61	0,02	3		2,80
MAC_CPD_44	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,28
MAC_CPD_45	1,75	0,03	3		2,68
MAC_CPD_46	2,70	0,03	3		3,06
MAC_CPD_47	0,52	0,06	3		2,43
MAC_CPD_48	2,27	0,04	3		2,83
MAC_CPD_49	2,48	0,04	3		2,76
MAC_CPD_50	/	/	/	Neprecizni rezultati	3,28
MAC_CPD_51	2,89	0,02	3		2,98
MAC_CPD_52	2,30	0,05	4		2,72
MAC_CPD_53	0,99	0,05	4		2,57
MAC_CPD_54	2,52	0,05	5		2,91
MAC_CPD_55	3,30	0,01	3		3,06
MAC_CPD_56	2,13	0,05	6		2,94
MAC_CPD_57	0,65	0,06	3		2,39
MAC_CPD_58	1,55	0,02	3		2,65
MAC_CPD_59	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,87
MAC_CPD_60	2,94	0,06	3		2,87
MAC_CPD_61	0,06	/	2		2,31

CAMDIS					Marco log <i>D</i>
Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_62	0,74	0,02	3		2,39
MAC_CPD_63	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,94
MAC_CPD_64	0,70	0,05	3		2,35
MAC_CPD_65	3,20	0,06	3		2,91
MAC_CPD_66	1,21	0,05	4		2,61
MAC_CPD_67	1,25	0,03	4		2,57
MAC_CPD_68	1,66	0,03	3		2,68
MAC_CPD_69	3,87	0,06	3		3,28
MAC_CPD_70	2,23	0,05	5		2,91
MAC_CPD_71	0,65	0,02	3		2,87
MAC_CPD_72	1,73	0,04	4		2,61
MAC_CPD_73	0,92	0,03	3		2,57
MAC_CPD_74	0,85	0,05	4		2,39
MAC_CPD_75	0,19	/	2		2,39
MAC_CPD_76	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,24
MAC_CPD_77	1,14	0,03	3		2,57
MAC_CPD_78	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,87
MAC_CPD_79	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,39
MAC_CPD_80	1,14	0,03	3		2,61
MAC_CPD_81	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,91
MAC_CPD_82	1,44	0,03	3		2,61
MAC_CPD_83	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,91
MAC_CPD_84	2,72	0,03	4		2,83
MAC_CPD_85	1,32	0,03	3		2,68
MAC_CPD_86	0,58	0,02	3		2,09
MAC_CPD_87	1,46	0,04	5		2,72
MAC_CPD_88	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	3,09
MAC_CPD_89	0,25	/	2		2,35
MAC_CPD_90	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,28
MAC_CPD_91	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,98
MAC_CPD_92	0,95	0,05	4		2,50
MAC_CPD_93	1,18	0,07	3		2,68

CAMDIS					Marco log <i>D</i>
Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_94	0,83	0,01	4		2,39
MAC_CPD_95	1,08	0,04	5		2,39
MAC_CPD_96	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,98
MAC_CPD_97	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,28
MAC_CPD_98	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,02
MAC_CPD_99	0,88	0,03	3		2,57
MAC_CPD_100	0,97	0,04	4		2,54
MAC_CPD_101	/	/	/	Taloženje u puferu	2,65
MAC_CPD_102	/	/	/	Neprecizni rezultati	1,83
MAC_CPD_103	0,19	/	2		2,09
MAC_CPD_104	0,76	0,01	3		2,43
MAC_CPD_105	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	/
MAC_CPD_106	0,93	0,08	3		2,68
MAC_CPD_107	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,28
MAC_CPD_108	2,41	0,02	3		2,87
MAC_CPD_109	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,13
MAC_CPD_110	0,40	0,05	3		2,57
MAC_CPD_111	0,09	/	2		2,17
MAC_CPD_112	2,34	0,03	3		2,94
MAC_CPD_113	1,42	0,01	3		2,57
MAC_CPD_114	1,43	0,04	4		2,43
MAC_CPD_115	1,20	0,02	4		2,61
MAC_CPD_116	1,22	0,01	3		2,61
MAC_CPD_117	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,43
MAC_CPD_118	0,18	/	2		2,20
MAC_CPD_119	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,76
MAC_CPD_120	0,44	/	2		2,17
MAC_CPD_121	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,02
MAC_CPD_122	1,14	0,03	3		2,65
MAC_CPD_123	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,02
MAC_CPD_124	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,13
MAC_CPD_125	0,09	0,06	3		2,20

CAMDIS					Marco log D
Oznaka spoja	CAMDIS log D	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log D / min
MAC_CPD_126	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,24
MAC_CPD_127	0,92	0,06	3		2,68
MAC_CPD_128	1,11	0,02	3		2,54
MAC_CPD_129	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,13
MAC_CPD_130	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,02
MAC_CPD_131	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,06
MAC_CPD_132	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,13
MAC_CPD_133	0,27	/	2		1,87
MAC_CPD_134	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,09
MAC_CPD_135	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,02
MAC_CPD_136	0,40	0,03	3		2,28
MAC_CPD_137	1,47	0,01	3		2,46
MAC_CPD_138	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,13
MAC_CPD_139	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,06
MAC_CPD_140	1,10	0,03	4		2,43
MAC_CPD_141	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,02
MAC_CPD_142	0,14	0,08	3		2,20
MAC_CPD_143	1,07	0,01	3		2,35
MAC_CPD_144	1,46	0,02	3		2,35
MAC_CPD_145	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,76
MAC_CPD_146	1,44	0,04	4		2,68
MAC_CPD_147	-0,06	/	2		2,20
MAC_CPD_148	1,14	0,04	5		2,43
MAC_CPD_149	0,86	0,07	3		2,50
MAC_CPD_150	0,96	0,05	5		2,65
MAC_CPD_151	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,98
MAC_CPD_152	1,24	0,02	4		2,72
MAC_CPD_153	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,09
MAC_CPD_154	2,57	0,02	3		3,57
MAC_CPD_155	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,68
MAC_CPD_156	1,46	0,01	3		2,65
MAC_CPD_157	1,32	0,03	3		2,65
MAC_CPD_158	0,87	0,05	3		2,72
MAC_CPD_159	2,27	0,01	3		3,06

CAMDIS					Marco log <i>D</i>
Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_160	0,15	/	2		2,17
MAC_CPD_161	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	1,80
MAC_CPD_162	-0,10	/	2		2,06
MAC_CPD_163	0,07	/	2		2,39
MAC_CPD_164	0,16	/	2		2,35
MAC_CPD_165	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,28
MAC_CPD_166	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,09
MAC_CPD_167	0,13	/	2		2,35
MAC_CPD_168	1,06	0,05	5		2,68
MAC_CPD_169	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,09
MAC_CPD_170	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,24
MAC_CPD_171	0,30	/	2		2,24
MAC_CPD_172	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,35
MAC_CPD_173	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,24
MAC_CPD_174	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,50
MAC_CPD_175	0,40	/	2		2,35
MAC_CPD_176	0,30	/	2		2,43
MAC_CPD_177	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,17
MAC_CPD_178	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,87
MAC_CPD_179	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,02
MAC_CPD_180	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,13
MAC_CPD_181	0,48	0,06	3		2,50
MAC_CPD_182	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,06
MAC_CPD_183	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,06
MAC_CPD_184	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,91
MAC_CPD_185	0,08	0,05	3		2,05
MAC_CPD_186	0,15	0,09	3		2,35
MAC_CPD_187	0,06	/	2		2,28
MAC_CPD_188	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,28

CAMDIS					Marco log <i>D</i>
Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_189	1,02	0,05	4		2,50
MAC_CPD_190	0,89	0,05	5		2,28
MAC_CPD_191	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,83
MAC_CPD_192	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,17
MAC_CPD_193	0,82	0,05	3		2,43
MAC_CPD_194	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,87
MAC_CPD_195	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,35
MAC_CPD_196	0,56	0,04	3		2,16
MAC_CPD_197	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,46
MAC_CPD_198	0,39	0,07	3		2,39
MAC_CPD_199	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,98
MAC_CPD_200	0,70	0,06	3		2,46
MAC_CPD_201	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,79
MAC_CPD_202	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,98
MAC_CPD_203	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,68
MAC_CPD_204	0,20	/	2		2,35
MAC_CPD_205	0,16	0,08	3		2,20
MAC_CPD_206	0,23	/	2		2,28
MAC_CPD_207	0,55	/	2		2,46
MAC_CPD_208	0,22	/	2		2,20
MAC_CPD_209	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,91
MAC_CPD_210	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	2,06
MAC_CPD_211	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,28
MAC_CPD_212	/	/	/	Neuspješna optimizacija parametara rada MS detektora	2,83
MAC_CPD_213	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,94
MAC_CPD_214	1,35	0,02	3		2,50
MAC_CPD_215	2,60	0,04	3		2,94
MAC_CPD_216	1,31	0,03	3		2,72
MAC_CPD_217	2,44	0,02	3		2,72
MAC_CPD_218	/	/	/	Neprecizni rezultati	2,76
MAC_CPD_219	1,50	0,03	3		2,68
MAC_CPD_220	0,61	/	2		2,35

CAMDIS					Marco log <i>D</i>
Oznaka spoja	CAMDIS log <i>D</i>	Standardna devijacija	Broj replika	Komentar	t _R Macro log <i>D</i> / min
MAC_CPD_221	0,91	0,03	4		2,57
MAC_CPD_222	2,27	0,02	3		2,76
MAC_CPD_223	1,21	0,01	4		2,57
MAC_CPD_224	1,46	0,03	3		2,61
MAC_CPD_225	0,43	/	2		2,39
MAC_CPD_226	0,10	/	2		2,35
MAC_CPD_227	1,03	0,03	3		2,57
MAC_CPD_228	< -0,2	/	3	Izvan granica metode	1,76
MAC_CPD_229	2,30	0,02	3		2,87
MAC_CPD_230	1,25	0,02	3		2,46
MAC_CPD_231	1,27	0,02	3		3,02
MAC_CPD_232	1,02	0,03	3		2,61
MAC_CPD_233	1,27	0,02	3		2,76
MAC_CPD_234	1,55	/	3		2,57
MAC_CPD_235	2,60	0,02	3		2,83
MAC_CPD_236	0,51	0,07	3		2,50

Napomene:

- ZA CAMDIS log *D* određivanje za svaki spoj kojemu nije određena konkretna vrijednost je u stupcu komentar naveden razlog.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_CPD_105 nije moglo biti očitano jer kromatografski pik nije uočen u kromatogramu.

8.10. Vremena zadržavanja makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log *D* kromatografske metode pri pH vrijednostima puferske otopine korištene kao vodeni dio pokretne faze od 7,30, 7,40 i 7,50

Oznaka spoja	t _R pH 7,30 / min	t _R pH 7,40 / min	t _R pH 7,50 / min
MAC_1	2,28	2,28	2,28
MAC_2	2,57	2,57	2,57
MAC_3	2,31	2,31	2,31
MAC_4	2,94	2,94	2,94
MAC_5	3,54	3,54	3,54
MAC_6	3,02	3,02	3,02
MAC_7	2,50	2,50	2,50
MAC_8	3,57	3,57	3,57
MAC_9	3,94	3,94	3,94

Oznaka spoja	t _R pH 7,30 / min	t _R pH 7,40 / min	t _R pH 7,50 / min
MAC_10	2,35	2,39	2,39
MAC_11	2,46	2,46	2,46
MAC_12	2,06	2,09	2,09
MAC_13	2,20	2,20	2,20
MAC_14	2,72	2,72	2,72
MAC_15	2,80	2,80	2,79
MAC_16	3,24	3,24	3,24
MAC_17	2,28	2,28	2,28
MAC_18	2,68	2,68	2,68
MAC_19	3,06	3,06	3,06
MAC_20	3,80	3,80	3,80

8.11. Vremena zadržavanja proširene skupine makrocikličkih spojeva upotrebom Macro log *D* kromatografske metode analizirajući spojeve samostalno i grupiranjem spojeva u skupine od tri člana

Oznaka spoja	t _R samostalno / min	t _R skupina od 3 člana / min
MAC_CPD_1	2,87	2,87
MAC_CPD_2	2,65	2,68
MAC_CPD_3	2,06	2,05
MAC_CPD_4	1,91	1,91
MAC_CPD_5	2,20	2,24
MAC_CPD_6	2,06	2,13
MAC_CPD_7	2,61	2,65
MAC_CPD_8	2,57	2,61
MAC_CPD_9	2,35	2,35
MAC_CPD_10	3,09	3,13
MAC_CPD_11	2,31	2,35
MAC_CPD_12	2,43	2,46
MAC_CPD_13	2,54	2,53
MAC_CPD_14	2,06	2,05
MAC_CPD_15	2,50	2,50
MAC_CPD_16	2,28	2,28
MAC_CPD_17	1,87	1,87
MAC_CPD_18	3,46	3,46
MAC_CPD_19	2,35	2,35
MAC_CPD_20	2,35	2,39
MAC_CPD_21	1,98	1,98
MAC_CPD_22	2,20	2,24
MAC_CPD_23	1,83	1,83

Oznaka spoja	t _R samostalno / min	t _R skupina od 3 člana / min
MAC_CPD_24	1,98	2,02
MAC_CPD_25	2,61	2,61
MAC_CPD_26	2,57	2,61
MAC_CPD_27	2,61	2,61
MAC_CPD_28	3,06	3,09
MAC_CPD_29	3,24	3,27
MAC_CPD_30	3,24	3,24
MAC_CPD_31	2,68	2,68
MAC_CPD_32	2,39	2,42
MAC_CPD_33	2,98	3,02
MAC_CPD_34	3,20	3,20
MAC_CPD_35	3,57	3,57
MAC_CPD_36	2,24	2,28
MAC_CPD_37	2,91	2,94
MAC_CPD_38	2,72	2,72
MAC_CPD_39	3,57	3,57
MAC_CPD_40	2,28	2,28
MAC_CPD_41	2,43	2,42
MAC_CPD_42	2,68	2,72
MAC_CPD_43	2,80	2,79
MAC_CPD_44	2,28	2,31
MAC_CPD_45	2,68	2,68
MAC_CPD_46	3,06	3,09
MAC_CPD_47	2,43	2,46
MAC_CPD_48	2,83	2,83
MAC_CPD_49	2,76	2,79
MAC_CPD_50	3,28	3,27
MAC_CPD_51	2,98	2,98
MAC_CPD_52	2,72	2,72
MAC_CPD_53	2,57	2,61
MAC_CPD_54	2,91	2,90
MAC_CPD_55	3,06	3,05
MAC_CPD_56	2,94	2,94
MAC_CPD_57	2,39	2,42
MAC_CPD_58	2,65	2,68
MAC_CPD_59	2,87	2,90
MAC_CPD_60	2,87	2,90
MAC_CPD_61	2,31	2,35
MAC_CPD_62	2,39	2,39
MAC_CPD_63	2,94	2,98
MAC_CPD_64	2,35	2,35
MAC_CPD_65	2,91	2,94
MAC_CPD_66	2,61	2,68
MAC_CPD_67	2,57	2,61

Oznaka spoja	t _R samostalno / min	t _R skupina od 3 člana / min
MAC_CPD_68	2,68	2,68
MAC_CPD_69	3,28	3,27
MAC_CPD_70	2,91	2,90
MAC_CPD_71	2,87	2,87
MAC_CPD_72	2,61	2,61
MAC_CPD_73	2,57	2,57
MAC_CPD_74	2,39	2,39
MAC_CPD_75	2,39	2,42
MAC_CPD_76	2,24	2,24
MAC_CPD_77	2,57	2,61
MAC_CPD_78	2,87	2,90
MAC_CPD_79	2,39	2,39
MAC_CPD_80	2,61	2,65
MAC_CPD_81	2,91	2,90
MAC_CPD_82	2,61	2,61
MAC_CPD_83	1,91	1,91
MAC_CPD_84	2,83	2,83
MAC_CPD_85	2,68	2,72
MAC_CPD_86	2,09	2,09
MAC_CPD_87	2,72	2,72
MAC_CPD_88	3,09	3,09
MAC_CPD_89	2,35	2,39
MAC_CPD_90	2,28	2,31
MAC_CPD_91	2,98	3,02
MAC_CPD_92	2,50	2,50
MAC_CPD_93	2,68	2,72
MAC_CPD_94	2,39	2,39
MAC_CPD_95	2,39	2,39
MAC_CPD_96	1,98	1,98
MAC_CPD_97	2,28	2,24
MAC_CPD_98	2,02	2,02
MAC_CPD_99	2,57	2,57
MAC_CPD_100	2,54	2,54
MAC_CPD_101	2,65	2,65
MAC_CPD_102	1,83	1,83
MAC_CPD_103	2,09	2,09
MAC_CPD_104	2,43	2,43
MAC_CPD_105	/	/
MAC_CPD_106	2,68	2,68
MAC_CPD_107	2,28	2,28
MAC_CPD_108	2,87	2,87
MAC_CPD_109	2,13	2,13
MAC_CPD_110	2,57	2,61
MAC_CPD_111	2,17	2,16

Oznaka spoja	t _R samostalno / min	t _R skupina od 3 člana / min
MAC_CPD_112	2,94	2,98
MAC_CPD_113	2,57	2,61
MAC_CPD_114	2,43	2,42
MAC_CPD_115	2,61	2,61
MAC_CPD_116	2,61	2,65
MAC_CPD_117	2,43	/
MAC_CPD_118	2,20	2,24
MAC_CPD_119	1,76	1,76
MAC_CPD_120	2,17	2,16
MAC_CPD_121	2,02	2,02
MAC_CPD_122	2,65	2,68
MAC_CPD_123	2,02	2,02
MAC_CPD_124	2,13	2,16
MAC_CPD_125	2,20	2,24
MAC_CPD_126	2,24	2,24
MAC_CPD_127	2,68	2,68
MAC_CPD_128	2,54	2,53
MAC_CPD_129	2,13	2,16
MAC_CPD_130	2,02	2,05
MAC_CPD_131	2,06	2,05
MAC_CPD_132	2,13	2,16
MAC_CPD_133	1,87	1,91
MAC_CPD_134	2,09	2,13
MAC_CPD_135	2,02	2,02
MAC_CPD_136	2,28	2,31
MAC_CPD_137	2,46	2,46
MAC_CPD_138	2,13	2,13
MAC_CPD_139	2,06	2,05
MAC_CPD_140	2,43	2,46
MAC_CPD_141	2,02	2,02
MAC_CPD_142	2,20	2,20
MAC_CPD_143	2,35	2,35
MAC_CPD_144	2,35	2,35
MAC_CPD_145	1,76	1,76
MAC_CPD_146	2,68	2,68
MAC_CPD_147	2,20	2,28
MAC_CPD_148	2,43	2,43
MAC_CPD_149	2,50	2,50
MAC_CPD_150	2,65	2,65
MAC_CPD_151	1,98	2,02
MAC_CPD_152	2,72	2,72
MAC_CPD_153	2,09	2,13
MAC_CPD_154	3,57	3,61
MAC_CPD_155	2,68	2,68

Oznaka spoja	t _R samostalno / min	t _R skupina od 3 člana / min
MAC_CPD_156	2,65	2,68
MAC_CPD_157	2,65	2,65
MAC_CPD_158	2,72	2,72
MAC_CPD_159	3,06	3,09
MAC_CPD_160	2,17	2,20
MAC_CPD_161	1,80	1,79
MAC_CPD_162	2,06	2,09
MAC_CPD_163	2,39	2,42
MAC_CPD_164	2,35	2,35
MAC_CPD_165	2,28	2,31
MAC_CPD_166	2,09	2,09
MAC_CPD_167	2,35	2,35
MAC_CPD_168	2,68	2,72
MAC_CPD_169	2,09	2,13
MAC_CPD_170	2,24	2,24
MAC_CPD_171	2,24	2,20
MAC_CPD_172	2,35	2,39
MAC_CPD_173	2,24	2,28
MAC_CPD_174	2,50	2,50
MAC_CPD_175	2,35	2,39
MAC_CPD_176	2,43	2,46
MAC_CPD_177	2,17	2,20
MAC_CPD_178	1,87	1,87
MAC_CPD_179	2,02	2,02
MAC_CPD_180	2,13	2,13
MAC_CPD_181	2,50	2,53
MAC_CPD_182	2,06	2,05
MAC_CPD_183	2,06	2,05
MAC_CPD_184	1,91	1,91
MAC_CPD_185	2,05	2,05
MAC_CPD_186	2,35	2,35
MAC_CPD_187	2,28	2,28
MAC_CPD_188	2,28	2,28
MAC_CPD_189	2,50	2,50
MAC_CPD_190	2,28	2,28
MAC_CPD_191	1,83	1,87
MAC_CPD_192	2,17	2,17
MAC_CPD_193	2,43	2,43
MAC_CPD_194	1,87	1,87
MAC_CPD_195	2,35	2,35
MAC_CPD_196	2,16	2,17
MAC_CPD_197	2,46	2,46
MAC_CPD_198	2,39	2,39
MAC_CPD_199	1,98	1,98

Oznaka spoja	t _R samostalno / min	t _R skupina od 3 člana / min
MAC_CPD_200	2,46	2,46
MAC_CPD_201	2,79	2,76
MAC_CPD_202	2,98	2,98
MAC_CPD_203	2,68	2,68
MAC_CPD_204	2,35	2,35
MAC_CPD_205	2,20	2,20
MAC_CPD_206	2,28	2,28
MAC_CPD_207	2,46	/
MAC_CPD_208	2,20	2,24
MAC_CPD_209	1,91	1,91
MAC_CPD_210	2,06	2,09
MAC_CPD_211	2,28	2,31
MAC_CPD_212	2,83	2,83
MAC_CPD_213	1,94	1,94
MAC_CPD_214	2,50	2,53
MAC_CPD_215	2,94	2,94
MAC_CPD_216	2,72	2,76
MAC_CPD_217	2,72	2,76
MAC_CPD_218	2,76	2,76
MAC_CPD_219	2,68	2,72
MAC_CPD_220	2,35	2,39
MAC_CPD_221	2,57	2,57
MAC_CPD_222	2,76	2,79
MAC_CPD_223	2,57	2,57
MAC_CPD_224	2,61	2,65
MAC_CPD_225	2,39	2,42
MAC_CPD_226	2,35	2,39
MAC_CPD_227	2,57	2,61
MAC_CPD_228	1,76	1,76
MAC_CPD_229	2,87	2,90
MAC_CPD_230	2,46	2,50
MAC_CPD_231	3,02	3,05
MAC_CPD_232	2,61	2,61
MAC_CPD_233	2,76	2,79
MAC_CPD_234	2,57	2,57
MAC_CPD_235	2,83	2,83
MAC_CPD_236	2,50	2,53

Napomene:

- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_CPD_105 nije moglo biti očitano jer kromatografski pik nije uočen u kromatogramu.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_CPD_117 i MAC_CPD_207 pri analizi u grupi od tri člana nije moglo biti očitano zbog greške u pripremi uzorka.

8.12. *In silico* clog $D_{7,40}$ vrijednosti dobivene upotrebom ACD/Labs Percepta računalnog programa, Chrom log D vrijednosti dobivene upotrebom CHI metode te Macro log D vrijednosti dobivene upotrebom Macro log D metode za proširenu skupinu makrocikličkih spojeva

Oznaka spoja	clog $D_{7,40}$ ^a	Chrom log D	Macro log D
MAC_CPD_1	/	4,39	2,04
MAC_CPD_2	2,40	3,62	1,44
MAC_CPD_3	0,60	1,35	-0,17
MAC_CPD_4	-0,60	1,07	-0,58
MAC_CPD_5	1,40	1,84	0,21
MAC_CPD_6	-0,10	11,4	-0,17
MAC_CPD_7	1,20	3,46	1,33
MAC_CPD_8	0,70	3,62	1,22
MAC_CPD_9	0,60	2,41	0,62
MAC_CPD_10	2,70	5,27	2,64
MAC_CPD_11	1,80	2,85	0,51
MAC_CPD_12	-0,10	3,17	0,84
MAC_CPD_13	1,80	3,01	1,14
MAC_CPD_14	0,40	1,35	-0,17
MAC_CPD_15	1,30	3,17	1,03
MAC_CPD_16	1,50	2,12	0,43
MAC_CPD_17	-0,90	0,63	-0,69
MAC_CPD_18	3,30	6,89	3,65
MAC_CPD_19	1,20	2,41	0,62
MAC_CPD_20	1,60	2,41	0,62
MAC_CPD_21	-0,10	1,07	-0,39
MAC_CPD_22	0,70	1,96	0,21
MAC_CPD_23	-3,30	0,91	-0,80
MAC_CPD_24	-0,60	1,68	-0,39
MAC_CPD_25	2,50	3,46	1,33
MAC_CPD_26	2,00	3,33	1,22
MAC_CPD_27	3,20	3,46	1,33
MAC_CPD_28	4,00	5,11	2,56
MAC_CPD_29	2,10	6,00	3,05
MAC_CPD_30	3,40	5,88	3,05
MAC_CPD_31	2,10	3,78	1,52
MAC_CPD_32	1,20	2,57	0,73
MAC_CPD_33	2,60	4,67	2,34
MAC_CPD_34	2,50	5,88	2,94
MAC_CPD_35	4,60	7,21	3,95

Oznaka spoja	clog $D_{7,40}^a$	Chrom log D	Macro log D
MAC_CPD_36	1,00	2,57	0,32
MAC_CPD_37	2,90	4,67	2,15
MAC_CPD_38	1,50	3,90	1,63
MAC_CPD_39	3,90	7,38	3,95
MAC_CPD_40	0,20	3,78	0,43
MAC_CPD_41	1,30	2,57	0,84
MAC_CPD_42	0,90	4,22	1,52
MAC_CPD_43	3,00	4,06	1,85
MAC_CPD_44	1,10	3,46	0,43
MAC_CPD_45	1,90	3,62	1,52
MAC_CPD_46	3,00	6,32	2,56
MAC_CPD_47	0,50	2,73	0,84
MAC_CPD_48	2,60	4,22	1,93
MAC_CPD_49	3,20	4,06	1,74
MAC_CPD_50	3,40	6,00	3,16
MAC_CPD_51	3,00	4,95	2,34
MAC_CPD_52	1,60	3,78	1,63
MAC_CPD_53	0,90	3,78	1,22
MAC_CPD_54	2,40	4,39	2,15
MAC_CPD_55	4,00	4,95	2,56
MAC_CPD_56	1,80	4,95	2,23
MAC_CPD_57	0,60	2,57	0,73
MAC_CPD_58	2,40	3,78	1,44
MAC_CPD_59	2,00	4,39	2,04
MAC_CPD_60	1,90	4,83	2,04
MAC_CPD_61	0,20	3,01	0,51
MAC_CPD_62	1,20	2,57	0,73
MAC_CPD_63	1,70	4,67	2,23
MAC_CPD_64	1,10	2,41	0,62
MAC_CPD_65	3,50	4,51	2,15
MAC_CPD_66	0,80	3,62	1,33
MAC_CPD_67	1,40	3,62	1,22
MAC_CPD_68	2,50	3,62	1,52
MAC_CPD_69	3,90	6,16	3,16
MAC_CPD_70	2,10	4,39	2,15
MAC_CPD_71	0,80	4,51	2,04
MAC_CPD_72	1,80	3,33	1,33
MAC_CPD_73	1,10	3,17	1,22
MAC_CPD_74	1,40	2,41	0,73
MAC_CPD_75	1,30	3,01	0,73
MAC_CPD_76	0,20	3,17	0,32
MAC_CPD_77	1,80	3,17	1,22
MAC_CPD_78	3,00	4,39	2,04
MAC_CPD_79	-0,30	2,85	0,73

Oznaka spoja	clog $D_{7,40}^a$	Chrom log D	Macro log D
MAC_CPD_80	1,50	3,46	1,33
MAC_CPD_81	2,70	4,51	2,15
MAC_CPD_82	2,10	3,46	1,33
MAC_CPD_83	-0,10	0,79	-0,58
MAC_CPD_84	3,10	4,39	1,93
MAC_CPD_85	2,60	3,62	1,52
MAC_CPD_86	0,20	1,52	-0,09
MAC_CPD_87	2,40	3,90	1,63
MAC_CPD_88	2,50	5,56	2,64
MAC_CPD_89	1,40	2,57	0,62
MAC_CPD_90	1,00	2,28	0,43
MAC_CPD_91	2,20	4,95	2,34
MAC_CPD_92	1,50	3,01	1,03
MAC_CPD_93	2,60	3,78	1,52
MAC_CPD_94	2,00	2,57	0,73
MAC_CPD_95	1,20	2,57	0,73
MAC_CPD_96	-0,60	1,07	-0,39
MAC_CPD_97	0,00	2,41	0,43
MAC_CPD_98	0,00	1,35	-0,28
MAC_CPD_99	2,00	3,46	1,22
MAC_CPD_100	2,10	3,17	1,14
MAC_CPD_101	3,00	3,62	1,44
MAC_CPD_102	-0,90	0,91	-0,80
MAC_CPD_103	1,00	1,52	-0,09
MAC_CPD_104	0,90	2,85	0,84
MAC_CPD_105	4,40	/	/
MAC_CPD_106	2,50	3,62	1,52
MAC_CPD_107	1,00	2,12	0,43
MAC_CPD_108	3,10	4,39	2,04
MAC_CPD_109	-0,10	1,84	0,02
MAC_CPD_110	1,90	3,33	1,22
MAC_CPD_111	0,40	1,68	0,13
MAC_CPD_112	3,10	4,95	2,23
MAC_CPD_113	3,20	3,33	1,22
MAC_CPD_114	2,10	2,73	0,84
MAC_CPD_115	2,40	3,46	1,33
MAC_CPD_116	2,50	3,62	1,33
MAC_CPD_117	0,70	3,01	0,84
MAC_CPD_118	-0,90	3,78	0,21
MAC_CPD_119	-1,40	0,34	-0,99
MAC_CPD_120	0,90	1,84	0,13
MAC_CPD_121	-0,10	1,23	-0,28
MAC_CPD_122	2,40	3,62	1,44
MAC_CPD_123	-0,10	3,01	-0,28

Oznaka spoja	clog $D_{7,40}^a$	Chrom log D	Macro log D
MAC_CPD_124	2,00	1,68	0,02
MAC_CPD_125	0,60	1,96	0,21
MAC_CPD_126	1,30	1,96	0,32
MAC_CPD_127	1,80	3,78	1,52
MAC_CPD_128	2,30	3,01	1,14
MAC_CPD_129	0,30	2,12	0,02
MAC_CPD_130	0,60	1,23	-0,28
MAC_CPD_131	0,40	1,35	-0,17
MAC_CPD_132	-0,50	2,12	0,02
MAC_CPD_133	-0,90	2,12	-0,69
MAC_CPD_134	0,70	1,52	-0,09
MAC_CPD_135	0,20	1,23	-0,28
MAC_CPD_136	/	2,41	0,43
MAC_CPD_137	2,10	2,85	0,92
MAC_CPD_138	-0,30	1,84	0,02
MAC_CPD_139	-0,10	1,52	-0,17
MAC_CPD_140	1,20	2,85	0,84
MAC_CPD_141	-1,10	1,23	-0,28
MAC_CPD_142	1,00	1,96	0,21
MAC_CPD_143	0,70	2,57	0,62
MAC_CPD_144	0,80	2,57	0,62
MAC_CPD_145	-1,20	0,34	-0,99
MAC_CPD_146	2,20	3,78	1,52
MAC_CPD_147	0,80	1,96	0,21
MAC_CPD_148	1,70	2,73	0,84
MAC_CPD_149	1,50	3,01	1,03
MAC_CPD_150	1,20	3,62	1,44
MAC_CPD_151	0,80	1,23	-0,39
MAC_CPD_152	0,80	4,06	1,63
MAC_CPD_153	0,00	1,68	-0,09
MAC_CPD_154	2,10	7,50	3,95
MAC_CPD_155	3,20	3,78	1,52
MAC_CPD_156	2,50	3,62	1,44
MAC_CPD_157	0,50	3,62	1,44
MAC_CPD_158	1,40	3,78	1,63
MAC_CPD_159	2,30	5,27	2,56
MAC_CPD_160	-0,30	1,96	0,13
MAC_CPD_161	0,00	0,91	-0,88
MAC_CPD_162	-0,60	1,84	-0,17
MAC_CPD_163	0,80	2,73	0,73
MAC_CPD_164	0,90	2,57	0,62
MAC_CPD_165	0,70	2,28	0,43
MAC_CPD_166	0,20	3,01	-0,09
MAC_CPD_167	1,00	2,57	0,62

Oznaka spoja	clog $D_{7,40}^a$	Chrom log D	Macro log D
MAC_CPD_168	2,50	3,62	1,52
MAC_CPD_169	0,00	1,52	-0,09
MAC_CPD_170	0,90	3,46	0,32
MAC_CPD_171	0,80	3,78	0,32
MAC_CPD_172	2,00	2,85	0,62
MAC_CPD_173	0,50	1,96	0,32
MAC_CPD_174	1,30	3,01	1,03
MAC_CPD_175	1,10	2,57	0,62
MAC_CPD_176	0,80	2,57	0,84
MAC_CPD_177	0,70	2,28	0,13
MAC_CPD_178	0,70	0,79	-0,69
MAC_CPD_179	0,20	1,68	-0,28
MAC_CPD_180	-0,70	1,68	0,02
MAC_CPD_181	1,10	3,01	1,03
MAC_CPD_182	-1,10	1,35	-0,17
MAC_CPD_183	0,30	1,68	-0,17
MAC_CPD_184	-0,60	2,41	-0,58
MAC_CPD_185	-0,20	3,17	-0,20
MAC_CPD_186	2,00	2,41	0,62
MAC_CPD_187	0,80	2,12	0,43
MAC_CPD_188	1,90	2,12	0,43
MAC_CPD_189	2,10	3,01	1,03
MAC_CPD_190	1,20	2,28	0,43
MAC_CPD_191	-1,70	1,68	-0,80
MAC_CPD_192	0,80	1,84	0,13
MAC_CPD_193	2,10	3,78	0,84
MAC_CPD_194	-0,60	0,91	-0,69
MAC_CPD_195	0,70	3,46	0,62
MAC_CPD_196	-1,70	2,28	0,10
MAC_CPD_197	0,60	3,01	0,92
MAC_CPD_198	1,00	2,73	0,73
MAC_CPD_199	-1,10	1,52	-0,39
MAC_CPD_200	2,10	4,22	0,92
MAC_CPD_201	2,80	4,06	1,82
MAC_CPD_202	2,60	4,95	2,34
MAC_CPD_203	2,70	3,78	1,52
MAC_CPD_204	1,00	2,73	0,62
MAC_CPD_205	1,00	1,84	0,21
MAC_CPD_206	1,90	2,12	0,43
MAC_CPD_207	1,90	2,85	0,92
MAC_CPD_208	1,10	1,96	0,21
MAC_CPD_209	-0,10	0,79	-0,58
MAC_CPD_210	0,20	1,52	-0,17
MAC_CPD_211	3,00	2,28	0,43

Oznaka spoja	clog $D_{7,40}$ ^a	Chrom log D	Macro log D
MAC_CPD_212	1,60	4,39	1,93
MAC_CPD_213	-0,10	1,07	-0,50
MAC_CPD_214	1,60	3,17	1,03
MAC_CPD_215	2,50	4,51	2,23
MAC_CPD_216	1,80	4,83	1,63
MAC_CPD_217	2,30	3,78	1,63
MAC_CPD_218	2,40	3,90	1,74
MAC_CPD_219	2,40	3,90	1,52
MAC_CPD_220	1,10	2,41	0,62
MAC_CPD_221	1,20	3,62	1,22
MAC_CPD_222	2,70	4,06	1,74
MAC_CPD_223	1,80	3,17	1,22
MAC_CPD_224	2,80	3,62	1,33
MAC_CPD_225	1,20	3,46	0,73
MAC_CPD_226	1,50	2,41	0,62
MAC_CPD_227	1,40	3,78	1,22
MAC_CPD_228	0,60	0,34	-0,99
MAC_CPD_229	2,30	4,39	2,04
MAC_CPD_230	1,50	2,85	0,92
MAC_CPD_231	1,20	5,11	2,45
MAC_CPD_232	2,10	3,78	1,33
MAC_CPD_233	1,30	4,22	1,74
MAC_CPD_234	2,40	3,62	1,22
MAC_CPD_235	2,30	4,22	1,93
MAC_CPD_236	0,50	3,17	1,03

^a ACD/Labs Percepta *in silico* izračun

Napomene:

- Za spojeve MAC_CPD_1 i MAC_CPD_136 clog $D_{7,40}$ vrijednost nije mogla biti izračunata upotrebom ACD/Labs Percepta računalnog programa.
- Vrijeme zadržavanja spoja MAC_CPD_105 nije moglo biti očitano jer kromatografski pik nije uočen u kromatogramu.

9. ŽIVOTOPIS

I. Osobni podaci

Ime i prezime: Petra Mišetić rođ. Pažin

Datum i mjesto rođenja: 11. prosinca 1986., Metković, Hrvatska

II. Podaci o školovanju

1993. – 2001. Osnovna škola Stjepana Radića, Metković

2001. – 2005. Gimnazija Metković, jezično usmjerenje

2005. – 2008. Preddiplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta pri Sveučilištu u Zagrebu

2008. – 2010. Diplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta pri Sveučilištu u Zagrebu, smjer analitička i anorganska kemija

2012. – 2024. Poslijediplomski studij „Medicinska kemija“ na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova pri Sveučilištu u Rijeci

III. Podaci o zaposlenju

Studenj 2010. – Medicinski kemičar u odjelu Sintetske kemije, Galapagos
Lipanj 2013. istraživački centar Zagreb d.o.o., zatim Fidelita istraživački centar Zagreb d.o.o.

Lipanj 2013. – Analitičar u odjelu Analitičke kemije, Fidelita istraživački centar Zagreb d.o.o.
Prosinac 2015.

Prosinac 2015. – Bioanalitičar u odjelu Metabolizma i farmakokinetike
Travanj 2020. lijekova, Fidelita istraživački centar Zagreb d.o.o.

Travanj 2020. – Vodeći znanstvenik – Voditelj tima u odjelu Metabolizma i farmakokinetike lijekova, Fidelita istraživački centar Zagreb d.o.o., zatim Selvita d.o.o

IV. Popis znanstvenih radova u časopisima

1. V. Rep, M. Piškor, H. Šimek, P. Mišetić, P. Grbčić, J. Padovan, V. Gabelica Marković, D. Jadreško, K. Pavelić, S. Kraljević Pavelić, S. Raić-Malić, *Purine and Purine Isostere Derivatives of Ferrocene: An Evaluation of ADME, Antitumor and Electrochemical Properties*, *Molecules* 25 (2020) 1570.
2. T. Zorbaz, P. Mišetić, N. Probst, S. Žunec, A. Zandona, G. Mendaš, V. Micek, N. Maček Hrvat, M. Katalinić, A. Braiki, L. Jean, P.-Y. Renard, V. Gabelica Marković, Z. Kovarik, *Pharmacokinetic Evaluation of Brain Penetrating Morpholine-3-hydroxy-2-pyridine Oxime as an Antidote for Nerve Agent Poisoning*, *ACS Chem. Neurosci.* 11 (2020) 1072–1084.
3. A. Zandona, N. Maraković, P. Mišetić, J. Madunić, K. Miš, J. Padovan, S. Pirkmajer, M. Katalinić, *Activation of (un)regulated cell death as a new perspective for bispyridinium and imidazolium oximes*, *Arch Toxicol* 95 (2021) 2737–2754.
4. A. Zandona, J. Madunić, K. Miš, N. Maraković, P. Dubois-Geoffroy, M. Cavaco, P. Mišetić, J. Padovan, M. Castanho, L. Jean, P.-Y. Renard, S. Pirkmajer, V. Neves, M. Katalinić, *Biological response and cell death signaling pathways modulated by tetrahydroisoquinoline-based aldoximes in human cells*, *Toxicology* 494 (2023) 153–588.

V. Priopćenja na znanstvenim skupovima

Predavanja:

1. *Biomimetic chromatographic parameters in drug discovery*, 17th International Chromatography School (ICS), 2017., Zagreb, Hrvatska

Poster:

1. P. Mišetić, M. Ilijaš, S. Koštrun, V. Gabelica Marković, *High-throughput lipophilicity determinations of novel macrolide inspired macrocycles*, 2014., Lisabon, Portugal

VI. Stručno usavršavanje

1. 11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics, 2012., Primošten, Hrvatska
2. 7th EFMC Short Course on Medicinal Chemistry – Principles of Molecular Recognition, 2013., Oegstgeest, Nizozemska
3. Interpretation of MS and MS-MS Mass Spectra, 2013., Zagreb, Hrvatska
4. 14th PhysChem Forum, 2014., East Grinstead, Velika Britanija
5. 2nd Anglo-Croatian Medicinal symposium on Macrocycles – Medicinal Chemistry and Beyond-the-Rule-of Five, 2016., Zagreb, Hrvatska
6. HPLC I UPLC: Rješavanje i sprečavanje problema + DSP radionica, 2016., Zagreb, Hrvatska
7. X500R Training for Small Molecules ,Metabolite and Peptides, 2018., Zagreb, Hrvatska
8. DMDG Fundamentals of DMPK Course, 2019., Loughborough, Velika Britanija
9. DMDG *In Vitro* Technology Course, 2021., *online*