

**Universitatea “Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică  
Catedra de Chimie Organică**

**Sanda – Rodica Radu (Bota)**

**CONTRIBUȚII LA CHIMIA ALCALOIZILOR CINCHONA**

*Rezumatul tezei de doctorat*

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:  
Prof. dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu**

**Cluj-Napoca 2012**

## CUPRINS

1. INTRODUCERE	p.1
2. IMPORTANȚA FARMACOLOGICĂ A ALCALOIZILOR CINCHONA	p.3
3. PARTICULARITĂȚI STRUCTURALE ALE ALCALOIZILOR CINCHONA	p.5
4. CHIMIA ALCALOIZILOR CINCHONA	p.7
4.1. Preparare QCI și QCD	p.7
4.2. Reacții ale ciclului chinolidinic	p.8
4.3. Reacții ale grupei vinil C3	p.10
4.4. Reacții ale grupei C9OH	p.19
4.5. Metode de analiză	p.35
4.5.1. Metode cromatografice	p.35
4.5.2. Metode colorimetrice	p.38
5. CONTRIBUȚII PERSONALE	p.39
5.1. Sinteza derivaților alcaloizilor cinchona prin reacții de substituție	p.39
5.1.1. Sinteza O-mesililor derivaților	p.39
5.1.2. Sinteza 3-hidroxi-2-(chinolin-4-il)-6-vinil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan	p.44
5.1.3. Sinteza 2-chinolin-4-il-6-vinil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan-3-carbonitril	p.48
5.1.4. Sinteza esterilor acidului metansulfonic 3-hidroxi-2-(chinolin-4-il)-6-vinil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan	p.50
5.1.5. Reacții de oxidare	p.51
5.1.6. Reacții de condensare cu compuși cu azot	p.52
5.2. Sinteza unor noi esteri ai QCI și QCD	p.54
5.2.1. Sinteza clorurii de acid	p.57
5.2.2. Sinteza esterilor 1,2-aminoalcoolilor QCI și QCD	p.57
5.2.3. Sinteza esterilor 1,2-diamidei QCDNH <sub>2</sub>	p.61
5.3. Studiul sintezei cinconidinei	p.64
5.3.1. Sinteza cinconidinonei	p.65
5.3.2. Reducerea cinconidinonei la tartrat de cinconidinei	p.67
5.4. Elaborarea și validarea metodei cromatografice de analiză a QCI-ASA	p.72
5.4.1. Elaborarea metodei de analiză prin cromatografie HPLC a QCI-ASA	p.73
5.4.2. Validarea metodei de analiză	p.80
6. PARTEA EXPERIMENTALĂ	p.89
7. CONCLUZII	p.112
BIBLIOGRAFIE	p.114

**Cuvinte cheie:** Alcaloizi cinchona, substituție nucleofilă, azabicyclo[3.2.2]nonan, oxidare Swern, condensare cu compuși cu azot, esteri ai QCI, QCD, amide ale alcaloizilor truncați, oxidare, separarea enantiomerilor, analiza HPLC, validarea metodei HPLC

## 1. INTRODUCERE

Alcaloizii cinchona sunt cei mai importanți compuși din clasa alcaloizilor fiind izolați din scoarța arborilor *Cinchona* și *Rubiaceous genera* și sunt molecule organice cu o istorie interesantă. Istoria utilizării lor datează de la începutul secolului XVII, atunci când au fost introduse pentru prima dată în Europa după descoperirea proprietăților antimalarice a extractului din scoarța arborilor cinchona și izolarea principiului activ de către P.J. Pelletier și J.B. Caventou în 1820. [13,14] Din scoarța arborilor se extrag circa 30 compuși. Conținutul în alcaloizi al scoarței variază între 5 – 16%. Principalii componenți ai extractului sunt chinină **1** (60-85%), chinidină **2**, cinconina **3** și cinconidină **4**. De peste 300 de ani alcaloizii cinchona joacă un rol important în medicină și mai nou în sinteza organică.

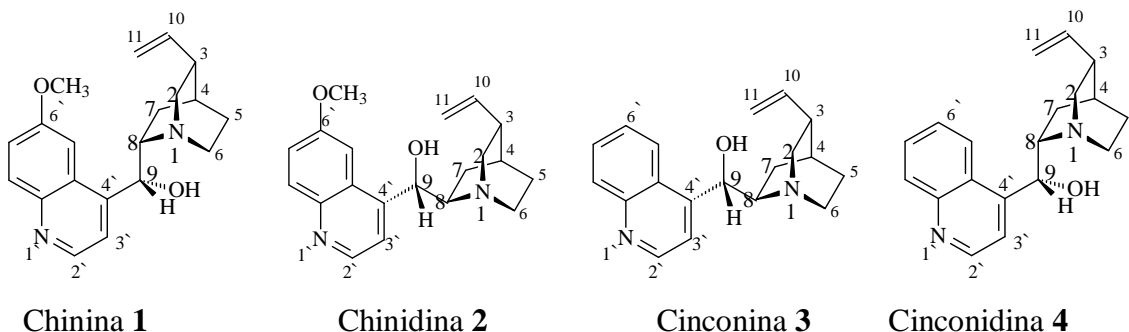
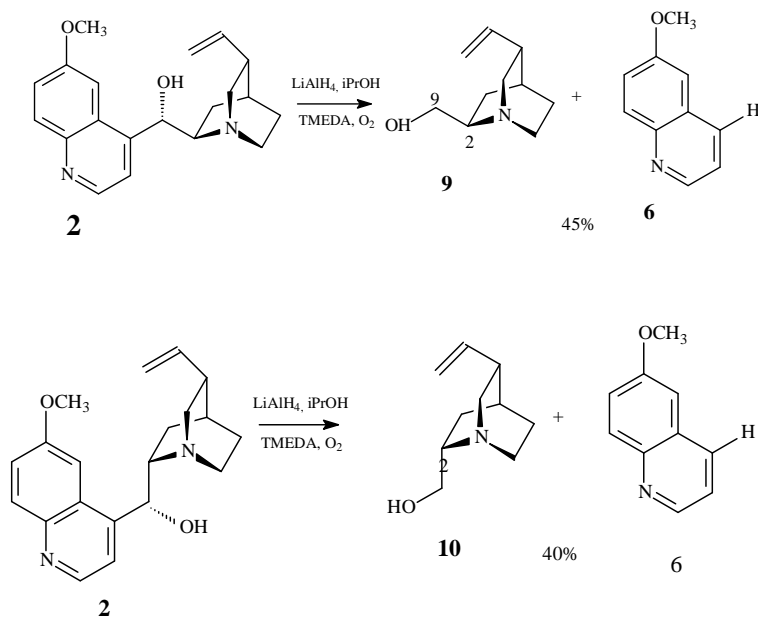


Figura.1.1. Structura alcaloizilor cinchona

Structural alcaloizii cinchona sunt formați dintr-un inel chinolinic și legat de un heterociclu voluminos, chinuclidinic printr-un carbon C<sub>9</sub> legat de o grupare OH (figura 1.1). Acesta este unul din cei patru centrii chirali ai moleculei. Doar C<sub>8</sub> și C<sub>9</sub> pot avea configurații diferite. Centrii chirali C<sub>8</sub> și C<sub>9</sub> sunt S și R în compusul chinină respectiv R și S în chinidină ambii fiind izomeri eritro. Epimerii acestor compuși sunt 8S și 9S în cazul epichininei și respectiv 8R și 9R în cazul epichinidinei, acești compuși fiind izomerii treo [22].

Hoffmann și colaboratorii au reușit scindarea a alcaloizilor cinchona la derivați chinolinici enantiomerici puri, 1-azabicyclo[2.2.2]octan. Acest proces s-a realizat printr-o reacție de reducere concomitent cu oxidare simultană prin expunere la aer. Reacția are loc în eter sau tetrahidrofuran [33]. În cursul investigațiilor au fost testați diverși agenți de reducere, cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul în care s-a utilizat hidrură de litiu și aluminiu. Faptul că

această reacție are loc numai în cazul în care reducerea are loc în prezența unui agent oxidant, sugerează că mecanismul este mai complicat (Schema 1.1)[34].



Schema 1.1.

În ultimele două decenii, alcaloizii cinchona au apărut ca auxiliari chirali fiind repere în sinteza asimetrică. Mai recent, s-a dovedit că alcaloizii cinchona pot fi supuși unor transformări remarcabile cu modificări a scheletului, lărgind rapid perspectiva chimiei alcaloizilor cinchona.

Caracteristica cheie responsabilă pentru derivatizarea cu succes a alcaloizilor cinchona este faptul că ei posedă un schelet chiral cu mai multe grupe funcționale fiind posibile transformări prin diverse tipuri de reacții, caracteristice acestora.

Gruparea hidroxil legată de C9 poate suferii reacțiile caracteristice acestei grupe funcționale: reacții de esterificare, substituția grupării –OH și reacții de extindere a ciclului. Importanța practică a unor produși rezultați prin reacție de substituție la C9, ne-a reținut atenția și a orientat cercetările în vederea sintezei de noi produși. [166]

## 2. CONTRIBUȚII PERSONALE

În cadrul contribuțiilor personale am urmărit următoarele aspecte:

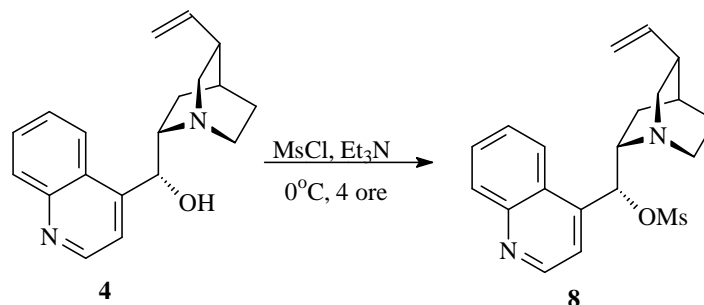
- Sinteza unor noi derivați a alcaloizilor cinchona prin reacții de substituție
- Sinteza unor noi derivați al alcaloizilor cinchona truncați prin reacții de esterificare
- Optimizarea reacțiilor de obținere a cinconidinei din cinconina
- Elaborarea metodelor cromatografice HPLC pentru produșii sintetizați

### 2.1. Sinteza derivaților alcaloizilor cinchona prin reacții de substituție

În acest capitol sunt prezentate sintezele unor derivați ai alcaloizilor cinchona prin derivatizarea grupării C9OH.

#### 2.1.1. Sinteza 9-metansulfoniloxi derivaților cinconinei și cinconidinei

Studiindu-se reacțiile de substituție la carbonul C9, s-a determinat că O-mesil derivatul se obține în condiții blânde, cu randamente bune. O-mesil derivatul alcalizilor cinchona activează molecula facilitând reacțiile de substituție la atomul de carbon C9. Metoda de sinteză a fost cea descrisă în literatură [100], prin reacția dintre cinconidina și clorura acidului metansulfonic (MsCl) în prezență de trietilamină (schema 2.1)



Schema. 2.1

Pentru obținerea [3S,4S,8S,9R]-metansulfoniloxi-5-vinil-cinconan **8** (O-mesilcinconidina), 1 mol cinconidina **4** reacționează cu 1,5 moli MsCl utilizând ca solvent THF. Reacția are loc în prezență de trietilamina, raport molar cinconidina:Et<sub>3</sub>N 1:2,2 moli (schema 2.1). Definitivarea reacției a fost monitorizată prin cromatografie pe strat subțire, eluentul fiind MTBE:Metanol 3:1. Produsul de reacție se purifică prin cromatografie pe coloana. O-mesil-

cinconidina **8** se prezintă sub formă de cristale aciculare bej, a fost caracterizat prin spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$ , IR și analiză elementală.

Pentru optimizarea sintezei O-mesilcinconidinei **8** s-au efectuat experimente, variind raportul molar al reactanților, cinconidină:MsCl. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2.1.

Tabel 2.1. Condițiile reacției de obținere a O-mesilcinconidinei **8**

Nr. Probă	Raport molar Cd: MsCl	Solvent	Timp de reacție (ore)	Temp (°C)	Rand. (%)
1	1:1	THF	3	0	56
2	1:1,3	THF	4	0	72
3	1:1,5	THF	4	0	80
4	1:1,8	THF	5	0	82

Randament de sinteză de 80% s-a obținut în cazul în care reacția are loc cu un exces de 50% de MsCl de 1:1,5, timpul de reacție fiind de 4 ore. Dacă s-a mărit raportul reactanților la 1:1,8 randamentul nu crește semnificativ, la 82 %, fiind necesară și creșterea timpului de reacție (5 ore).

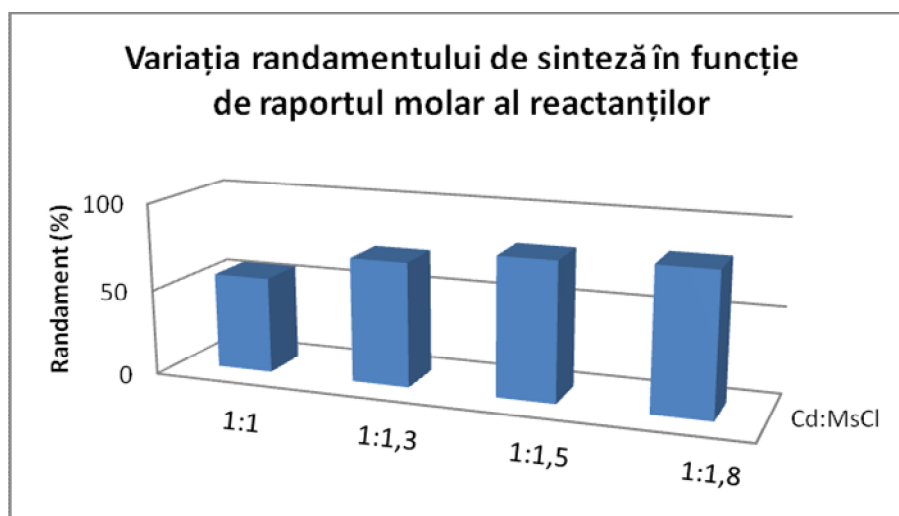
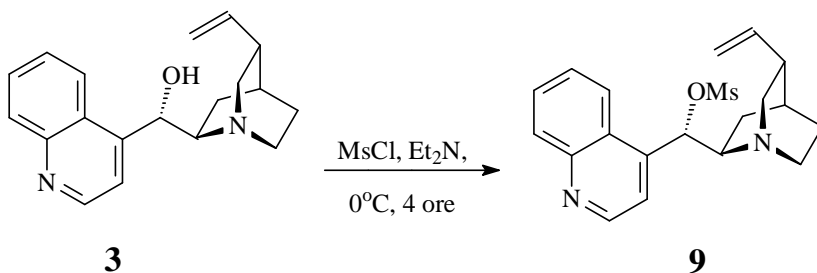


Figura 2.1. Variația randamentului de sinteză a compusului **97** în funcție de raportul reactanților

În spectrul IR (figura 5.2) s-a pus în evidență prezența grupării  $\text{SO}_2$  (esteri ai acizilor sulfonici) prin benzile de absorbție prezente la  $1325$  și  $1139 \text{ cm}^{-1}$ , datorate vibrațiilor de alungire  $\text{S} = \text{O}$

Sinteza [3R,4S,8S,9R]-metansulfoniloxi-5-vinil-cinconan (O-mesilcinconina) **9** s-a realizat prin reacția cinconinei **3** cu  $\text{MsCl}$  în prezență de trietilamină,[141] reacție care este prezentată în schema 2.2.



Schema 2.2

Pentru obținerea O-mesilcinconina **9**, 1 mol cinconina (CN) **3** reacționează cu 1,5 moli clorura de mesil ( $\text{MsCl}$ ) în tetrahidrofuran (THF) utilizat ca solvent. Reacția are loc în prezență în exces de trietilamină (TEA) (CN:TEA=1:2,2 moli). Sfârșitul reacției se verifică prin cromatografie pe strat subțire. Produsul de reacție se purifică prin cromatografie pe coloana. După evaporarea solventului se obține produsul dorit cu randament 76,6%. O-mesilcinconina se prezintă sub formă de cristale aciculare bej. Produsul a fost caracterizat prin spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN, IR și analiza elementală.

Pentru determinarea raportului optim a reactanților s-au efectuat experimente utilizând cantități diferite de reactanți. Rezultatele sunt rezentate în tabelul 2.2, figura 2.2.

Tabel 2.2. Condițiile reacție de obținere a compusului O-mesilcinconinei **9**

Nr. probă	Raport molar CN: MsCl	Solvent	Timp de reacție (ore)	Temp (°C)	Rand. (%)
1	1:1	THF	3	0	49
2	1:1,3	THF	4	0	63
3	1:1,5	THF	4	0	76
4	1:1,8	THF	5	0	79

Rezultate obținute s-au obținut în cazul în care s-au efectuat experimentele cu un raport molar al reactanților cinchonina:MsCl de 1:1,5. Creșterea cantității de reactiv MsCl, peste un exces de 50%, nu duce la creșterea semnificativă a randamentului sintezei. În aceleași condiții de reacție, sinteza O-mesilcinconidinei **8** are loc cu randament mai mare (80%) în comparație cu cea a O-mesilcinconinei **9** (76%) datorită structurii substratului existând un impediment steric, care defavorizează reacția.

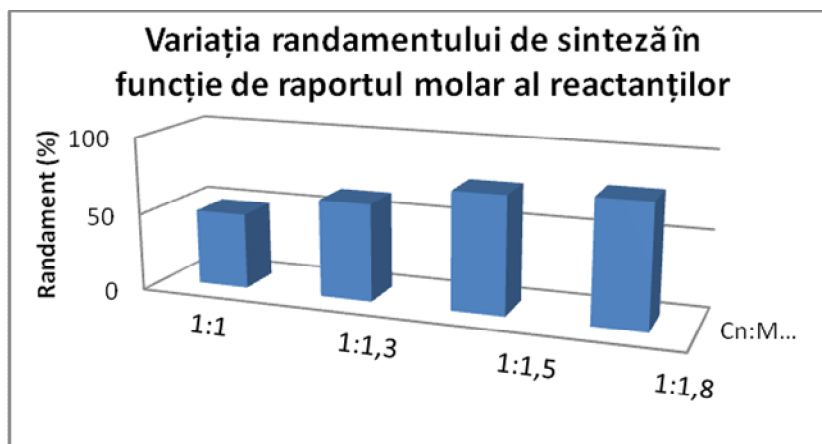


Figura 2.2. Variația randamentului de sinteză O-mesilcinconinei **9** în funcție de raportul molar a reactanților

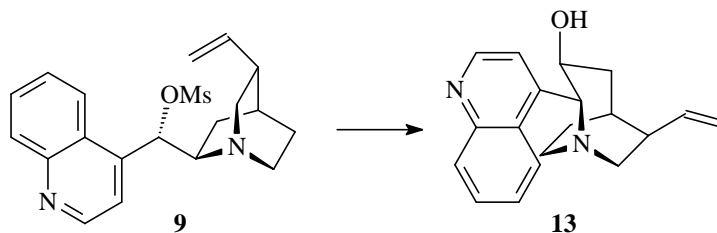
Structura compusului sintetizat a fost confirmată, în spectrul IR (figura 5.4) înregistrat, prin prezența benzilor situate la  $1325\text{ cm}^{-1}$  și  $1139\text{ cm}^{-1}$  caracteristice cuplajului vibrațional al grupării S = O.

### 2.1.2. Sinteza 3-hidroxi-2-(chinolin-4-il)-6-vinil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan

Cinchonina **3** și cinconidina **4** cu configurația C9-naturală, în anumite condiții, suferă transformări denumite transpoziții de ordin II. [130,131].

Studiind proprietățile O-mesilcinconinei **9** s-a constatat că acest compus este foarte puțin solubil în apă rece, dar solubilitatea crește mult la cald. În urma încălzirii s-a observat desfășurarea reacției de lărgire de ciclu cu formare de amine  $\beta$ -substituite, (1S,2R,5R,6R)-3-hidroxi-2-(chinolin-4-il)-6-vinil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan, **13**, păstrându-se configurației atomilor de carbon chirali. (schema 2.3)





Schema 2.3

Reacția a fost realizată cu soluție diluată de O-mesilcinconina **9** (concentrație 10%), la reflux, în atmosferă de azot, utilizând apă pură. Sfârșitul reacției a fost verificat prin cromatografie pe strat subțire. Purificarea compusului **13** se realizează prin cromatografie pe coloană pe silica gel, utilizând faza mobilă MTBE:MeOH=3:1. Obținerea compusului dorit a fost confirmată prin H-RMN, spectrometrie IR și de masă și analiză elementală.

Pornind de la considerentul că reacția nu este favorizată de prezența protonilor în mediu de reacție [147], ca produs secundar se obține acid metansulfonic, s-a urmărit influența adaosului de compuși cu caracter bazic asupra randamentului de sinteză a compusului **13**. Pentru acest studiu s-au adăugat compuși cu caracter bazic, în acest mod fiind neutralizat și acidul metansulfonic format ca produs secundar în această reacție. S-a studiat influența următorilor compuși:  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ , benzoat de sodiu. Carbonații prin hidroliză apoasă generează ioni hidroxil, la fel ca și în cazul dizolvării hidroxidului de sodiu în apă. Benzoat de sodiu s-a introdus în amestecul de reacție deoarece în literatură sunt prezentate date privind influența acestor compuși în reacțiile de transpoziție a alcaloizilor cinchona. [130] Rezultatele sunt prezentate în tabelul nr. 2.3, figura 2.3.

Tabel nr.2.3. Condițiile reacției de obținere a compusului **13**

Proba	Bază	Concentrație (%)	Timp (ore)	Randament (%)
1	$\text{NaHCO}_3$	8	16	23
2	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	10	5	39
3	$\text{NaOH}$	5	3	52
4	BeNa	10	4	30
5	Apă	-	4	51

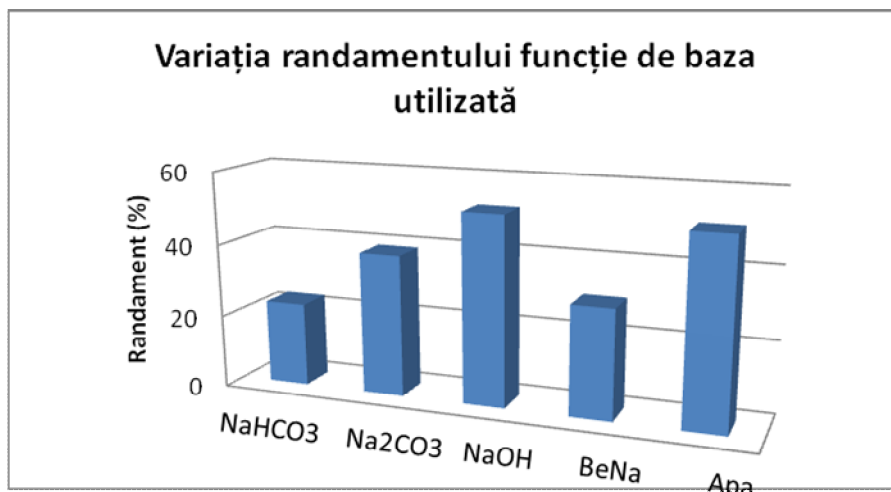
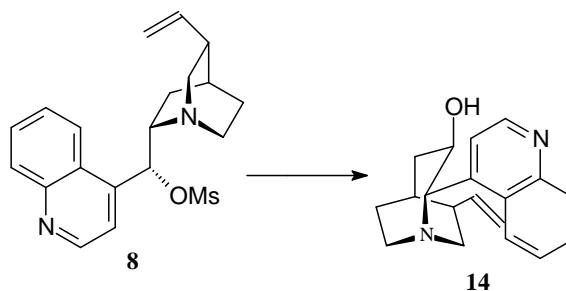


Figura 2.3. Variația randamentului în funcție de baza utilizată în sinteza compusului **13**

Rezultate bune se obțin în cazul reacției efectuate în soluție NaOH și în apă pură, randamentele fiind practic egale. În cazul în care reacția are loc doar cu apă pură, caracterul bazic al atomului de azot terțiar din molecula alcaloidului cinchona influențează favorabil reacția. Datorită avantajelor reacției utilizând ca reactivi doar apa, fiind practic un proces aparținând ”green chemistry”, se consideră optim acest mod de lucru. În spectrul IR s-au pus în evidență benzi caracteristice legăturii C – O, de vibrație, 1227 cm<sup>-1</sup> și a legăturii O – H, întindere în plan, la 1338 cm<sup>-1</sup>. În spectrul de masă s-au pus în evidență picul de bază 293(M<sup>+</sup>) și a picului ionului molecular 294. Aceste picuri confirmă masa moleculară a compusului.

În literatură se prezintă că O-mesilcinconidina **8** poate reacționa în mod asemănător, având loc transpoziția, cu extindere de ciclu. (Schema 2.4)



Schema 2.4

Reacția a fost realizată cu soluție diluată, apoasă de O-mesilcinconina **8** (concentrație 10%), la reflux, în atmosferă de azot. Sfârșitul reacției a fost monitorizat prin cromatografie pe strat subțire, eluentul fiind MTBE:Metanol 1:9, detecția UV. Purificarea compusului **14** s-a

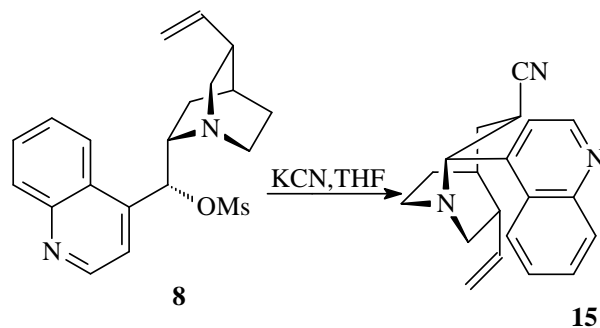
realizat prin cromatografie pe coloană, pe umplură silica gel. Randamentele obținute în acest caz sunt mai mari în comparație cu cele obținute în cazul în care substratul este derivatul cinconinei **14**, explicabil prin favorizarea sterică a reacției (62% față de 51%). Obținerea compusului s-a verificat prin spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$ , IR, de masă și analiză elementală.

### 2.1.3. Sinteza 2-chinolin-4-il-6-vinil-1-aza-biciclo[3.2.2]nonan-3-carbonitril

Reacțiile prin care se formează noi legături C – C sunt în importante pentru sinteza organică. Una din reacțiile posibile prin care se poate lungi catena cu un atom de carbon este sinteza nitrililor și derivatizarea ulterioară a compușilor sintetizați. Din acest motiv am efectuat reacția de transpoziție în prezența ionului cian ca nucleofil.

Sinteza 2-chinolin-4-il-6-vinil-1-aza-biciclo[3.2.2]nonane-3-carbonitrilul **15** s-a realizat prin reacția dintre O-mesilcinconinei **8** și nucleofilul KCN (exces), conform schemei 2.5.

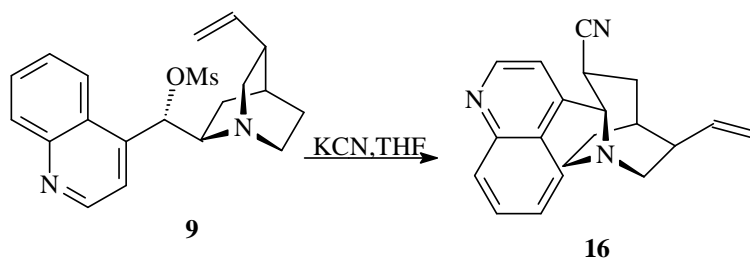
Reacția a fost efectuată în solvent 2,2,2-trifluoroetanol (THF), cu un raport molar al reactanților O-mesilcinconidina **8**:KCN de 1:3, în atmosferă de azot, la temperatura de 89-90°C timp de 3 zile. Sfârșitul reacției se monitorizează prin cromatografie pe start subțire, pe plăci de silica gel, utilizând ca eluent amestecul MTBE:MeOH 3:1. Separarea compusului **15** s-a realizat prin cromatografie lichidă pe coloană cu silicagel utilizând eluent eter etilic:metanol 9:1.



Schema 2.5

Randamentul de reacție mai modest, de numai 59,5 % se datorează nucleofilicității mai scăzute a ionului cianură. În cazul în care s-a efectuat această reacție cu același raport molar al reactanților, introducând trietilamină (O-mesilcinconidina:Et<sub>3</sub>N = 1:1) s-a obținut produsul dorit, sub formă de lichid galben intens, cu randament mai mic, de 46,2%. Obținerea compusului s-a verificat prin spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$ , IR și analiză elementală.

Reacția având ca substrat O-mesilcinconina, cu nucleofil cianură de potasiu, s-a efectuat în aceleași condiții, obținându-se nitrilul **16**.(schema 2.6)

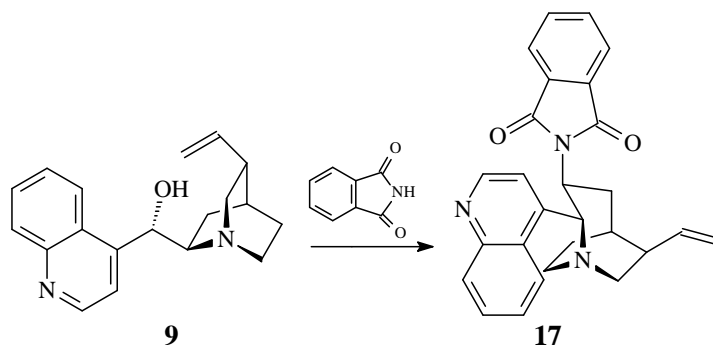


Schema 2.6

Randamentul de sinteză a compusului **16** este 43,14%, randament mai scăzut explicat prin împiedicarea sterică a substratului. Produsul a fost caracterizat prin spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$  și analiză elementală.

#### 2.1.4.Sinteza 2-(Chinolin-4'-il)-6-vinil-1-azabiciclo[3.2.2]nonan-3-il-amina

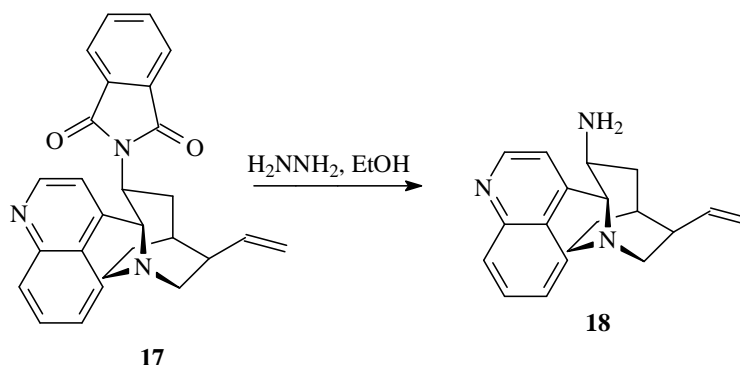
În 1972, Mitsunobu a prezentat o reacție caracteristică de derivatizare a alcoolilor primari și secundari în prezența unor nucleofili, de ex. nucleofili cu azot. Reacția are loc cu succes utilizând ca nucleofil, ftalimida. S-a efectuat această reacție utilizând ca substrat O-mesilcinconina **9** (schema 2.7)



Schema 2.7

Reacția are loc în prezență de t-butilamină, solventul fiind 2,2,2-trifluoroetanol. Separarea compușilor din masa de reacție s-a efectuat prin cromatografie pe coloană cu umplutură silica gel, eluentele fiind amestecul eter etilic-metanol 9:1. Pentru a separa produsul de reacție pur a fost nevoie de două separări succesive. Randamentul de reacție este mic, de numai 17,5%. Compusul (2-(Chinolin-4'-il)-6-vinil-1-azabiciclo[3.2.2]nonan-3-il)-ftalimida **17** astfel sintetizat a fost caracterizat prin spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$  și analiză elementală.

Prin hidrazinoliza compusului **17** în mediu alcoolic, se obține aminoderivatul, corespunzător **18**, cristale albe, cu randament de 52%, conform schemei 2.8.

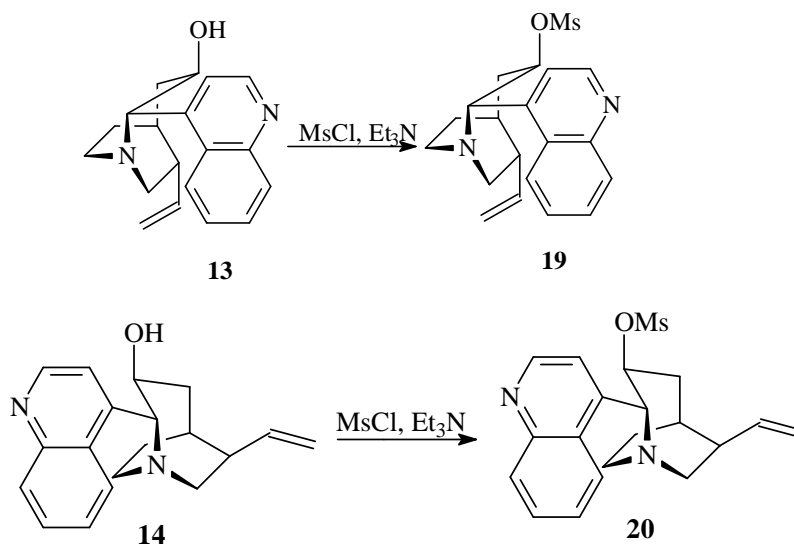


Schema 2.8

Reacția s-a efectuat cu un exces de hidrazină, raport molar **17**:hidrazina = 1:1,3 moli, în alcool etilic anhidru. Timpul de reacție a fost de 50 ore, reacția fiind monitorizată prin cromatografie pe strat subțire, eluentul fiind eter etilic-etanol-sol amoniac 25% 50:12:1. Amina **18** s-a separat din masa de reacție prin cromatografie pe coloana. Produsul finit, cristale aciculare albe, a fost caracterizat prin spectroscopie  $^1\text{HRMN}$  și analiză elementală.

#### 2.1.5. Sinteza esterilor acidului metansulfonic al 3-hidroxi-2-(chinolin-4-il)-6-vinil-1-azabicyclo[3.2.2]nonan

Grupa OH poate suferi cu ușurință reacții de esterificare. În literatură se indică că pentru a se putea realiza reacții de substituție, este necesar ca molecula alcaloizilor cinchona să fie într-o primă etapă activată prin transformarea într-un ester, de exemplu cu acid metansulfonic. Cu clorura acidului metansulfonic reacția decurge în condiții relativ blânde și cu randament bun. pentru a neutraliza acidul clorhidric format în timpul reacției( schema 2.9), reacția are loc în prezență de trietilamină. Se utilizează un exces de clorură de mesil, raport molar alcool:MsCl = 1:1,5. Mesilderivații astfel obținuți poate fi supus reacțiilor de substituție, gruparea OMs fiind o grupare ușor substituibilă.

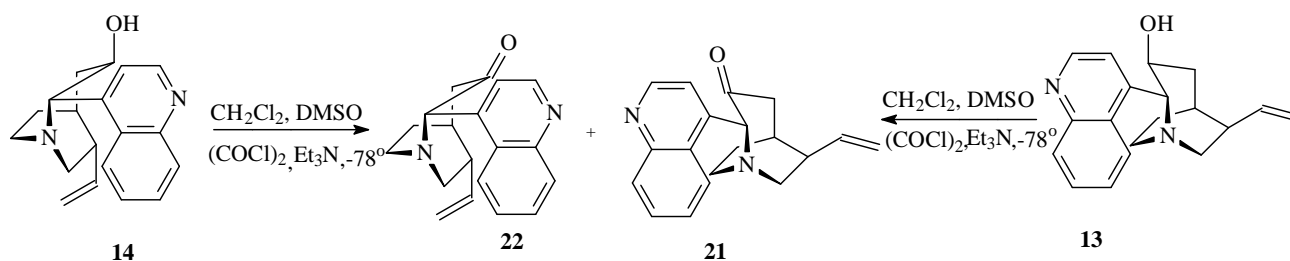


Schema 2.9

În cursul reacției se formează produs secundar acid clorhidric fiind necesar adăugarea de trietilamină pentru deplasarea echilibrului spre sinteza produsului dorit. Se obțin O-mesili derivații sub formă de cristale aciculare de culoare galbenă cu randament de 65,65% în cazul compusului **19** și respectiv 36,8% în cazul compusului **20**. Obținerea compusului a fost confirmată prin spectrometrie  $^1\text{HRMN}$  și analiză elementală

### 2.1.6. Reacții de oxidare

Reacția cu dimetilsulfoxid (DMSO) în prezență de activatori electronici (oxidarea Swern) s-a dovedit o metodă de oxidare blândă mult utilizată pentru transformarea alcoolilor la compuși carbonilici. Oxidarea Swern [165] a  $\beta$  – aminoalcoolilor **13** și **14** duce la formarea unui amestec de epimeri,  $\alpha$ -aminocetonelor azabiciclici **21** și **22** în raport molar 2:1 (schema 2.10)



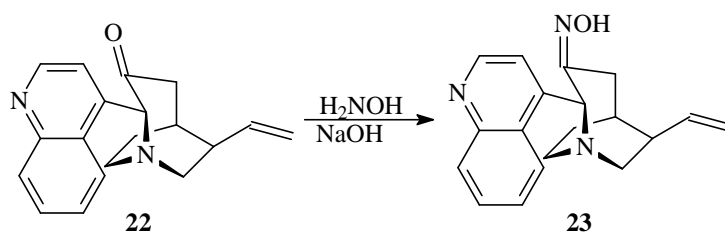
Schema 2.10

Reacția de oxidare s-a realizat cu un raport molar clorură de oxalil și DMSO 1:1, solventul fiind  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Reacția are loc la temperatura de  $-78^\circ\text{C}$ . Indiferent care compus hidroxic se supune reacției de oxidare, compusul **13**, respectiv **14**, acesta se dozează în masa de reacție în raport molar 1:2 față de agentul de oxidare. Separarea masei de reacție și purificarea cetonei s-a realizat prin cromatografie lichidă, pe coloană cu umplutură silicagel, eluent fiind MTBE:MeOH 9:1. Cetona **22**, separată și purificată a fost caracterizată prin spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN, IR și analiză elementală.

S-a constatat echilibrul între compusul **22** și **21** se menține constant. Dacă compusul **22** separat prin cromatografie lichidă se păstrează în laborator la temperatura camerei timp de 48 ore, se constată că se transformă parțial în compus **21**, respectând raportul **22:21** de 2:1.

### 2.1.7. Reacții de condensare cu compuși cu azot

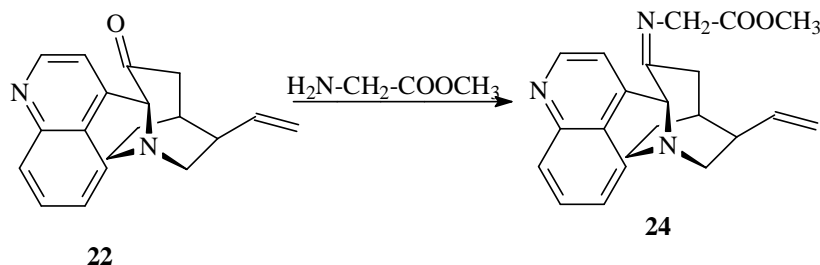
Prin tratarea cetonelor cu săruri ale hidroxilaminei (clorhidrat), în soluție apoasă, cu o eventuală slabă încălzire, se formează oxime. Prin reacția cetonei **22** cu exces de clorhidrat de hidroxilamină (1:10) se obține oxima **23** corespunzătoare, cu randament de 37,95% (schema 2.11). Reacția are loc în prezență de NaOH solid, la reflux. Purificarea oximei obținute s-a realizat prin cromatografie pe coloană.



Schema 2.11

Prin spectrometrie HRMN, IR și analiză elementală s-a confirmat structura compusului nou sintetizat. Prezența benzilor  $1693\text{ cm}^{-1}$ ,  $1494\text{ cm}^{-1}$  demonstrează prezența legăturii  $\text{C}=\text{N}$ , caracteristică acestor compuși.

Reacția de condensare poate avea loc și cu alți compuși ce conțin grupa amino. În reacție cu esterul metilic al glicinei (schema 2.12) se obține compusul **24**. Acest nou compus poate fi în continuare derivatizat, sintetizând peptide, compuși potențial biologic activi.



Schema 2.12

Raportul molar al reactanților utilizat în această sinteză a fost cetona:aminoacetat de metil 1:1. Reacția are loc în prezență de acid p-toluensulfonic în toluen. Apa, produs secundar al acestei reacții se elimină din amestecul de reacție prin distilare azeotropă. Mersul reacției este monitorizat prin cromatografie pe strat subțire, eluent  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  9:1 și prin observarea apei formate. S-a obținut 0,07 g cristale albe, randamentul fiind 37,8%. Obținerea compusului s-a verificat prin spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$ , IR, de masă și analiză elementală.

## 2.2. Sinteza unor noi esterilor ai QCI și QCD

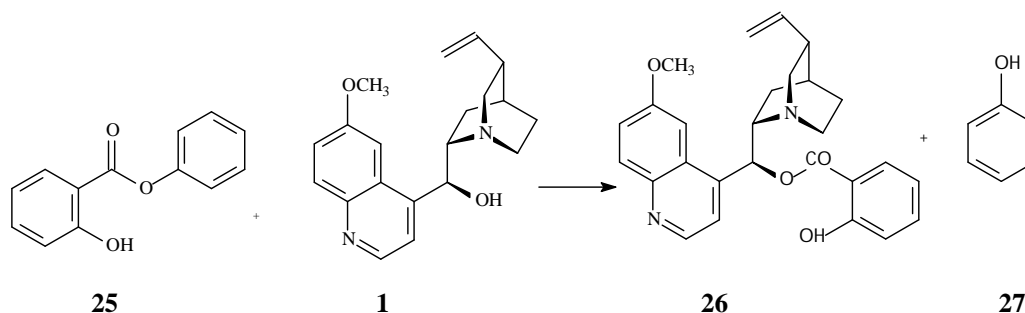
Descoperirea de noi medicamente este o provocare extremă, din motive științifice și economice. Pentru a crea un nou medicament este nevoie de aproximativ 12-15 ani fiind necesar un buget de 0,8-1,7 miliarde dolari [167], 10% din acesta fiind atribuit studiilor de sinteză, 70% fiind folosite pentru studii preclinice și clinice.

Chimia produșilor naturali, în ultima perioadă, a fost revizuită iar aceștia vor continua să fie o sursă importantă de medicamente [168]. Jumătate din medicamentele aflate în prezent în studii clinice sunt compuși derivatizați din compuși naturali. [169].

Esterii pot fi preparați prin reacția dintre un acid carboxilic și un alcool în prezență de catalizatori: acid sulfuric, acid benzensulfonic, sau acid clorhidric gazos. Această reacție se numește esterificare Fiescher (E. Fiescher 1852-1919). Cele mai comune reacții de obținere a esterilor și amidelor, constând în O-acilare respectiv N-acilare, sunt cele ce utilizează agenți de acilare cloruri de acil sau anhidride. Acestea reacționează rapid cu alcoolii dezactivați. Din cauza faptului că halogenurile de acil sunt reactive față de nucleofili slabi, cum sunt alcoolii, reacția poate decurge fără a fi necesari catalizatori.

La începutul anilor 1900 a fost sintetizat esterul chininei cu acidul salicilic, numit salicilchinina, prin reacția dintre salol și chinina (Schema 2.13). [90]





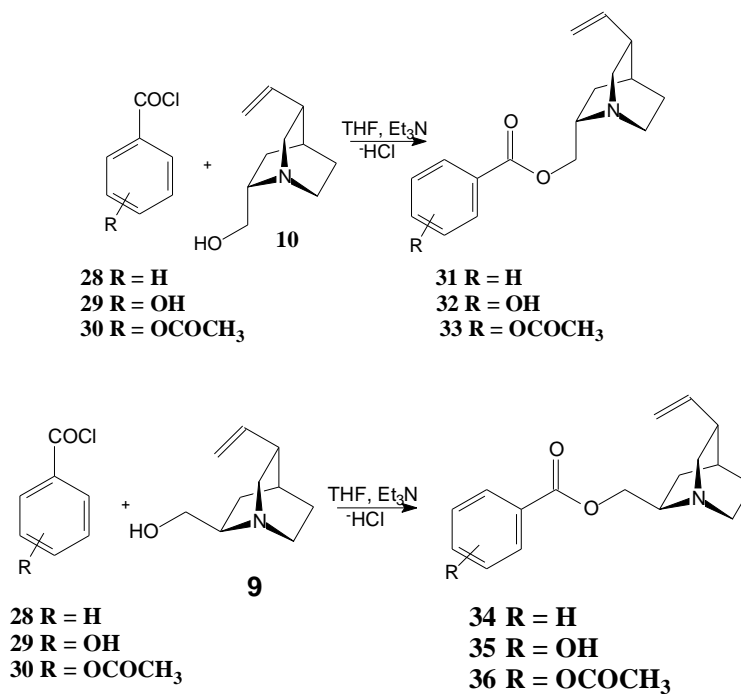
Schema 2.13

Salicilchinina **26** astfel preparată are proprietăți antipiretice și analgezice.

Aceste considerente au îndreptat cercetările în vederea sintetizării de noi compuși, esteri și amide a derivaților cinchona.

### 2.2.1. Sinteza esterilor 1,2 aminoalcoolilor QCI și QCD

Compușii noi, esterii acidului benzoic, acidului salicilic și a acidului acetilsalicilic cu 1,2-aminoalcoolii QCI **10** și QCD **9** au fost sintetizați prin reacția de esterificare utilizând clorurii acizilor respectivi ca agent de acilare a alcoolilor [177,178](schema 2.14).



Schema 2.14

Pentru îmbunătățirea randamentelor sintezei esterilor s-au efectuat experimente în vederea optimizării sintezei esterului **31**. Pentru aceasta s-a studiat influența raporturilor molare 1,2-aminoalcool:clorura de benzoil **28**, precum și 1,2-aminoalcool:TEA asupra randamentului. În tabelul 2.4 și figura 2.4 sunt prezentate rezultate experimentale obținute în cazul varierii raportului molar 1,2-aminoalcool: clorura de benzoil.

Tabel 2.4. Influența raportului molar 1,2-aminoalcool:clorura de benzoil

Nr. Exp.	alcool		Clorura de benzoil (mmoli)	TEA (mmoli)	Randament (%)
	Tip	Nr.moli (mmoli)			
1	QCD	1	1	2	62,3
2	QCD	3	5	6	83,8
3	QCD	1	2	2	85,1
4	QCI	1	1	2	60,1
5	QCI	3	5	6	84,5
6	QCI	1	2	2	83,9

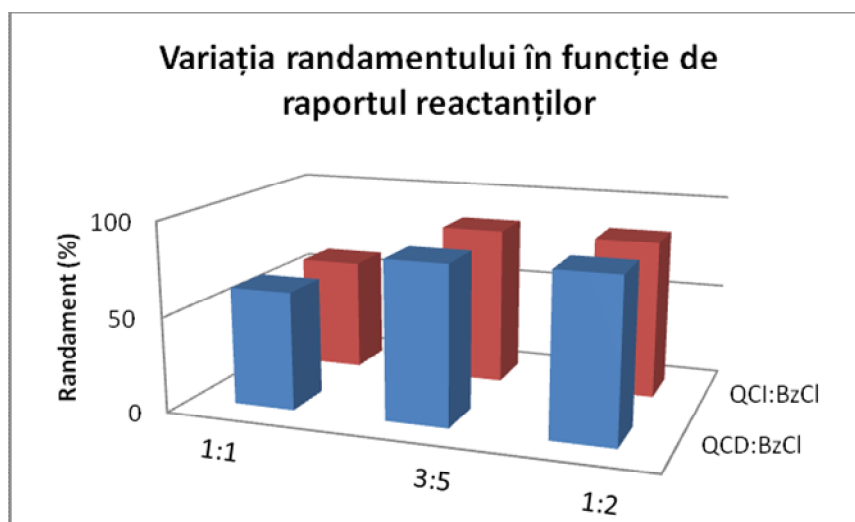


Figura 2.4. Influența raportului molar 1,2-aminoalcool:clorura de benzoil

În cursul experimentelor efectuate s-a observat că în cazul utilizării unui raport molar QCD:BzCl = 1:1 randamentul este cel mai mic, de numai 62,3%. În cazul raportului molar QCD:BzCl 1:1,66 randamentul crește la 83% . În cazul utilizării unui raport molar QCD:BzCl 1:2 nu se observă o creștere semnificativă a randamentului (85%). Pe baza rezultatelor obținute (tabel 2.5, figura 2.5) s-a considerat optim un raport molar 1,2-aminoalcool: BzCl de 3:5. O creștere a acestui raport molar de 1:2 nu este optim din punct de vedere economic. În tabelul 2.5 se prezintă influența asupra randamentului a raportului 1,2-aminoalcool: TEA.

Tabel 2.5. Influența raportului molar 1,2-aminoalcool:TEA

Nr. Exp.	Alcool		Clorura de benzoil (mmoli)	TEA (mmoli)	Randament (%)
	Tip	Nr.moli (mmoli)			
1	QCD	1	1,66	1	53,6
2	QCD	1	1,66	1,5	74,2
3	QCD	1	1,66	2	83,8
4	QCI	1	1,66	1	50,4
5	QCI	1	1,66	1,5	77,1
6	QCI	1	1,66	2	84,5

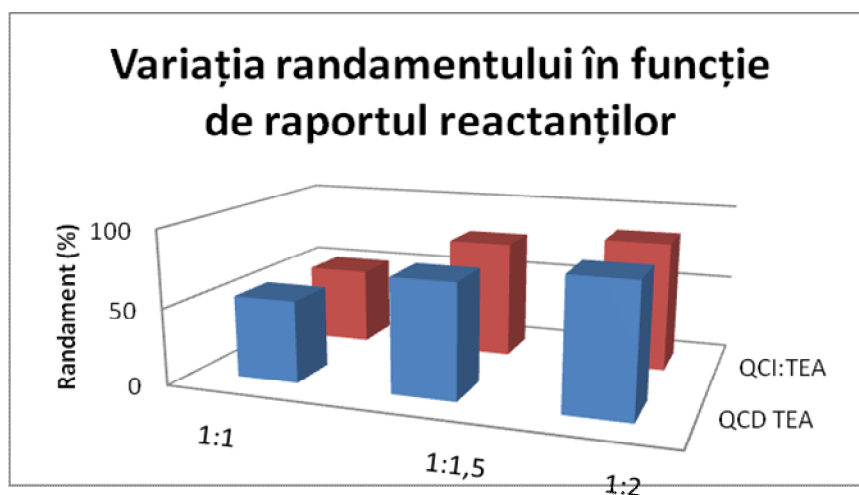


Figura 2.5. Influența raportului molar 1,2-aminoalcool:TEA

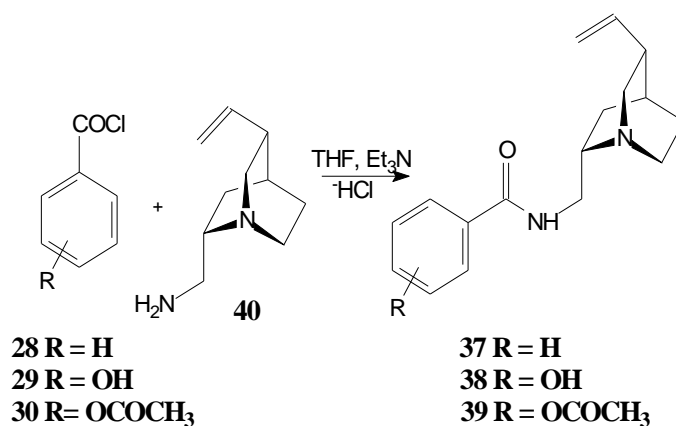
Se constată că prin creșterea raportului molar QCD: TEA de la 1:1 la 1:2 se obține o creștere a randamentului de sinteză a esterilor cu aproximativ 30%. Același efect se observă și în cazul aminoalcoolului QCI. Experimentele au demonstrat că pentru un randament satisfăcător este necesară efectuarea sintezei utilizând reactivi în raport molar QCD:BzCl:TEA 3:5:6.

S-au sintetizat esteri ai 1,2-aminoalcoolilor cu acid benzoic, acid salicilic și acid acetilsalicilic. S-a constatat că randamentele de sinteză scad, de exemplu de la 83,8%, în cazul esterului acidului benzoic la 64,76% în cazul acidului acetilsalicilic. Substituții atrăgători de electroni greșiți pe nucleul benzenic scad reactivitatea clorurii de acil. Scăderea randamentului de sinteză se poate explica și printr-un efect de împiedicare sterică.

Compușii noi sintetizați au fost caracterizați prin spectrometrie H-RMN, IR și analiză elementală. Prezența benzilor  $1768\text{ cm}^{-1}$ ,  $1393\text{ cm}^{-1}$  sunt caracteristice benzoaților, fapt ce dovedește sinteza esterului dorit.

### 2.2.2. Sinteza amidelor 1,2 diaminei QCDNH<sub>2</sub>

Amidele acidului benzoic, acidului salicilic și a acidului acetilsalicilic cu diamina QCDNH<sub>2</sub> au fost sintetizate utilizând clorurile acizilor respectivi ca agent de acilare a aminei. (schema 2.15)



Schema 2.15

Sinteza acestor amide se realizează cu randamente satisfăcătoare 80,9% în cazul amidei acidului benzoic **37**, 71,7% în cazul amidei acidului salicilic **38** și 49% în cazul amidei acidului

acetilsalicilic **39**. Se constată efectul dezactivant al grupelor atrăgătoare de electroni legate de nucleul benzenic asupra acestei reacții, reliefat prin scăderea randamentului de sinteză.

A fost studiată influența raportului molar al reactanților asupra randamentului de sinteză. În tabelul 2.6 și figura 2.6. se prezintă rezultatele obținute.

Tabel 2.6. Influența raportului molar al reactanților asupra randamentului

Nr. Exp.	Amina		Clorura de benzoil (mmoli)	TEA (mmoli)	Randament (%)
	Tip	Nr.moli (mmoli)			
1	QCDNH <sub>2</sub>	3	3	6	44,3
2	QCDNH <sub>2</sub>	3	4	6	69,7
3	QCDNH <sub>2</sub>	3	5	6	80,9
4	QCDNH <sub>2</sub>	3	6	6	82,2
5	QCDNH <sub>2</sub>	3	5	4,5	71,8
6	QCDNH <sub>2</sub>	3	5	3	55,6

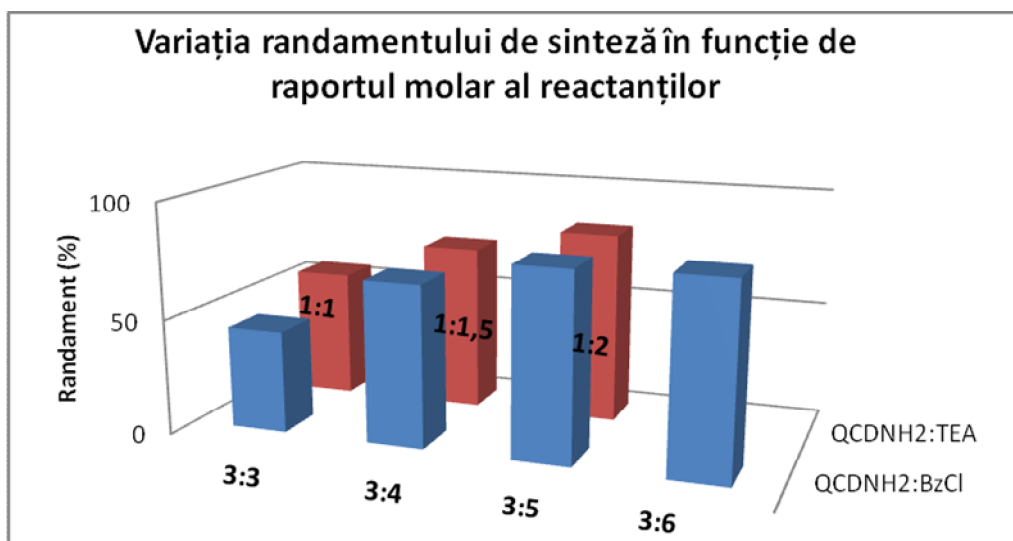


Figura 2.6. Influența raportului molar al reactanților asupra randamentului

În cursul acestui studiu s-au efectuat sinteze ale amidelor corespunzătoare utilizând rapoarte molare QCINH<sub>2</sub>:clorura de benzoil de 1:1 – 1:2. S-a constatat că, dacă se efectuează sinteza utilizând un raport molar de 1:1 se obține un randament de 44,3%. Prin creșterea acestui raport la 3:5 randamentul crește la aproximativ 81%. Prin utilizarea unui raport de 1:2, randamentul nu crește semnificativ, se obține un randament doar de 82%. Din acest motiv se consideră optim raportul reactanților de 3:5. În continuare s-au efectuat sinteze în care s-a variat raportul molar QCNDH<sub>2</sub>: TEA. La raportul molar 1:1 randamentul este de 55,6%, iar în cazul raportului de 1:2 randamentul crește la 80,9%. Sinteza 3 din tabelul 2.6 prezintă condițiile optime de sinteză

Compușii noi sintetizați au fost caracterizați prin spectroscopie <sup>1</sup>H-RMN, IR și analiză elementară. În spectrul IR se observă prezența benzilor la 2946 cm<sup>-1</sup>, bandă largă, 1658 cm<sup>-1</sup> caracteristice compușilor ce conțin grupări amidice.

### 2.3. Studiul optimizării sintezei cinconidinei

Chiar din cele mai vechi timpuri, alcaloizii cinchona au jucat un rol crucial în dezvoltarea chimiei organice și a medicinei moderne. Sinteza totală a chininei, în 1945, a fost privită ca un eveniment de importanță deosebită în dezvoltarea chimiei organice. Prima sinteză total stereoselectivă a chininei, realizată în 2004, reprezintă pionieratul conceptului stereoselectivității în sinteza organică.

Importanța crucială a compușilor enantiomerici puri pentru viață și știință au condus la o atenție deosebită în cercetarea sintezelor asimetrice. Importanța domeniului a fost subliniat, în 2001, când premiul Nobel pentru chimie a fost atribuită chimiștilor W.S. Knowles, K.B. Sharpless și R. Noyori pentru rezultate obținute în domeniul sintezelor asimetrice.

Reacțiile asimetrice utilizând catalizatori de transfer de fază au fost studiate în ritm accelerat începând cu anii 1970. Cel mai intens studiat a fost grupul de catalizatori preparați prin quaternizarea alcaloizilor cinchona. În această perioadă au fost sintetizați derivați funcționali ai cinconidinei, prin derivatizarea grupelor funcționale existente în moleculă fiind utilizați în reacțiile catalitice asimetrice. Cererea tot mai mare de cinconidina a impus studierea unor procese de transformare a cinconinei, compus cu mai puține utilizări, în cinconidina.

Aceste considerente ne-au îndreptat atenția spre optimizarea unui proces de sinteză a cinconidinei de puritate avansată [178].

Cinconidina este o substanță cristalină, care cristalizează în prisme mari, strălucitoare, cu punct de topire 204,5°C. Este o substanță greu solubilă în apă, solubilă în alcool și eter. Soluția sulfurică de cinconidină nu prezintă fluorescență și nu dă reacția taleochină, specifică altor alcaloizi cinchona.

Procesul prin care se obține cinconidina din stereoizomerul cinconină este constituit dintr-o oxidare a grupării hidroxil de la C9 în derivatul 9-oxo, care este condusă în condițiile metodei Oppenauer, urmată de o reducere stereospecifică cu borohidruură de sodiu.

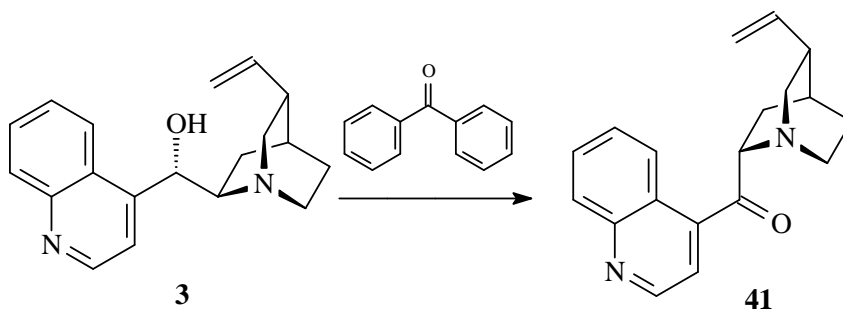
Etapele procesului constă în următoarele etape:

- Sinteza cinconidinonei;
- Sinteza tartratului de cinconidina;
- Sinteza cinconidinei;
- Purificarea cinconidinei.

### 2.3.1. Sinteza cinconidinonei

Există mai multe metode de oxidare a alcaloizilor cinchona în cetonele corespunzătoare, în particular pentru oxidarea chininei la chinonă. Rabe a reușit această reacție de oxidare cu acid cromic dar randamentele au fost mici.[179] În 1945, Woodward a adaptat metoda Oppenauer pentru oxidarea chininei, reușind oxidarea cantitativă prin utilizarea t-butilratului de potasiu în loc de clasicul catalizator alcoolat de aluminiu.[180]

Cinconidinona se obține prin oxidarea cinconinei aplicând metoda Oppenauer modificată, utilizând benzofenonă ca agent oxidant. Reacția care are loc este următoarea (schema 2.16)



Schema 2.16

Deoarece cinconina **3**, materie primă, poate avea o umiditate de până 7,5%, iar urmele de apă ar putea duce la reacții secundare nedorite, este necesar cinconina supusă reacției să nu

conțină mai mult de 0,1% apă. Anhidrizarea cinconinei se face prin distilare azeotropă cu toluen. Reacția de oxidare are loc în mediu bazic, la temperatura de 90 - 110°C. După desăvârșirea reacției, cinconidona formată se extrage în soluție apoasă acidă, din care se pune în libertate prin alcalinizarea soluției apoase până la pH = 12 și se separă prin filtrare. În tabelul 2.7 sunt prezentate rezultatele obținute.

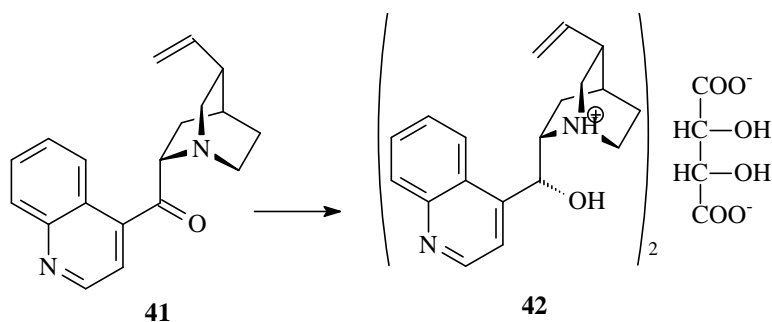
Tabelul 2.7. Condițiile optime ale procesului de sinteză a cinconidinonei 41

Nr. pr	MATERII PRIME					PRODUȘI			
	Cantitate CN + DHCN (g)	Toluen	NaOH + KOH (g)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	Benzo-fenonă (g)	CDO (g)	Umiditate (%)	CDO uscat (g)	Randament (%)
1	53,89	415	25+37,1	22	25	81,9	40,1	49,1	91,2
2	55,75	415	25+ 37,1	22	25	86,4	37,2	51,6	92,6
3	55,75	420	25+ 37,1	22	25	86,9	33,3	51,8	91,8

Din analiza rezultatelor obținute se poate observa că reacția de oxidare a cinconinei la cinconidinona, utilizând ca agent de oxidare benzofenona decurge cu randamente bune de 91,2 - 92,6%. Puritatea produsului obținut este de peste 99%.

### 2.3.2. Reducerea cinconidinonei la tartrat de cinconidină

Dintre multiplele metode de reducere a grupării carbonil la grupă funcțională hidroxil descrise în literatură s-a optat pentru reducerea cu borohidruă de sodiu datorită condițiilor de lucru operabile și disponibilitatea materiilor prime. Din masa de reacție cinconidina se separă sub formă de tartrat **42**. (schema 2.17)



Schema 2.17



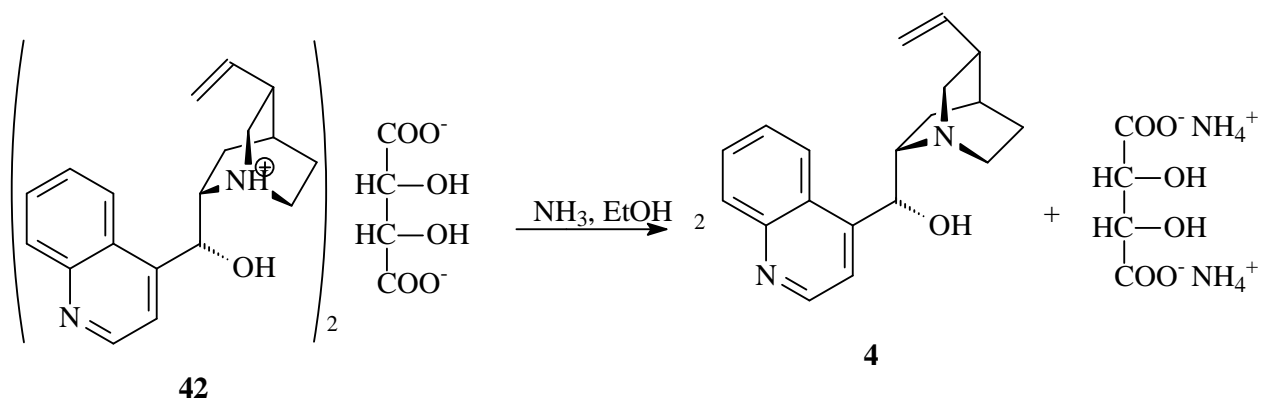
Reducerea cu borohidru $\bar{a}$  de sodiu are loc în mediu de alcool izopropilic, la temperatura – 15°C, la pH = 4,5, prin dozarea alternativă a agentului de reducere și soluții apoase de acid tartric. Acidul tartric se folosește pentru separarea epimerilor obținuți. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2.8.

Tabelul 2.8. Rezultatele obținute la sinteza tartratului de cinconidinona 42

Nr pr	MATERII PRIME				PRODUS FINIT					
	CDO uscat (g)	Alc. Izopropilic (g)	Acid tartric (g)	Borohidru $\bar{a}$ de sodiu (g)	TCD (g)	Umiditate (%)	Conținut baza liberă (g)	TCD (%)	TC (g)	Randament (%)
1	60	120	49	5,3	156	60,12	45,95	94,21	42,72	70,83
2	60	120	49	5,3	112	56,16	41,18	96,5	37,31	61,76
3	60	120	49	5,3	121	56,14	40,74	96,5	39,31	65,08

Reacția de reducere are loc cu un randament 61 – 70 %, obținându-se tartrat de cinconidină cu puritate de 94 – 95%, umiditatea produsului obținut variind între 56 – 60%. Compoziția s-a determinat prin analiză HPLC.

Cinconidina se pune în libertate prin tratare cu soluție alcoolică de tartrad de cinconidina cu soluție apoasă de amoniac, la temperatura 40 – 50°C. Tartratul de cinconidina se dizolvă în alcool etilic, se încălzește la 40°C și se dozează soluția amoniacală, până la pH = 10. Produsul se separă prin filtrare și se purifică din soluție apoasă prin neutralizarea soluției apoase de sulfat de cinconidina. Reacția care are loc este prezentată în schema 2.18.



Schema 2.18

Se obține un produs, cinconidina, cristale albe de o calitate care se încadrează cerințelor impuse de normativele internaționale în vigoare, chiar și ca produs farmaceutic. Rezultatele obținute la faza de sinteză a cinconidinei, respectiv purificarea acesteia sunt prezentate în tabelul nr. 2.9 și nr.2.10.

Tabelul 2.9. Rezultatele obținute la sinteza cinconidinei 4

Nr.	MATERII PRIME			Prođuși		Conținut Baze libere (%)
	Alcool etilic (ml)	Tartrat de cinconidina (g)	Soluție amoniac 25% (ml)	Cinconidina (g)	Filtrat (g)	
1	900	256	60	111	1116	78,1
2	900	256	60	91	1060	83,6
3	900	300	90	109	1046	72,11

Tabelul 2.10. Rezultatele obținute la purificarea cinconidinei 4

Nr	Materii prime				Apa (ml)	Produși	Conținut (%)	Randament (%)
	Cinconidina		Acid sulfuric 30% (g)	Hidroxid de sodiu 10% (g)		Cinconidina Purificata (g)		
	Cant (g)	Conț (%)						
1	111	78,1	136	433	2500	63	99,86	72,56
2	91	83,6	135	378	2259	55	99,94	72,23
3	120	72,11	193	600	2000	81	99,96	93,6

În urma acestor procese se obține cinconidină de puritate 99,86 – 99,96% cu un randament variind între 72 – 93%. În cazul în care se lucrează în soluții mai concentrate, respectiv cu o cantitate mai mică de apă în mediul de reacție randamentele sunt superioare (93,6%).

Pentru analiza cantitativă a alcaloizilor cinchona sunt recomandate metodele HPLC de separare cu detecție UV.

Eluentul necesar determinării cromatografice este format dintr-o soluție formată din fosfat monosodic, trietanolamină, acetonitril și pH-ul este reglat la 2,3 cu acid fosforic.

Determinările calitative și cantitative s-au efectuat utilizând o soluție standard ce conține principalii alcaloizi cinchona. Această soluție standard se folosește pentru a determina timpii de retenție caracteristici fiecărui compus.

Pentru determinările cantitative și calitative a alcaloizilor cinchona s-a utilizat un cromatograf HPLC Able&Jasco compus din: modul pompe PU-1580, modul gradient ternar LG-980-02S, modul degazor DG -980-50, injector manual RHEODYNE, modul detector UV-1575, program de procesare a datelor BORWIN 1.50

Pentru separare s-a utilizat o coloană cromatografică NUCLEOSIL C18, 250x4.6 mm, particule 5 $\mu$ . Detecția s-a efectuat la lungimea de unda  $\lambda=316$  nm. În figura 2.7 se prezintă o cromatogramă de calibrare.

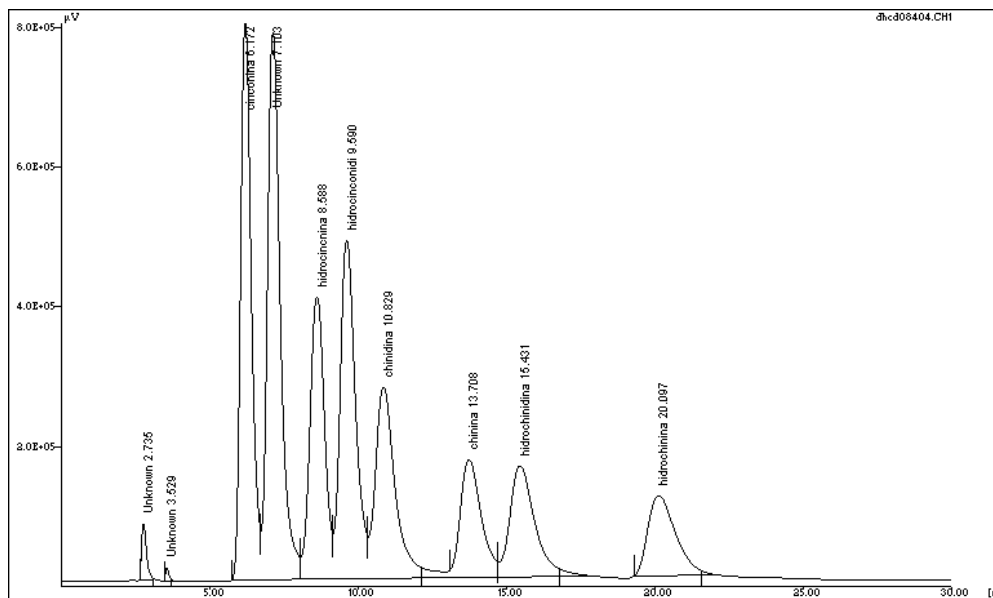


Figura 2.7. Cromatograma soluției de calibrare, condiții: coloană Nucleosil C18(250x4,6mm), eluent  $\text{CH}_3\text{CH}$ :tampon fosfat, debit 0,7 ml/min,  $\lambda=316$  nm

În continuare se analizează soluțiile de probă. Identificarea compușilor derivați ai alcaloizilor cinchona se realizează pe baza timpilor de retenție caracteristici, determinați cu ajutorul soluției de calibrare.

Compoziția probei de analizat se realizează prin normarea ariilor picurilor. În figura 2.8 se prezintă cromatograma obținută în cazul probei nr.1 de sinteză a cinconidinei.

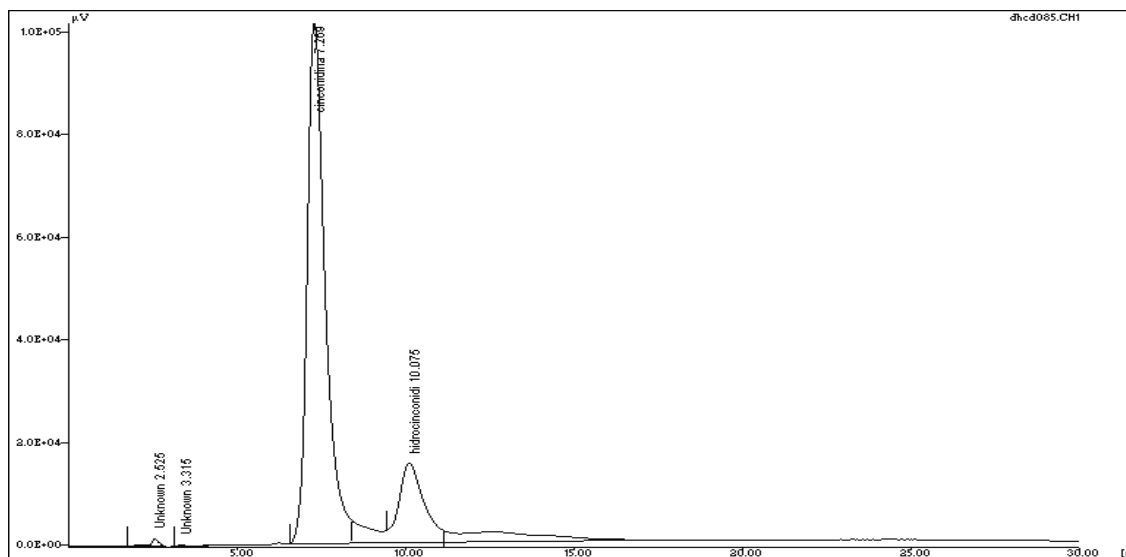


Figura 2.8. Cromatograma probei 1 de sinteză a cinconidinei, condiții: coloană Nucleosil C18(250x4,6mm), eluent  $\text{CH}_3\text{CH}$ :tampon fosfat, debit 0,7 ml-min,  $\lambda=316$  nm

Timpii de retenție caracteristici pentru compusul cinconidină și dihidrocinconidină sunt prezentate în tabelul 2.11.

Tabel 2.11. Timpii de retenție obținuți la analizarea soluției standard

Compus	RT – soluția de calibrare (min)	RT-proba (min)
Cinconidina	7,243	7,269
Dihidrocinconidina	9,950	10,07

Rezultatele obținute sunt comparabile, timpii de retenție fiind caracteristici compușilor studiați. Diferențele determinate se încadrează în limitele de variație acceptate.

În urma analizării rezultatelor obținute se constată că probele conțin cinconidină și dihidrocinconidină în proporție de 99,84 – 99,96%.

#### 2.4. Elaborarea și validarea metodei cromatografice de analiza a QCI-ASA

Izolarea substanțelor chimice din amestecuri și identificarea componentelor a reprezentat întotdeauna una dintre obiectivele prioritare ale chimiei. La ora actuală nu numai în chimia analitică ci și în tehnologia chimică se manifestă o cerere din ce în ce mai mare de compuși cu puritate avansată. Separarea amestecurilor în componente este o operație esențială care permite obținerea acestora într-o stare cât mai pură. Această separare se poate face la scară analitică, dacă ne interesează să cunoaștem numai compoziția amestecului sau la scară preparativă, dacă vrem să obținem fizic componentele separate.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță acoperă azi, în proporție de aproximativ 80%, analiza substanțelor moleculare organice, organo-metalice și anorganice. Împreună cu cromatografia de gaze constituie un punct de sprijin important în analizele chimice moderne.

În procesul de elaborare și punere la punct a unei metode lichid cromatografice trebuie să se facă o alegere judicioasă a coloanelor – a fazelor staționare, fazelor mobile și determinarea influenței temperaturii asupra separării.

Validarea unei metode lichid-cromatografice are drept scop verificarea în ce măsură metoda cromatografică elaborată corespunde scopului propus. În procesul de validare trebuie să se aibă în vedere următoarele criterii: acuratețea, precizia, linearitatea, specificitatea, limita de detecție și limita de cuantificare.

#### **2.4.1. Elaborarea metodei de analiză prin cromatografie HPLC a QCI-ASA**

QCI – ASA este un compus nou sintetizat cu potențial biologic activ. Din acest motiv am elaborat o metodă cromatografică HPLC de determinare a acestui compus[181].

Determinările s-au efectuat cu un cromatoraf Able-Jasco, echipat cu modul Pompă PU-1580, modul gradient ternar LG-980-02S, modul degazor DG-980-50, manual Rheodyne 7125 de 20  $\mu$ l, detector UV-1575. Lungime de undă de detecție: 254 nm.

Reactivi utilizați: hexilamina, fosfat acid de potasiu, metanol HPLC grade și acetonitril HPLC grade, au fost procurați de la firma Merck. Apa bidistilată a fost preparată în laborator.

Prepararea probei: 25 mg QCI acetilsalicilat (QCI ASA), cântărit exact se introduce într-un balon cotat de 25 ml. Se adaugă 10 ml metanol și se dizolvă proba. Se completează conținutul balonului până la semn cu metanol. Această soluție reprezintă soluția stoc. Concentrația soluției stoc este de 1mg/ml. Pentru prepararea soluțiilor de calibrare se diluează volume corespunzătoare din această soluție astfel încât în final concentrația soluțiilor de lucru va fi: 50, 40, 25 și 10  $\mu$ g/ml. Toate soluțiile se filtrează cu ajutorul unei unități de filtrare, dimensiunea porilor 0,45  $\mu$ m.

##### **2.4.1.1. Stabilirea coloanei optime pentru separare.**

Pentru separarea acestui compus au fost testate următoarele coloane:

- Nucleosil C 18, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm
- Nucleosil C8, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm
- Hipersil C18, 5 $\mu$ , 250 x 4 mm
- Lichrosphere RP18, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm

Am efectuat determinările prin injectarea probei de soluție de QCI ASA de mai multe ori utilizând faza mobilă compusă din: acetonitril- tampon fosfat (pH 3) 50:50 v/v, soluția conținând 0,03 mol/l hexilamină, debit 0,5 ml/min.

Cu fiecare tip de coloană a fost cromatorafiată de 3 ori consecutiv, soluția de concentrație 10  $\mu\text{g/ml}$ . În cazul fiecărei determinări s-a urmărit eficiența separării – capacitatea de separare și forma picului – factorul de asimetrie. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.12.

O separare bună necesită valori rezonabile ale reținerii. Timpul de reținere este o măsură directă a reținerii. Acest factor este afectat de viteza de curere a fazei mobile prin coloană și eventualele interacțiuni a probei cu faza staționară. Un alt parametru, mai folosit este ” Factorul capacitate” (k), care este egal cu raportul dintre timpul de retenție a probei în coloană și timpul mort al coloanei.

Tabel 2.12. Rezultate obținute la analiza QCI-ASA, stabilirea coloanei optime

Nr. Exp.	Tip coloană	Timp retenție (min)	Aria picului ( $\text{mV}\cdot\text{s}$ )	Capacitate k	Asimetrie
1	Nucleosil C18	9,58	87743	915	1,1
2	Nucleosil C8	14,61	75914	1021	1,5
3	Hypersil C18	10,22	89161	942	1,15
4	Lichospher RP18	10,41	86791	969	1,44

În cazul în care determinările s-au efectuat utilizând coloana Nucleosil C18 rezultatele sunt satisfăcătoare, timpul de retenție este 9,58 minute, separarea este corespunzătoare, factorul de capacitate fiind 915 și factorul de asimetrie este 1,1 foarte apropiat de cazul ideal, factor de asimetrie 1.

Determinările realizate cu coloana Nucleosil C8 nu au fost satisfăcătoare, timpul de retenție este mai mare și factorul de asimetrie (1,5) este mult diferit de valoarea ideală 1.

Nici în cazul separărilor utilizând coloana Lichrospher RP18, coloană în care umplutura este formată din particule sferice, rezultatele nu sunt satisfăcătoare, timp de retenție 10,41 minute și factor de asimetrie 1,44.

Determinările au arătat că separarea noului compus QCD-ASA se realizează cu rezultate comparabile atât cu coloane NucleosilC18 cât și Hypersil C18.

### 2.4.1.2. Stabilirea compoziției fazei mobile

În cromatografia HPLC cu faze inverse, separarea se face pe faze staționare nepolare și o fază mobilă apoasă, moderat polară. Cu aceste faze staționare, timpul de retenție este mare pentru molecule mai puțin polare, în timp ce moleculele polare se eluează mai repede. Se poate crește retenția prin adăugare de apă în faza mobilă, respectiv se poate scădea timpul de retenție prin adăugarea unei cantități mai mari de fază organică în eluent. Cromatografia cu faze inverse operează pe principiul forțelor hidrofobe, care provin din simetria mare a dipolului apei. Legarea analitului de faza staționară este proporțională cu suprafața de contact a segmentului nepolar al moleculei analitului cu particulele de ligand, în eluent apos. Acest efect solvofobic este dominat de capacitatea apei de "reducere a cavității" în jurul analitului și a lanțului C18 a fazei staționare. Energia eliberată în acest proces este proporțională cu tensiunea superficială a eluentului și suprafața hidrofobă a analitului.

Un alt factor important care afectează separarea este pH-ul eluentului, deoarece acesta afectează hidrofobicitatea analitului. De obicei se utilizează o componentă tampon pentru controlarea pH-ului. Utilizarea substanței tampon are mai multe scopuri:

- Controlează pH-ul eluentului
- Neutralizează sarcinile grupărilor silicat nemodificate a fazei staționare
- Acționează ca agent pereche pentru neutralizarea sarcinii analitului.

Pentru optimizarea separării noului compus QCI-ASA pe coloana Nucleosil C18 s-au efectuat determinări utilizând faza mobilă cu compoziție diferită și cu valori diferite ale pH-ului.

Natura fazei organice influențează forma picului substanțelor cu caracter bazic. S-a studiat eficiența separării în cazul în care s-a utilizat faze mobile conținând metanol și respectiv acetonitril, pe coloana Nucleosil C18. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.13.

Tabel 2.13. Rezultate obținute la analiza QCI-ASA, stabilirea fazei mobile optime

Nr. Exp.	Faza mobilă	Timp retenție (min)	Aria picului (mV·s)	Capacitate k	Asimetrie
1	Tampon fosfat (pH 3):metanol 50:50	17,51	58111	1038	1,83
2	Tampon fosfat(pH 3): acetoneitril 50:50	9,58	87743	915	1,1



Se constată că în cazul utilizării fazei mobile ce conține metanol, separarea nu este corespunzătoare, timpii de retenție sunt mari, în medie 17,51 minute iar asimetria picurilor este accentuată, factorul de asimetrie este 1,83. Rezultatele obținute în cazul în care separările s-au efectuat utilizând faza mobilă tampon fosfat (pH 3) și acetonitril sunt satisfăcătoare, timp de retenție 9,58, factor de asimetrie 1,1.

Forma picurilor și separarea este influențată și de pH-ul eluentului. pH-ul fazei mobile poate varia în intervalul 2-8. În acest interval este stabilă faza staționară a coloanei. Pentru studierea influenței pH-ului asupra separării acestui substrat, s-a utilizat faze mobile cu valori diferite ale pH-ului. S-au efectuat determinări cu faze mobile cu valori ale pH-ului 3, 5 și respectiv 7. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.14.

Un pH = 3, este acceptat pentru a se asigura o stabilitate bună a coloanelor cromatografice cu faze inverse. În general pentru compușii bazici este recomandată utilizarea unei faze mobile cu pH aproximativ egal cu valoarea  $pK_a$  al substanței.

Experimentele au dovedit (tabel 2.13) că utilizarea fazei mobile ce conține tampon fosfat cu pH = 3 este cea mai potrivită pentru separarea QCI-ASA, timpul de retenție fiind optim, iar factorul de asimetrie cel mai apropiat de valoarea ideală, 1.

Tabel 2.14. Rezultate obținute la analiza QCI-ASA, stabilirea pH-ului fazei mobile optim

Nr. Exp.	Faza mobilă	Timp retenție (min)	Aria picului (mV·s)	Capacitate k	Asimetrie
1	Tampon fosfat(pH 3): acetonitril 50:50	9,58	87743	915	1,1
4	Tampon fosfat(pH 5): acetonitril 50:50	20,41	68227	1116	2,05
7	Tampon fosfat(pH 7): acetonitril 50:50	16,13	70046	994	1,56

Soluția tampon constituentă a fazei mobile a fost aleasă pe bază de fosfați. Deoarece forma picului substanțelor bazice este afectată de interacțiunile de schimb ionic, am preparat soluția tampon utilizând fosfat monoacid de potasiu și nu de sodiu. Concentrația soluției tampon este de 0,06 M. Dacă se depășește concentrația de 0,1 M este posibil ca sărurile anorganice să precipite în faza mobilă.

În literatură se arată că în cazul în care eluentul conține și amine în concentrație 0,05M separarea compușilor cu caracter bazic, este îmbunătățit. Pentru realizarea unei bune separări sunt recomandate aminele cu catenă alifatică mai lungă deoarece datorită hidrofobicității acestea au rol de mascare a suprafeței coloanei. Din acest motiv, pentru o separare mai bună, am preparat eluent care conține 0,03 mol/l hexilamină.

Un alt factor important în separările cromatografice este debitul eluentului. Pentru stabilirea valorii optime a acestui parametru s-au efectuat experimente utilizând debite diferite a fazei mobile ( tabel 2.15). S-au efectuat determinări repetate cu soluția de lucru, utilizând eluent cu compoziția determinată în experimentele anterioare. Debitele fazei mobile utilizate la aceste determinări sunt: 0,5 ml/minut, 0,7 ml/minut și 1,0 ml/minut.

Tabel 2.15. Rezultate obținute la analiza QCI-ASA, stabilirea debitului optim a fazei mobile

Nr. Exp.	Faza mobilă		Timp retenție (min)	Aria picului (mV·s)	Capacitate (k)
	Compoziția	Debit (ml/min)			
1	Tampon fosfat(pH 3): acetonitril 50:50	0,5	9,58	87743	915
2	Tampon fosfat(pH 3): acetonitril 50:50	0,7	5,25	79543	528
3	Tampon fosfat(pH 3): acetonitril 50:50	1,0	3,62	64211	326

Debitul fazei mobile pentru o separare optimă este de 0,5 ml/minut. Creșterea debitului fazei mobile conduce la scăderea timpului de retenție și implicit a timpului determinării, dar separarea nu este corespunzătoare.

Experimentele efectuate au avut ca rezultat stabilirea compoziției optime a fazei mobile care să permită o separare eficientă. Aceasta este formată din: tampon fosfat:acetonitril, 50:50 v/v, ce conține 0,030 mol/l hexilamină, pH=3. Reglarea pH-ului s-a făcut cu acid fosforic. În figura 2.9 este prezentată o cromatogramă obținută în condițiile optime stabilite experimental.



Figura 2.9. Cromatograma QCI-ASA, condiții: coloană Nucleosil C18(250x4,6mm), eluent CH<sub>3</sub>CH:tampon fosfat 50:50, pH=3, debit 0,5 ml-min,  $\lambda=316$  nm

#### 2.4.2. Validarea metodei de analiza a QCI-ASA

Pentru evaluarea calității unei metode de analiză, determinată de performanțele sale analitice, este necesară validarea prin analiza unei substanțe de referință cu această metodă, urmată de compararea rezultatelor obținute pe baza regăsirilor procentuale și a deviațiilor standard relative calculate (RSD%)[182].

Metodologia de validare are rolul de a demonstra că o metodă de analiză corespunde scopului pentru care a fost elaborată și că performanțele unei astfel de metode, stabilite prin studii experimentale de laborator, satisfac cerințele pentru aplicarea ei la determinarea analitului considerat[183,184].

În procesul de validare este necesar să se precizeze parametrii de validare a metodei, care trebuie să fie urmăriți în cursul acestui proces.

Tabel 2.16. Parametrii de performanță studiați în validarea completă a metodei de analiză

Parametrii	Descrierea parametrilor
• Linearitatea	• proporționalitatea modelului de calibrare
• Exactitatea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Demonstrarea absenței erorilor sistematice sau concordanța rezultatelor cu valoarea adevărată sau cu media aritmetică a rezultatelor</li> <li>• Abilitatea determinărilor analitului într-o matrice dată, cu rezultate apropiate 99-100%, deci exacte</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precizia sau fidelitatea</li> <li>- Repetabilitatea</li> <li>- Reproducibilitatea Intralaborator</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Demonstrarea absenței erorilor aleatoare, sau valoarea redusă a acestora, demonstrată de concordanța rezultatelor între ele</li> <li>- Caracterizată de obținerea unor rezultate precise, repetate, de către același analist, în scurt timp</li> <li>- Caracterizată de obținerea unor rezultate precise, repetate, de către același analist, în zile diferite</li> </ul>
• Robustețea	• Abilitatea metodei de a rămâne neafectată la variații mici ale parametrilor metodei
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limite</li> <li>- De detecție</li> <li>- De cuantificare</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentrația minimă sub care analitul nu poate fi determinat</li> <li>• Concentrația cea mai mică de analit, care se poate doza cu precizie</li> </ul>

#### 2.4.2.1. Evaluarea preciziei

Precizia este influențată de erorile sistematice și cele aleatoare.

Precizia se evaluează prin determinarea repetabilității și a reproductibilității metodei aplicată în toate etapele ei. Pentru aceasta se aplică metoda stabilită de un număr mare de ori (9 determinări), când trebuie să se obțină rezultate suficiente și statistic valide. Pentru evaluarea preciziei, se calculează deviația standard relativă (RSD) astfel:

$$RSD = \frac{\text{deviația standard}}{\text{media aritmetică}} \cdot 100$$

$$\text{deviația standard} = \sqrt{\sum \frac{|x_i - \bar{x}|}{n-1}}$$

Precizia se evaluează prin determinări repetate, evaluându-se parametrii: timp de retenție și aria picului. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 5.17; 5.18.

Tabel 2.17. Rezultate obținute la analiza soluție cu concentrația 0,01 mg/ml

Nr. Proba	Timp retenție(min)	Aria picului (mV·s)	Număr telere teoretice	Asimetrie
1	9,58	87377	18157	1,12
2	9,56	89432	18034	1,11
3	9,60	86368	18034	1,13
4	9,55	88143	18122	1,08
5	9,54	86421	18111	1,11
6	9,56	84437	18263	1,09
7	9,59	88573	18106	1,09
8	9,57	86548	18077	1,11
9	9,59	85321	18157	1,12
<b>Medie</b>	<b>9,57</b>	<b>86958</b>	<b>18118</b>	<b>1,11</b>
<b>DS</b>	<b>0,0203</b>	<b>1586</b>	<b>70,77</b>	<b>0,016</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>0,21</b>	<b>1,82</b>	<b>0,39</b>	<b>1,50</b>

Table 2.18. Rezultate obținute la analiza soluție cu concentrația 0,05 mg/ml

Nr. Proba	Timp retenție(min)	Aria picului (mV·s)	Număr talere teoretice	Asimetrie
1	9,57	4362419	18257	1,11
2	9,57	4399107	18024	1,12
3	9,60	4344073	18014	1,13
4	9,58	4357872	18162	1,08
5	9,53	4346227	18101	1,10
6	9,58	4379718	18283	1,09
7	9,59	4331119	18136	1,07
8	9,55	4357788	18107	1,10
9	9,60	4360298	18167	1,13
<b>Medie</b>	<b>9,57</b>	<b>4359847</b>	<b>18139</b>	<b>1,10</b>
<b>SD</b>	<b>0,023</b>	<b>20034</b>	<b>91,72</b>	<b>0,021</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>0,24</b>	<b>0,46</b>	<b>0,51</b>	<b>1,92</b>

În cazul celor nouă experimente, efectuate consecutiv, în aceeași zi, cu soluția de QCI-ASA 0,01 mg/ml și 0,05 mg/ml se obțin timpi de retenție de 9,57 minute cu RSD de 0,21% și respectiv 0,24%. Aria picului:

- în cazul soluției de concentrație 0,01 mg/ml este de 86958 mV·s, RSD 1,82%,
- în cazul soluției de concentrație de 0,05 mg/ml aria picului este 4359847 mV·s, RSD 0,46%.

Aceste valori indică precizia determinărilor, obținându-se valori statistice valide, RSD < 2%. Valorile experimentale obținute și validate statistic, indică și o reproductibilitate bună a metodei de analiză propusă în condiții de variabilitate mică a parametrilor operatori.

Reproductibilitatea s-a evaluat prin efectuarea de determinări în trei zile consecutive, pentru soluția QCI-ASA de concentrație 0,050 mg/ml, evaluându-se precizia prin interpretarea statistică a valorilor experimentale obținute. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.19.

Tabel 2.19. Rezultate obținute la analiza în zile consecutive a soluției QCI-ASA

timp arie	<b>Ziua 1</b>	<b>Ziua 2</b>	<b>Ziua 3</b>
1	4362419	4378316	4359721
2	4399107	4400118	4384745
3	4344073	4393647	4339736
4	4357872	4341122	4366426
5	4346227	4336721	4336429
<b>Medie</b>	<b>4361940</b>	<b>4369985</b>	<b>4359911</b>
<b>RSD</b>	<b>0,51</b>	<b>0,67</b>	<b>0,47</b>

Prin analizarea soluției de QCI-ASA de concentrație 0,05 mg/ml în trei zile consecutive se obțin rezultate aproximativ egale cu deviație standard relativă, de 0,47% – 0,67%. S-au analizat statistic valorile ariilor picului corespunzător QCI-ASA în cele trei zile ale studiului, determinându-se ariile cu o deviație standard relativă (RSD) de 0,12%. Această valoare este dovadă a robusteții metodei, deviația standard relativă calculată fiind mult sub valoarea 2, valoare maximă acceptabilă.

### 2.4.2.2. Evaluarea linearității

Pentru evaluarea linearității se trasează curba de etalonare, variația ariei picului cu concentrația solutului. Se stabilește domeniul de liniaritate al metodei, adică intervalul de concentrații în care valoarea semnalului analitic este proporțională cu concentrația, de aceea în acest domeniu de concentrații analitul se poate determina cu exactitate și precizie rezonabilă, acceptabilă.

Pentru evaluarea liniarității se prepară soluții de concentrații 0,01mg/ml 0,025mg/ml 0,04mg/ml și 0,05 mg/ml QCI-ASA, prin diluții succesive a soluției stoc de are concentrația 0,1 mg/ml. Soluțiile se analizează prin injecții repetate, se evaluează statistic rezultatele prin calcularea deviației standard relativă a răspunsului analitic obținut. Prin reprezentarea grafică a mediei valorii ariilor picurilor obținute în funcție de concentrație, se determină curba de etalonare. Se evaluează liniaritatea dreptei obținute. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabel 2.20, figura 2.10.

Tabel 2.20. Analiza soluțiilor de QCI-ASA pentru evaluarea linearității

Nr. Probă	Aria picului (mV·s)			
	0,01mg/ml	0,025 mg/ml	0,04 mg/ml	0,05 mg/ml
1	87377	217121	343555	436241
2	89432	219443	341074	439910
3	90368	220173	345431	435407
4	90142	216531	347147	435787
5	86424	218933	342003	434322
<b>Medie</b>	<b>88749</b>	<b>218441</b>	<b>343843</b>	<b>436335</b>
<b>SD</b>	<b>1755</b>	<b>15522</b>	<b>24789</b>	<b>21216</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>1,98</b>	<b>0,71</b>	<b>0,73</b>	<b>0,49</b>

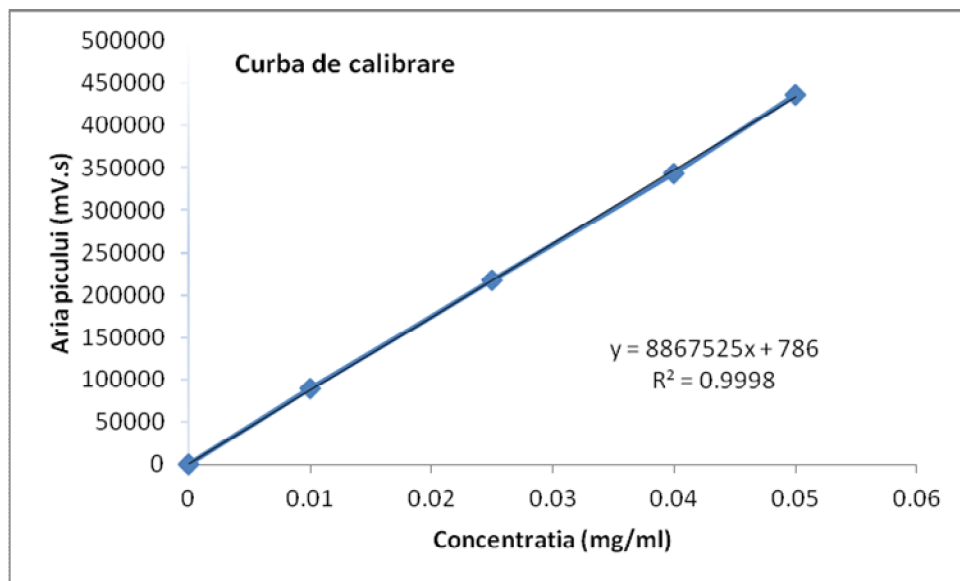


Figura 2.10. Curba de etalonare pentru QCI-ASA

O metodă de analiză este liniară și lipsită de abatere atunci când panta curbei de liniaritate trece prin origine și are un coeficient de corelație  $R^2 = 0,9998$ .

Reprezentând grafic valorile obținute experimental se obține o dreaptă a cărei ecuație este:

$$c \text{ (mg/ml)} = 886725 \cdot a + 786$$

unde: c - concentrația

a – aria determinată prin cromatorafiarea soluției de analit

În tabelul 2.21 sunt prezentate rezultatele testării liniarității pentru metoda HPLC propusă.

Tabel 2.21. Rezultatele testării liniarității

Parametru	Valori
Concentrație ( $\mu\text{g/ml}$ )	10 -50
Coeficient de regresie( $R^2$ )	0,9998
Panta	886725

În intervalul de concentrație 0,01 mg/ml - 0,05 mg/ml există liniaritate între aria picului QCI-ASA determinată și concentrația probei, cu un coeficient de corelație  $R^2 = 0,9998 \geq 0,99$ . O valoare minimă a coeficientului de corelație a dreptei de 0,99 este limita minimă admisă.



### 2.4.2.3. Determinarea limitei de detecție și limitei de cuantificare

Limita de detecție este egală cu concentrația pentru care raportul semnal analit/zgomot de fond este egal cu cel puțin 3:1.

Limita de detecție se poate calcula pe baza deviației standard a răspunsului și panta dreptei de linearitate\_[ICH]

$$LD = 3,3 \alpha/P \quad LQ = 10 \alpha/P$$

Unde:  $\alpha$  – deviația standard al probei martor

P – panta dreptei

Pentru determinarea deviației standard a probei martor se injectează de trei ori o probă preparată asemănător preparării probei fără a introduce și analitul. Se injectează 3 trei ori această soluție și se înregistrează valoarea ariei picului zgomotului de fond la timpul de retenție corespunzător picului de analit. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.22.

Tabel 2.22. Rezultatele analizei probei martor

Nr. Probă	Timp de retenție (min)	Arie pic (mV·s)
1	9,56	803
2	9,55	778
3	9.69	793
<b>Medie</b>	<b>9,60</b>	<b>791,33</b>
<b>SD</b>	<b>0,078</b>	<b>12,58</b>

Astfel s-a determinat:

$$\alpha = 12,58 \text{ mV}\cdot\text{s}$$

$$P = 8867525$$

Aplicând modul de calcul pentru limita de detecție și limita de cuantificare obținem:

$$LD = 3,3 \cdot 12,58/8867525 = 0,0000046 \text{ mg/ml}$$

$$LQ = 10 \cdot 12,58/8867525 = 0,000014 \text{ mg/ml}$$

#### 2.4.2.4. Verificarea robusteții metodei

Studiul robusteții permite să se definească variațiile admisibile pentru parametrii operatorilor critici, care nu au efect asupra validității rezultatelor furnizate de metoda de analiză.

Având în vedere condițiile de analiză pentru produsul QCI-ASA s-a urmărit influența:

- Variației debitului fazei mobile
- Variației pH-ului fazei mobile
- Variației lungimii de undă de detecție

Rezultatele obținute în cazul varierii acestor parametrii cu  $\pm 10\%$ , sunt prezentate în tabelul 2.24

Tabel 2.24. Rezultate obținute la evaluarea robusteții metodei

parametru conc	Valoarea concentrației de analit regăsit					
	Debit		pH		Lungine de undă	
	0,5 ml/min -10%	0,5 ml/min -10%	3 - 10%	3 + 10%	254nm -10%	254 + 10%
1	0,47	0,50	0,52	0,50	0,50	0,51
2	0,47	0,51	0,51	0,52	0,51	0,50
3	0,49	0,51	0,51	0,51	0,50	0,50
<b>Medie</b>	<b>0,476</b>	<b>0,506</b>	<b>0,513</b>	<b>0,51</b>	<b>0,506</b>	<b>0,503</b>
<b>ER(%)</b>	<b>4,8</b>	<b>1,2</b>	<b>2,6</b>	<b>2,9</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>

În fiecare caz se calculează eroarea relativă în cazul acestor determinări cu ajutorul relației:

$$ER(\%) = (A-0,5)/0,5 \cdot 100$$

Erorile determinate variază între 0,6 – 4,8%. Rezultatele cu eroarea cea mai mare se obțin la variația debitului fazei mobile. În cazul variațiilor pH-ului fazei mobile, erorile relative de determinare a conținutului QCI-ASA variază între 2,6 – 2,9. Variația lungimii de undă are influența cea mai mică în această determinare.

Valorile experimentale obținute demonstrează că metoda de analiză propusă este exactă, permitând determinarea conținutului rapid și precis.

### 3. CONCLUZII

- S-a realizat sintetiza a 8 produși noi, obținuți prin reacții de substituție SN2 a alcaloizilor cinchona – cinconina și cinconidina. Compușii noi sintetizați sunt derivați ai 1-azabicyclo[3.2.2]nona. Producții noi sintetizate au fost caracterizate prin spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN, IR, MS și analiză elementală. Acești compuși sunt precursori pentru noi catalizatori de fază în reacții asimetrice precum a unora biologice activi.
- S-au sintetizat 6 noi produși, esteri ai alcaloizilor cinchona truncați QCI și QCD prin reacția clorurilor de acid cu 1,2-aminoalcooli derivați ai alcaloizilor cinchona. Compușii noi sintetizați au fost caracterizate prin spectroscopie H-RMN, IR, MS și analiză elementală. Randamentele de sinteză sunt bune.
- S-au sintetizat 3 produși noi, cu randamente bune, amide a alcaloizilor cinchona truncați QCI și QCD prin reacția dintre clorurile de acil și 1,2-diamina QCINH<sub>2</sub>. Producții noi sintetizate au fost caracterizate prin spectroscopie H-RMN, IR, MS și analiză elementală.
- S-au optimizat două procedee de sinteză a doi compuși obținuți prin substituție a alcaloizilor cinchona - cinconina și cinconidina, prin stabilirea raportului molar optim a reactanților.
- S-a elaborat o nouă tehnologie de sinteză a cinconidinei din cinconină, prin oxidarea cinconinei la cinconidinonă, urmată de reducerea cu borohidruură de sodiu, în prezență de acid tartric. Prin tratare cu soluție de hidroxid de amoniu în mediu alcoolic și purificare, se obține cinconidina de puritate peste 99,9%. Sinteza a fost monitorizată prin cromatografie HPLC. Calitatea produsului respectă cerințele normative pentru produse farmaceutice.
- Pentru produsul nou, esterul acidului acetilsalicilic a QCI (QCI-ASA), produs potențial biologic activ, s-a elaborat o metodă de analiză prin cromatografie lichidă HPLC, stabilindu-se faza staționară optimă și compoziția fazei mobile, care asigură o separare bună.
- S-a validat metoda de analiză elaborată pentru compusul QCI-ASA, evaluându-se precizia, liniaritatea, robustețea, limita de detecție și limita de cuantificare. Studiul

efectuat a demonstrat că metoda de analiză elaborată pentru compusul QCI-ASA este precisă, robustă și rapidă.

- Rezultatele au făcut obiectul a două articole unul publicat în revistele Studia, 2011 și cel de-al doilea trimis spre publicare la Revue Roumaine de Chimie.
- Rezultatele au fost prezentate și sub formă de două comunicări științifice la manifestări interne și internaționale.

**Bibliografie selectată**

- 1 B.T. Richard, R.B.Woodward, *The Alkaloid. Chemistry and Physiology*, volIII, NewYork, 1953, p2-63;
- 2 D.C. Warhurst, J.C.Craig, *Malaria Journal*, 2003, vol.10, 1186-1199;
- 12 A.Tadensz, *Alkaloids-secret of life*, 2007, Elsevier;
- 13 L. Mink, Z. Ma, R.A. Olsen, J.N.James, D.S.Sholl, L.J.Mueller, F.Zaera, *Chiral Catalysis*, 2008, 48(1-4), 120-127;
- 14 K.Balazsk, T.Martinek, *J.Mol.Cat*, 2007, vol 272, 265-274;
- 15 *Encyclopedia of Physical Science and Technology, Organic Chemistry*, ed.3, 2002;
- 16 D.Kozma, *C.R.C Handbook of optical resolution via diastereomere salts*, 2002, CRC Press;
- 18 C.E.Song, *Cinchona Alkaloids in Synthesis and Catalysis*, 2009, Wiley-VCH;
- 19 A.Berkessel, H.Groger, *Asymetric organocatalysis*, 2005, Wiley-VCH;
- 21 R.P.Singh, K.Bartelsan, *J. Am. Chem. Soc*, 2008, vol.130, 2422-2423;
- 22 R.B.Woodward, W.E.Doering, *J. Am. Chem. Soc*, 1945, 67, 869-875;
- 29 T.G.Waddell, T.Rambalakpos, K.R.Christie, *J. Org. Chem*, 1990, vol.55, 4765-4767;
- 30 W.Braje, J.Frackenpohl, P.Langer, *Tetrahedron*, 1998, vol.54, 3495-3499;
- 31 K.Takai, K.Nitta, K.Utimoto, *J. Am. Chem. Soc*, 1986, vol.108, 7408-7411;
- 32 T.Okazoe, K.Takai, K.Utimoto, *J. Am. Chem. Soc*, 1987, vol.109, 951-955;
- 33 H.M.R.Hoffmann, *BvUS 5777122*, 1998, C1C07D;
- 34 H.M.R.Hoffmann, J.Frackepohl, *Eur. J. Org. Chem*, 2004, 4293-4312;
- 36 C.Johansson, N.Bremeyer, L.S.V.Owen, *Angew. Chem*, 2006, 118, 6170, 6174;
- 37 L.Hinterman, M.Schmitz, U.Englert, *Angew. Chem. Int. Ed*, 2007, 46, 5164-5176;
- 38 A.Berkessel, M.Guixa, F.Schmidt, *Chem. Eur. J*, 2007, 13, 4483-4487;
- 39 T.Marcelli, J.H. van Maarseveen, H.Hiemstra, *Angew. Chem*, 2006, 118, 7658-7662;
- 40 N.Khiar, F.Alcudia, J.L.Espartero, *J. Am. Chem. Soc*, 2002, 122, 7598-7600;
- 41 I.Fernander, N.Khiar, *Chem. Rev*, 2003, 103, 3651-3655;
- 42 S.P.Rostaing, C.Saluzzo, R.T.Halle, *Tetrahedron Asymmetry*, 2001, 22, 231-235;
- 43 R.A.Olsen, D.Barchardl, L.Mink, *J. Am. Chem. Soc*, 2006, 128, 15594-15596;
- 44 V.M.Maier, S.Schefzick, G.M.Lambardo, *J. Am. Chem. Soc*, 2002, 124, 8611-8628
- 45 Ho Sik, Song Ho Ohi, J. Woong Lee, *Chem Commun*, 2008, 1208-1210;

- 46 A. Erkkila, I. Majander, P.M. Pihko, *Chem. Rev.* 2007107, 5416 – 5470;
- 89 W.M.Braje, J.Holzgreff, R.Wartchow, H.M.R.Hoffmann, *Angew.Chem.Int.Ed.* 2000, 39, 2085-2087;
- 90 Vereinigte Chininfabriken Zimmer &Co, DE 128116/1900, 129452/1915, 131723/1915;
- 91 H.Chen. Y.Jin, R.Jiang, *Catalysis Communication*, 2008, 9, 1858-1862;
- 109 I.Neda, T.Kaukorat, C.G.Hrib, *Tetrahedron Asymmetry*, 2002, 13, 1327-1330;
- 110 I.Neda, T.Kauborat, A.K.Fischer, *Eur.J.Org.Chem*, 2003, 3784-3786;
- 111 A.Hurtukho, S.A.Modin, P.G.Anderson, *Org.Biomed.Chem*, 2003 ,1, 2522-2526;
- 125 W.M.Braje, R.Wartchow, H.M.R.Hoffmann, *Angew.Chem.Int.Ed.* 1999, 38(7), 2539-2543;
- 129 O.Schrake, H.M.Franz, R.Wartchow, H.M.R.Hoffmann, *Tetrahedron*, 2000, 50, 4453-4465;
- 130 M.H.Franz, S.Roper, R.Wartchow, H.M.R.Hoffmann, *J.Org.Chem*, 2004, 69, 2983-2991;
- 131 S.Roper, M.H.Franz, R.Wartchow, H.M.R.Hoffmann, *J.Org.Chem*, 2003, 68, 4944-4946;
- 132 S.Ropper, Y.Frackenpohl, O.Schroke, 2000, *Org. Lett.*, vol2, No12, pp1661-1664;
- 150 R.Verpoorte, A.B.Svendsen, *Chromatography of Alkaloids, part B, Gas-liquid chromatography and high performance liquid chromatography*, *Journal of Chromatography Library*, 1984, vol. 23B, Elsevier;
- 151 P.B. Marhall, E.W.Rogers, *Biochem J.*, 1945, 39(3), 258;
- 152 A.O.Gettler, I. Sunshine, *Anal. Chem.*, 1951, 23(5), 779;
- 153 D.V.McCalley, *Analyst*, 1990, 115, 1355-1358;
- 154 Z.Gong, Z.Zang, X.Yang, *Analyst*, 1997, 122, 283-285
- 155 H.Mistra, B.K.Mehta, D.C.Jain, *Rec.Nat.Prod*, 2008, 2(4), 107-115;
- 157 B.J.Kline, V.A.Turner, W.H.Barr, *Analytical Chemistry*, 1979, 51(3), 440-451;
- 158 R.G.Achhari, J.L.Baldrige, T.R.Koziol, *J.Chromatogr.Sci*, 1978, 16, 271-275;
- 166 **S. Bota**, I. Neda, L. Silaghi-Dumitrescu, *Studia UBB Chemia*, 2011, LVI,3,279-286
- 167 C.P.Adams, V.V.Brantner, *Drug Dev.* 2006, 25, 23–24;
- 168 D.J.Payne, M.N.Gwynn, D.J.Holmes, D.L.Pompliano, *Drug Discovery* 2007, 6, 29–40;
- 169 F.W.Muregi, A.Ishih, *Drug Development Research*, 2010, 71, 20-32;
- 170 I.Paterson, E.A. Anderson, *Science* 2005, 310, 451–453;
- 171 D.J.Newman, G.M.Cragg, *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 461–477;

- 172 C.H.Arnaud, Science et. Technology, 2007, 46;
- 173 C.M Turnbull, P. Mascario, T.A. Sheldrake, L. Lazzarato, C. Cena, A.G. Rossi, J.Inflammation, 25(12), 2008, [www.nvbi.nih.gov/pmc/articles/PMN2525633](http://www.nvbi.nih.gov/pmc/articles/PMN2525633)
- 174 D.C.Rees, M.Congreve, C.W. Murray, R.Carr, Nat. Rev. Drug Discovery 2004, 3, 660–672.;
- 175 D.S. Schellenberg, S. Abdulla, C. Ropper,C. Mol. Med, 2006, 6, 253-260;
- 176 A.Bigi,A.Rampa, R.Budriesi,S. Gabbi, F.Belluti, P.Ioan, E.Valoti, A. Chiarini, Bioorg. Med. Chem, 2003, 11, 1353-1361;
- 177 **S.Bota**, L. Silaghi-Dumitrescu, I. Neda, C. Cristea, Revue Roumaine de Chimie, 2012 , *Trimis pt. publicare*
- 178 H.M.R. Hoffmann, O. Schrake, Tetrahedron Asymmetry, 1998, 9, 1051-1057;
- 179 **S. Bota**, M. Sebesan, A. Cozma, International Conference on Science, Universitatea din Oradea, Nov. 2009;
- 180 R.B. Woodward, N.L.Wendel, F.J. Brutschy,J. Am.Chem.Soc, 1945, 67, 1425-1428;
- 181 W. E Woodward, J.Org.Chem, 1963, 28, 1431-1436;
- 182 **S. Bota**, International Conference on Science, Universitatea din Oradea, Nov. 2011;
- 183 EMEA- ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures, 1995
- 184 L. Roman, M.Bojita, R.Sandulescu, D.L.Muntean, Validarea metodelor analitice, 2007, Ed. Medicala