

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Lucija Hok

**MEHANIZAM REAKCIJE KlorIRANJA 5-FLUOROURACILA I
EKOTOKSIKOLOŠKA ANALIZA KlorIRANIH PRODUKATA**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini

2016./2017.

KRATICE

DFT	teorija funkcionala gustoće (engl. <i>Density Functional Theory</i>)
DMSO-d ₆	deuterirani dimetilsulfoksid
D ₂ O	deuterirana voda
EC ₅₀	polovina maksimalne efektivne koncentracije (engl. <i>half maximal effective concentration</i>)
ESI	elektrosprej ionizacija (engl. <i>electrospray ionization</i>)
5-FU	5-fluorouracil
G	Gibbsova slobodna energija
ΔG_{solv}	Gibbsova slobodna energija solvatacije
HF	Hatree-Fock (funkcional)
IRC	intrinzička reakcijska koordinata (engl. <i>intrinsic reaction coordinate</i>)
LC-MS	tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
NImag	broj imaginarnih vibracijskih frekvencija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PES	ploha potencijalne energije (engl. <i>potential energy surface</i>)
TS	prijelazno stanje (engl. <i>transition state</i>)
ZPE	energija nulte točke (engl. <i>zero-point energy</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

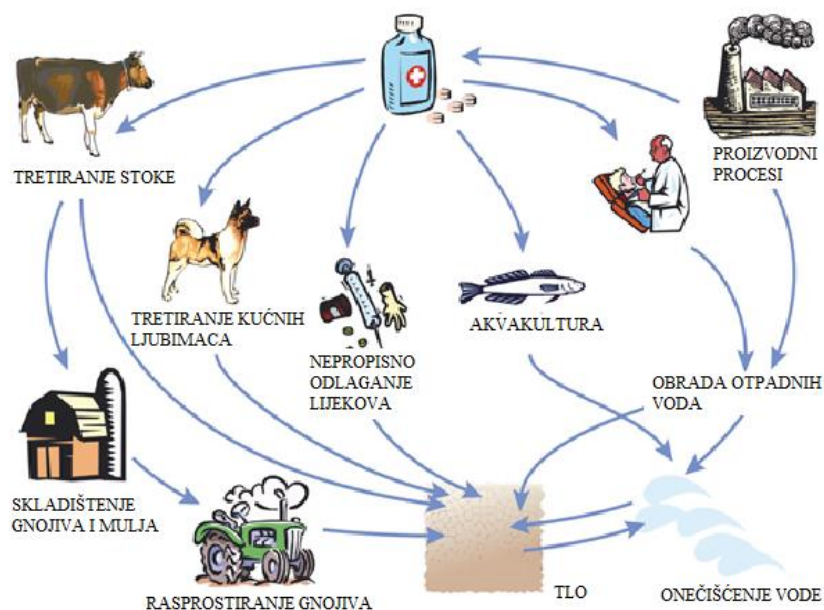
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Lijekovi u okolišu.....	1
1.2. Obrada otpadnih voda kloriranjem	2
1.3. 5-fluorouracil.....	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	5
3. MATERIJALI I METODE	6
3.1. Osnove kvantno-kemijskih izračuna	6
3.2. Metode i parametri kvantno-kemijskih izračuna	8
3.3. Solvatacijski efekti	8
3.4. Korištene računalne metode	9
3.5. NMR spektroskopija.....	10
3.6. Spektrometrija masa	11
3.7. Priprava klorhidrina 3a , N1-kloramida 6 i hidrata 11	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. NMR analiza reakcijske smjese 5-FU i HOCl	14
4.2. LC-MS analiza klorhidrina 3a	17
4.3. NMR analiza reakcijske smjese klorhidrina 3a i HOCl	17
4.4. LC-MS analiza hidrata 11	20
4.5. Reakcijski mehanizam kloriranja 5-fluorouracila	21
4.6. Ekotoksikološka analiza	30
5. ZAKLJUČAK	31
6. ZAHVALE	33
7. POPIS LITERATURE	34
8. SAŽETAK	40
9. SUMMARY	41
PRILOZI	42

1. UVOD

1.1. Lijekovi u okolišu

Farmaceutici su spojevi koji se upotrebljavaju u svrhu liječenja i sprječavanja bolesti ili unaprjeđenja zdravlja ljudi i životinja te kao promotori rasta u veterinarskoj medicini. Posljedica upotrebe farmaceutika je njihova prisutnost u okolišu gdje podliježu akumulaciji u tlu ili abiotičkim i biotičkim procesima razgradnje, ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima okoliša. Poseban problem lijekova u okolišu predstavljaju njihovi razgradni produkti ili metaboliti. Pod utjecajem svjetla ili prilikom kemijske obrade otpadnih voda mnogi se lijekovi transformiraju u nove strukture o kojima znanost vrlo malo zna (Vrček, 2017). Farmaceutici pripadaju skupini tzv. „novih zagađivala“ (Daughton, 2005; Bu i sur., 2013), zajedno sa sredstvima koja se upotrebljavaju u svrhu poboljšanja kvalitete svakodnevnog života (ovlaživači, ruževi, šamponi, boje za kosu, dezodoransi, paste za zube), a njihova koncentracija u okolišu predstavlja potencijalnu opasnost za ekosustav zbog nepostojeće zakonske regulative o njihovu ispuštanju u okoliš (Boxall i sur., 2012). U okoliš dospijevaju komunalnim otpadnim vodama, putem humanih ili animalnih ekskreta, ali i namjernim nepropisnim odlaganjem neupotrijebljenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja (Slika 1.). Značajan izvor predstavljaju i dodaci prehrani u akvakulturi. Međutim, prisutnost farmaceutika u okolišu najvećim je dijelom uzrokovana njihovom nepotpunom obradom u postrojenjima za obradu otpadnih voda ili neprikladnim načinima obrade, pri čemu učinkovitost njihova uklanjanja ovisi o procesu obrade vode, kao i o uvjetima primijenjenima tijekom procesa (Le-Minh i sur., 2010).



Slika 1. Glavni načini dospijevanja farmaceutika u okoliš. (Boxall i sur., 2012)

1. 2. Obrada otpadnih voda kloriranjem

Obrada otpadnih voda se provodi u svrhu postizanja prihvatljivosti za ispuštanje u okoliš ili smanjenja rizika izlaganju ljudi patogenim mikroorganizmima (Blatchley i sur., 2007). Osvještavanjem o problemu nedostatka pitke vode u dijelovima svijeta s velikom koncentracijom industrije i stanovništva te o negativnom utjecaju na okoliš, zahtjevi za kvalitetom ispuštene vode postaju sve stroži. Dezinfekcija otpadnih voda se najčešće provodi kloriranjem zbog ekonomske isplativosti, efikasnosti i jednostavnosti postupka. Kloriranjem se oksidiraju organske i anorganske tvari, smanjuje količina aktivnog mulja prije odlaganja, kontroliraju mirisi te efektivno uništava veliki broj bakterija, virusa i protozoa odgovornih za teške infekcije, poput *Salmonella* sp., *Shigella* sp. i *V. cholerae* (Haas, 1987; Carvajal i sur., 2017). Pritom se klor može koristiti u plinovitom obliku (molekulski Cl₂ ili klorov dioksid ClO₂), u obliku natrijevog hipoklorita (NaClO), kalcijevog hipoklorita (Ca(ClO)₂), kalcijevog klorida-hipoklorita (CaCl(ClO)) te kloramina. Višak klora nakon obavljene dezinfekcije i uspostavljene ravnoteže naziva se slobodni rezidualni klor (SRK) i marker je uspješne dezinfekcije. S obzirom da su rezidue klora, čak i u malim koncentracijama, toksične za vodeni ekosustav, potrebno je provesti dekloriranje pomoću komercijalno dostupnih filtera za vodu s aktivnim ugljenom, natrijevim sulfitom ili alternativnim metodama (npr. askorbinska kiselina) (www.epa.gov).

Kada se uvodi u vodu, (Valić i sur., 2001) molekulski klor (Cl₂) reagira s vodom i disproporcionira se u hipoklorastu kiselinu (HOCl) i klorovodičnu kiselinu (HCl) prema jednadžbi (1):



HOCl je u ravnoteži s molekulskim klorom (Cl₂) prema izrazu (1) i hipokloritnim anionom (OCl⁻) prema izrazu (2):

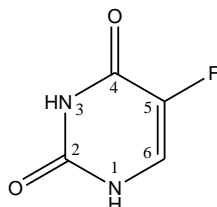


Važan utjecaj na efikasnost dezinfekcije klorom imaju temperatura, vrijeme kontakta i pH. O pH otopine ovisi i distribucija klornih specija, pri čemu vrijedi da je molekulski klor (Cl₂) klorirajuća specija pri niskom pH, oko pH = 6 prevladavajuća specija je hipoklorasta kiselina (HOCl), a pri pH = 9 hipokloritni anion (OCl⁻) (Antelo i sur., 1995).

Reakcije lijekova s klorirajućim specijama su slabo istražene. U literaturi je opisano više primjera reakcija HOCl i lijekova (Sharma, 2008; Soufan i sur., 2012) pri čemu nastaju reaktivniji, toksičniji ili perzistentniji oblici, međutim, sam mehanizam kloriranja opisan je u vrlo malom broju radova te je potrebno daljnje istraživanje (Šakić i sur., 2014; Tandarić i sur., 2016).

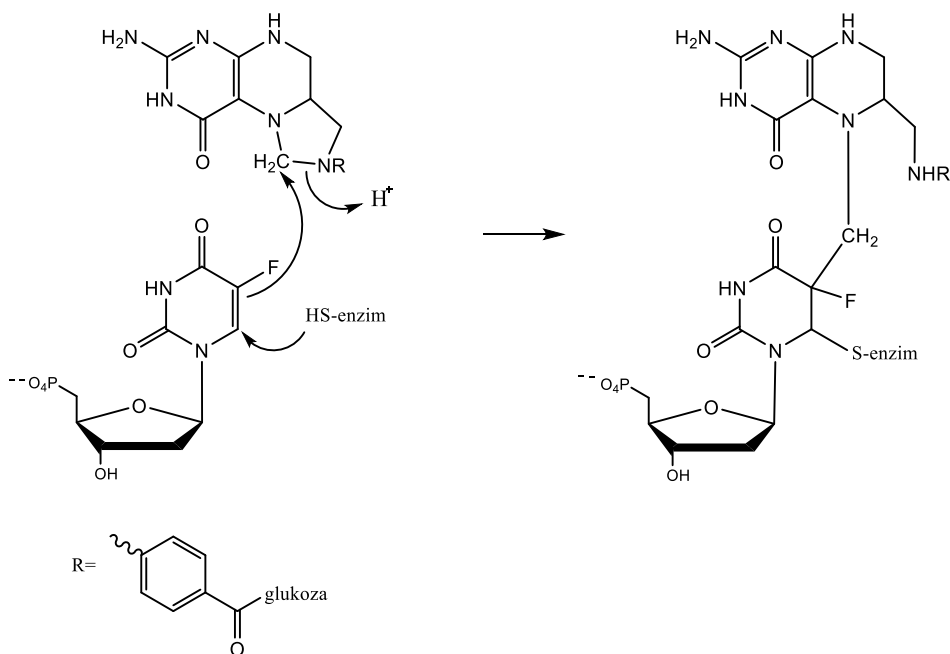
1. 3. 5-fluorouracil

5-fluorouracil je citostatik koji spada u skupinu antimetabolita (spojevi koji su strukturno slični metabolitu u stanici čiju funkciju inhibiraju) (Slika 2.). Prema kemijskoj podjeli pripada analogima pirimidina, a prema mehanizmu djelovanja je inhibitor timidilat-sintaze. Nalazi se na WHO listi esencijalnih lijekova potrebnih za osnovnu zdravstvenu zaštitu (www.who.int).



Slika 2. Strukturna formula 5-FU s označenim brojevima atoma u prstenu.

5-FU je prolijek koji se aktivira katalitičkim djelovanjem adenin fosforiboziltransferaze i ribonukleotid reduktaze do ribozil i deoksiribozil nukleotid metabolita. Jedan od metabolita, 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-monofosfat (FdUMP) djeluje kao suicidalni supstrat za timidilat-sintazu stvarajući kovalentnu vezu sa sulfhidrilnom skupinom enzima i koenzimom *N*5, *N*10-metilen-tetrahidrofolatom preko metilenske jedinice. Kovalentno i ireverzibilno vezanje za aktivno mjesto enzima onemogućuje prijenos metilenske jedinice na uracil te posljedično nastajanje timina jer se fluor u položaju C5 ne može odcijepiti u protonskom obliku (Slika 3.).



Slika 3. Prikaz mehanizma suicidalne inhibicije timidilat-sintaze 5-fluorouracilom.

Rezultat inhibicije *de novo* sinteze deoksitimidin-5'-monofosfata (dTMP) su spriječene replikacija DNA i dioba što uzrokuje smrt stanice, tzv. „*thymineless death*”. Citotoksičnosti 5-FU doprinose i 5-fluorodeoksiuridin-5'-trifosfat (FdUTP) koji inhibira sintezu i funkciju DNA te 5-fluorouridin-5'-trifosfat (FUTP) koji, inkorporiran u RNA, interferira s transkripcijom i posttranskripcijskom doradom mRNA.

5-FU je indiciran kod ranog stadija karcinoma dojke, ranog i metastatskog stadija kolorektalnog i analnog karcinoma, gastroezofagealnog te hepatocelularnog karcinoma (Katzung i Trevor, 2015). Osim toga, primjenjuje se i topikalno kod karcinoma kože. Najčešće i najznačajnije nuspojave su mučnina, mukozitis, dijareja, mijelosupresija i neurotoksičnost.

Zbog brze eliminacije ($t_{1/2} = 15-20$ min), 5-FU se primjenjuje u obliku intravenske injekcije te kao intravenska ili intraarterijska infuzija (www.halmed.hr). Nakon administracije, 80-85% doze se metabolizira dihidropirimidin dehidrogenazom u jetri i tumorskoj stanici do inaktivnog dihidrofluorouracila (DHFU), a nedostatak ovog enzima dovodi do teških intoksikacija 5-fluorouracilom.

Prema Izvješću o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2015. godini (www.halmed.hr), 5-FU je jedan od najčešće korištenih citostatika. Budući da nema povoljnu biorazgradivost (Kümmerer, 2008), potrebno je detaljnije istražiti njegovu sudbinu u okolišu. 5-FU je mala supstancija koja prolazi kroz postrojenja za obradu otpadnih voda i dospijeva u površinske vode, a zbog negativnog učinka na bakterije, kapacitet autopurifikacije vode bitno je smanjen. Studije (Kosjek i sur., 2013) su pokazale da se 5-FU nalazi u otpadnim vodama u koncentracijama od 4.7 do 14.0 ng/L, dok u otpadnim vodama bolnica ta razina doseže i 92.0 ng/L. Pokazano je da u koncentracijama u kojima je 5-FU zabilježen u otpadnim vodama inhibira rast primarnih proizvođača (algi i cijanobakterija) (Elersek i sur., 2016), te djeluje genotoksično na vodene organizme (Kračun-Kolarević i sur., 2015). Posebno zabrinjava sinergistički učinak smjesa citostatika (npr. 5-FU, cisplatin, etopozid, imatinib mesilat) na fitoplanktone (Brezovšek i sur., 2014) što upućuje na zaključak da podaci o toksičnosti dobiveni jednodimenzionalnim analizama nisu reprezentativni u predviđanju cjelokupnog štetnog učinka na vodeni ekosustav te da je situacija mnogo ozbiljnija nego što se smatra.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Kemija 5-FU i drugih pirimidina važno je područje u biomedicinskim istraživanjima. Antimetabolički učinak 5-FU iskorišten je u terapijske svrhe u onkologiji. U novije vrijeme 5-FU je postao predmetom ekoloških istraživanja. Objavljeni su radovi o njegovoj kemijskoj sudbini u okolišu i o toksičnosti na vodene organizme. U mnogim analitičkim studijama prikazane su reakcije pregrađivanja 5-FU, posebice kao posljedica obrade otpadnih voda kloriranjem (Tandarić, 2016).

Osim bioloških učinaka kloriranih produkata 5-FU na ekosustav, nepoznat je i položaj kloriranja u strukturi 5-FU. U literaturi su nađeni različiti podaci. Dok neki autori (Miyashita i sur., 1982) smatraju da dolazi do kloriranja u C5 položaju, drugi (Li i sur., 2015) tvrde da se kloriranje odvija u C6 položaju, nakon čega slijede sekundarne reakcije koje rezultiraju nastajanjem polikloriranih spojeva. U studijama u kojima se istražuje kloriranje uracila (Gould i sur., 1983) razmotrena je, također, mogućnost kloriranja dušikovih atoma u pirimidinskom prstenu.

U svrhu rješavanja kontroverzija regioselektivnosti u reakciji kloriranja 5-FU i njegovih kloriranih produkata te otkrivanja reakcijskog mehanizma, u ovom su radu korištene eksperimentalne (sinteza, NMR spektroskopija, spektrometrija masa) i teorijske (DFT računi) metode. Reaktanti, međuprodukti, produkti i prijelazna stanja su locirani kvantno-kemijskim metodama. Eksperimentalno je provedena reakcija kloriranja 5-FU s HOCl/Cl₂ u vodi i napravljena usporedba s teorijskim podacima. Dobiveni produkti su izolirani i karakterizirani NMR spektroskopijom i spektrometrijom masa. S obzirom da se radi o biološki i ekološki relevantnom procesu, također je napravljena ekotoksikološka analiza 5-FU, međuprodukta klorhidrina **3a** i produkta **11** na testnom organizmu voden buhi (*Daphnia magna*) u svrhu procjene utjecaja navedenih supstancija na organizme vodenog ekosustava.

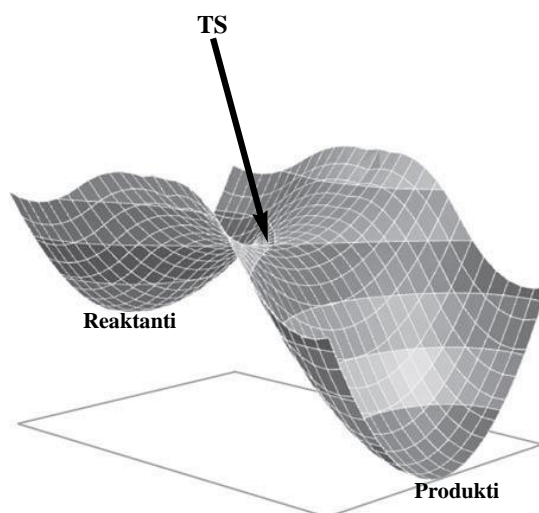
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Osnove kvantno-kemijskih izračuna

Kvantno-kemijske metode pripadaju metodama molekuskog modeliranja, tj. metodama elektronske strukture. Iznimno su korisne u opisivanju sudbine lijekova u okolišu jer mogu točno procijeniti različite puteve razgradnje/pregradnje, interakciju s drugim molekulama te koeficijente distribucije. Olakšavaju dizajniranje tzv. „zelenih lijekova“, farmaceutskih derivata s istim terapijskim, a povoljnijim ekološkim učinkom (Tandarić, 2016).

Najvažnija informacija, kao rezultat kvantno-kemijskih izračuna je elektronska energija. Izračunava se rješavanjem Schrödingerove jednačbe (unutar Born-Oppenheimerove aproksimacije), u skladu s odabranom teorijskom metodom, i neophodna je za procjenu relativne termodinamičke stabilnosti.

Strukturne promjene unutar molekule (duljine veza, vrijednosti veznih i diedarskih kuteva) uzrokuju promjene energije i ostalih svojstava molekuskog sustava (Foresman i Frisch, 1996). Geometrijska optimizacija je metoda energijske minimizacije, tj. iteracijski postupak određivanja molekulske strukture u minimumima elektronske energije uz pomoć optimizacijskih algoritama unutar određenog koordinativnog sustava koji opisuje položaj svih jezgara (npr. korištenjem kartezijevih koordinata). Ploha potencijalne energije (PES, engl. *potential energy surface*) je matematička funkcija koja svakoj molekulskoj strukturi pridružuje odgovarajuću energiju (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz PES-a za opću reakciju nastajanja produkata iz reaktanata preko prijelaznog stanja TS koje povezuje dva minimuma. (Bachrach, 2014)

PES definira način na koji energija molekuskog sustava varira s promjenama u njegovoj strukturi. Geometrijskom optimizacijom lociraju se stacionarne točke na PES-u. Stacionarna točka u kojoj su sve komponente gradijenta energije jednake nuli, a sve svojstvene vrijednosti matrice drugih

derivacija pozitivne predstavlja minimum energije i može odgovarati reaktantima, međuproduktima ili produktima. Stacionarna točka u kojoj je jedna svojstvena vrijednost matrice drugih derivacija negativna, a sve ostale pozitivne naziva se sedlasta točka prvog reda i označava prijelazno stanje (TS, engl. *transition state*) koje povezuje dva minimuma (Tandarić, 2016).

Za potpunu karakterizaciju stacionarne točke potreban je frekvencijski račun na odgovarajućoj teorijskoj razini. Frekvencijski račun izračunava frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom druge (i viših) derivacije energije u odnosu na atomske koordinate te rješavajući vibracijske Schrödingerove jednadžbe. Uz prikaz svih dostupnih vibracija atoma u molekuli (vrsta vibracije i atomi koji sudjeluju u vibraciji), frekvencijskim računom dobivamo i informaciju odgovara li optimizirana struktura minimumu na PES-u (reaktanti, međuprodukti i produkti) ili prijelaznom stanju TS. Ako postoji samo jedna imaginarna vibracijska frekvencija, dobiven je minimum u svim smjerovima osim u smjeru vibracije s imaginarnom frekvencijom, što predstavlja strukturu prijelaznog stanja za kemijsku reakciju na toj plohi potencijalne energije. Ukoliko je locirana stacionarna točka s dvije i više imaginarnih frekvencija potrebno je dodatno optimizirati strukturu dok se ne locira stacionarna točka s jednom (TS) ili bez (minimum) imaginarnih frekvencija. Postojanje jedne imaginarne frekvencije karakterizira točku kao prijelazno stanje, no potrebno je primijeniti dodatne procedure kako bi se došlo do zaključka koje minimume ispitivano prijelazno stanje povezuje. Za potvrdu traženog reakcijskog puta, kojeg definira TS, potrebno je pratiti oba reakcijska smjera prema gradijentu intrinzičke reakcijske koordinate (IRC, engl. *intrinsic reaction coordinate*). IRC (Fukui, 1981; Hratchian, 2005) je računalna tehnika kojom se parcijalno optimizira struktura duž reakcijske kooordinate. Početna točka u IRC računu odgovara strukturi prijelaznog stanja, a njezina se geometrija postupno optimizira (po reakcijskoj koordinati) do (među)produkata (napredni smjer) i reaktanata (povratni smjer). Dobivene strukture, nakon dodatne geometrijske optimizacije daju (lokalne) minimume koji odgovaraju reaktantima i (među)produktima povezanih tim prijelaznim stanjem.

Ukupna elektronska energija izračunata geometrijskom optimizacijom odgovara minimumu na PES-u. U stvarnosti molekula nema tu energiju jer nikada nije u stanju potpunog mirovanja, nego ima određeno vibracijsko, rotacijsko i translacijsko gibanje. Energija nulte točke (ZPE, engl. *zero-point energy*) se računa kao zbroj elektronske energije i tzv. „*korekcije nulte točke*”, energije koja odgovara najnižem vibracijskom stanju molekule pri 0 K (Cramer, 2004). Entalpija i entropija molekule se računaju kao različiti doprinosi translacijskog, vibracijskog i rotacijskog gibanja molekule (izvode se iz frekvencijskog računa) pribrojenu ZPE-u. Tu je uključena aproksimacija idealnog plina za translacijsko gibanje kao i aproksimacija rigidnog rotora za rotacijsko gibanje. U izračunima se mogu podesiti parametri za temperaturu (zadana temperatura iznosi 298 K) i tlak (zadani tlak iznosi 1 atm) te izotopi pojedinih elemenata. Gibbsova slobodna energija jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom ($G = H - TS$) (Foresman i Frisch, 1996)

3.2. Metode i parametri kvantno-kemijskih izračuna

U izradi ovog rada korištene su metode Teorije funkcionala gustoće (DFT, engl. *Density Functional Theory*). DFT metode se temelje na Kohn-Sham teoriji koja kaže da energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekulskom sustavu (Hohenberg i Kohn, 1964; Becke, 1992; Pople i sur., 1992). Uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu „reagiraju“ na kretanje drugih elektrona te se orijentiraju tako da su privlačne i odbojne sile u molekuli u ravnoteži. Prikladnim odabirom DFT parametara mogu se dobiti izračuni koji su usporedivi s puno zahtjevnijim *ab-initio* metodama. Parametri koje je potrebno odabrati su funkcional i bazni skup prikladan za odgovarajući opis modeliranog kemijskog sustava (Tandarić, 2016).

Funkcional je funkcija elektronske gustoće. DFT funkcionali se međusobno razlikuju prema opisu funkcionala izmjene, funkcionala korelacije i udjela HF (Hartree-Fock) funkcionala kao dopune člana izmjene (kod hibridnih funkcionala). Najpoznatiji i jedan od češće korištenih funkcionala je B3LYP (Becke Three Parameter Hybrid Functionals), koji se sastoji od Becke funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP), kojeg su razvili Lee, Yang i Parr te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni (Becke, 1988).

Bazni skup je baza vektorskog prostora u kojoj se zapisuju molekulske orbitale. Odabirom baznog skupa opisuje se valna funkcija s konačnim brojem baznih funkcija. Što je veći broj baznih funkcija koje opisuju valnu funkciju, to je uglavnom točniji opis molekularnih orbitala (Foresman i Frisch, 1996). Bazni skupovi se dijele prema broju primitivnih gaussiana za opis unutarnjih orbitala, broju i kombinaciji primitivnih gaussiana koji čine složenu osnovnu funkciju za opis valentnih orbitala te prisutnost difuzijskih i/ili polarizacijskih funkcija. Često korištena kombinacija je skupina Popleovih baznih skupova (Ditchfield i sur., 1971), s notacijom 6-31G i dodatnim difuznim i/ili polarizacijskim funkcijama. Kod opisivanja nabijenih sustava je nužan dodatak difuzne funkcije (označava se s „+“) kako bi se dobro opisao sustav. Općenito, pravilnom varijacijom baznog skupa mogu se postići točniji rezultati.

3.3. Solvatacijski efekti

Većina organskih reakcija se odvija u otopini pa je nužno izračunati interakciju otapala i otopljene tvari kako bi se opisali solvatacijski efekti. Najčešće korišteni pristupi su implicitna i eksplicitna solvatacija, odnosno kombinacija tih dvaju pristupa.

Implicitna solvatacija podrazumijeva model polarizabilnog kontinuuma. Proces solvatacije u ovim modelima se promatra kao niz sljedećih procesa: nastanak solvatacijske šupljine u polarizabilnom kontinuumu, ulazak promatrane molekule u „nastalu“ šupljinu i relaksacija kontinuuma oko molekule (Bachrach, 2014). U ovom su radu Gibbsove energije solvatacije izračunate koristeći CPCM solvatacijski model na odgovarajućoj teorijskoj razini s UFF atomskim radijusom i elektrostatskim skalarnim faktorom 1.1 (standardna vrijednost u Gaussian09 programu). UFF šupljine su odabrane kako bi se osigurao položaj sfera otapala oko lakih i teških atoma što je važno za prijelazna stanja koja uključuju transfer protona. Korištena relativna permitivnost otapala iznosi $\epsilon = 78.4$, što odgovara dielektričnoj konstanti vode.

Eksplisnim dodavanjem molekula otapala u kemijski okoliš promatranog sustava, simuliraju se solvatacijske ljuske (najčešće samo prva solvatacijska ljuska) koje se nalaze u bliskom kontaktu sa sustavom i time se razlikuju od otapala koje nije „u dodiru“ s otopljenom tvari. Za svaku je kemijsku strukturu potrebno odrediti „optimalan broj molekula otapala“ u solvatacijskoj ljusci, pri čemu struktura sa solvatacijskom ljuskom tvori zasebnu kemijsku speciju (Tadarić, 2016).

Supramolekulski solvatacijski model podrazumijeva kombinaciju implicitnog i eksplicitnog opisa otapala. Računalno je najzahtjevniji, ali daje najtočnije podatke, (Pliego, 2004), zbog čega je ovaj pristup korišten u svim solvatacijskim izračunima u ovom radu.

3.4. Korištene računalne metode

Svi računi (geometrijske optimizacije, frekvencijski računi i solvatacijski modeli) su provedeni upotrebom programskog paketa Gaussian09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009). U svrhu vizualizacije dobivenih rezultata (optimizacije i frekvencijski računi) korišten je program GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.). Svi su računi provedeni na klasteru Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu (www.srce.hr) i klastera Andrija na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (andrija.pharma.hr). Sve su geometrije optimizirane u zadanoj simetriji koristeći DFT funkcional B3LYP koji je najčešće korištena hibridna metoda (Becke, 1993). Za opis molekulskih orbitala korišten je bazni skup 6-31+G(d) koji se često koristi za kvantno-kemijske račune u organskoj kemiji. Kompleksi reaktanata, produkata, međuprodukata i prijelaznih stanja optimizirani su s dvije eksplicitno dodane molekule vode kako bi se točnije opisala prva solvatacijska ljuska. Za implicitnu solvataciju korišten je SMD solvatacijski model (otapalo voda, $\alpha = 1.2$).

3. 5. NMR spektroskopija

Nuklearna magnetska rezonancija je spektroskopska tehnika koja koristi magnetska svojstva pojedinih jezgara u svrhu dobivanja informacije o kemijskoj okolini same jezgre (Atkins i de Paula, 2014).

Jezgre koje se mogu proučavati NMR spektroskopijom su one koje imaju magnetski moment, tj. jezgre čiji je ukupni spin (I) različit od nule. To su obično jezgre s neparnim masenim brojem (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N). Jezgra koja ima spin I može imati $2I+1$ mogućih spinskih orijentacija. Primjerice, jezgre ^1H i ^{13}C imaju spinski broj $I=1/2$, stoga imaju dvije moguće orijentacije u odnosu na vektor vanjskog magnetskog polja. Ukoliko nema vanjskog magnetskog polja, energijske razine jezgara različitih orijentacija bit će jednake. Djelovanjem vanjskog magnetskog polja dolazi do separacije energetskih razina spinova. Što je jače vanjsko magnetsko polje, veće je razdvajanje energetskih razina. Do rezonancije dolazi pri apsorpciji one energije zračenja koja omogućuje prijelaz iz nižeg spinskog stanja u više. Radio-frekvencija tog elektromagnetskog zračenja ovisi o vanjskom magnetskom polju i naziva se frekvencija rezonancije ili Larmorova frekvencija (3):

$$\nu = \gamma B \quad (3)$$

pri čemu je ν Larmorova frekvencija, γ žiromagnetska konstanta, a B primijenjeno vanjsko magnetsko polje.

Kemijski pomak je relativni položaj rezonancijskog signala u NMR spektru, a uveden je kako bi na različitim spektrofotometrima iste jezgre imale isti položaj u spektrima, neovisno o jačini i vrsti NMR spektrometra. Najčešće se izražava u odnosu na referentnu supstanciju, što je u slučaju ^1H -NMR spektroskopije tetrametilsilan ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$). Kao referentni signali mogu se koristiti i signali deuteriranih otapala za koje je poznat kemijski pomak. Kemijski pomak dan je izrazom (4):

$$\delta = ((\nu_{\text{uzorak}} - \nu_{\text{ref}}) / \nu_{\text{ref}}) \times 10^6 \text{ ppm} \quad (4)$$

pri čemu su ν_{uzorak} i ν_{ref} frekvencije ispitivane i referentne tvari.

Primjena NMR spektroskopije se temelji na činjenici da magnetsko polje koje djeluje na jezgru nije jednako primijenjenom magnetskom polju. Razlog tomu je utjecaj elektrona oko jezgre koji zasjenjuju jezgru tako da ona „osjeća“ efektivno magnetsko polje, koje je umanjeno zbog utjecaja elektrona. Stoga će jezgre s elektron donirajućim skupinama koje oko sebe imaju veću elektronsku gustoću biti pod djelovanjem slabijeg efektivnog magnetskog polja. Sukladno tome, različita je i frekvencija rezonancije (Larmorova frekvencija) potrebna da bi jezgre prešle iz niže u višu energijsku razinu (5):

$$\nu = \gamma(1-\sigma)B \quad (5)$$

pri čemu je σ efekt zasjenjenja jezgre elektronima ($0 < \sigma < 1$).

Cijepanje signala spregom spinova nastaje zbog magnetskih međudjelovanja kemijski različitih jezgara susjednih atoma koje posjeduju spin u više različitih kombinacija spinskih stanja. Ovisno o tome koliko različitih susjednih jezgara postoji, i u koliko kombinacija spinova se one mogu nalaziti, efektivno polje koje promatrana jezgra osjeća je blago veće ili manje od onog koje bi osjećala da nema okolnih jezgara u blizini. Sprezanje n ekvivalentnih jezgara (ukoliko je njihov spin $1/2$) uzrokuje cijepanje signala na multiplet od $n+1$ signala.

Konstanta sprege ili cijepanja J (Hz) je razlika frekvencija između susjednih linija multipleta. Konstanta sprege, kao i tip cijepanja, daje informaciju o okolini u kojoj se jezgra nalazi.

U izradi ovog rada korištena je ^{13}C -, ^1H - i ^{19}F -NMR spektroskopija. Pomoću ta tri tipa NMR spektroskopije određivani su strukturni parametri reaktanata, intermedijera i dobivenih produkata. Pomoću konstanti cijepanja određena je konfiguracija stereoizomera. ^{19}F -NMR spektroskopija korištena je za određivanje doseg, odnosno završetka reakcije. Za lock signal korištena je kapilara s odgovarajućim deuteriranim otapalom (D_2O) ili je izolirana supstancija snimljena tako da je otopljena u D_2O ili deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-d_6). Svi spektri snimljeni su na uređaju Varian INOVA 400 koji koristi magnet snage 9.4 Tesla (400 MHz) na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Obrada spektara izvršena je u programu SpinWorks 4.2.0.0. (Spinworks 4.2.0.0., University of Manitoba).

3. 6. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je tehnika koja se temelji na ionizaciji molekula u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska uzorka u visoki vakuum. Ioni se stvaraju u plinovitoj fazi različitim metodama, a potom se ubrzavaju u akceleracijskoj komori primjenom električnog polja. U magnetskom polju dolazi do otklona iona (deflekcije) pri čemu vrijedi da se teži ioni manje otklanjaju. Posljedično dolazi do razdvajanja na temelju omjera mase i naboja. Nakon razdvajanja slijedi detekcija i određivanje molekulske mase ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta molekule nastalog njezinim cijepanjem (Watson, 1999).

Kao rezultat analize masenom spektrometrijom dobiva se spektar masa koji pokazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i pozitivnog ili negativnog naboja iona (m/z). Najintenzivniji signal s relativnom zastupljenošću od 100% je osnovni signal. Ovisno o primjenjenoj energiji prilikom ionizacije, odnosno o potencijalu fragmentacije, osnovni signal može pripadati molekulskom ionu ili nekom od fragmenata u slučaju niske stabilnosti molekulskog iona. Maseni spektar prikazuje i izotopni profil, tj. daje informaciju o omjeru zastupljenosti pojedinih izotopa.

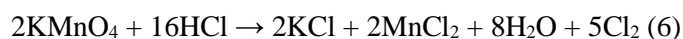
Tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (LC-MS, engl. *Liquid chromatography-mass spectrometry*) je spregnuta analitička tehnika koja ujedinjuje separacijska svojstva tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High performance liquid chromatography*) sa sposobnostima potvrde identiteta i strukturne karakterizacije svojstvenima masenoj spektrometriji. LC-MS je iznimno moćna tehnika za analizu supstancija u tragovima zbog svoje osjetljivosti i specifičnosti. Uvelike se primjenjuje u analitici lijekova, biotehnologiji, ekotoksikologiji, prehrambenoj, agrokemijskoj i kozmetičkoj industriji.

Ionizacija koja se najčešće koristi za povezivanje tekućinske kromatografije i masenog spektrometra je elektrosprej ionizacija (ESI, engl. *Electrospray ionization*). Uzorak iz kromatografske kolone prolazi kroz usku kapilaru čiji je kraj izložen visokom potencijalu (30 kV) koji dovodi do raspršenja uzorka pri atmosferskom tlaku. U struji inertnog plina dušika dolazi do otparavanja otapala, smanjenja površine nabijene kapljice i posljedično raspada zbog odbojnih Coulombovih sila na manje kapljice i ione analita. Ioni mogu nastati adicijom protona (ESI+) ili uklanjanjem protona (ESI-). Nabijene molekule se ubrzavajućim pločicama uvode u vakuum masenog spektrometra (analizator) gdje se odjeljuju prema masi. Kao analizator se najčešće koristi stupica iona (engl. *Ion-trap*) s trodimenzionalnim električnim poljem, koji omogućava fragmentaciju i MSⁿ analizu.

U svrhu izrade ovog rada, LC-MS analiza provedena je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Laboratoriju za tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa unutar Službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju. Korišten je uređaj LC-MS Shimadzu 2020 uz izokratni protok od 0.2 mL/min mobilnih faza A i B u omjeru 10:90. Mobilna faza A je sadržavala 0.1 % vodenu otopinu mravlje kiseline, a mobilna faza B 0.1% metanolnu otopinu mravlje kiseline. Korištena je kolona Zorbax SB 150 X 2.1mm 3.5µm.

3. 7. Priprava klorhidrina 3a, N1-kloramida 6 i hidrata 11

U Erlenmeyerovoj tikvici pripravi se suspenzija 1.0 g (7.7 mmol) 5-FU u 15 mL vode. U tikvicu s vodenom suspenzijom 5-FU uvodi se plinoviti klor (Cl₂) dobiven reakcijom (6):



Za pripravu plinovitog klora potrebno je odvagati 2,500 g krutog kalijevog permanganata (KMnO₄) te u malim obrocima dodati 6 mL koncentrirane kloridne kiseline (HCl). Razvijeni Cl₂ se uvodi u suspenziju 5-FU dok se suspenzija ne razbistri. Nakon toga uzima se prvi alikvot i provjeri doseg reakcije ¹⁹F-NMR spektroskopijom. Uvođenje Cl₂ prekida se kada je nestao signal 5-FU u ¹⁹F-NMR spektru.

U svrhu strukturne karakterizacije NMR spektroskopijom i spektrometrijom masa te ekotoksikološke analize, produkt kloriranja 5-FU (klorhidrin **3a**) je izoliran u obliku bijelog praha otparavanjem otapala i suviška otopljenog klora.

Daljnijim kloriranjem reakcijske smjese nastalog kloriranog produkta 5-FU (klorhidrina **3a**), dolazi do nastajanja međuprodukta (N1-kloramida **6**) koji se postepeno kloriranjem prevodi u konačni produkt (hidrat **11**). Doseg reakcije se utvrđuje na temelju ^{19}F -NMR spektra praćenjem trenda smanjenja signala početnog kloriranog produkta (klorhidrina **3a**) u korist kloriranog međuprodukta (N1-kloramida **6**), čiji se signal daljnijim kloriranjem smanjuje u korist konačnog produkta (hidrata **11**). Reakcija se prekida kada se u ^{19}F -NMR spektru vidi samo signal produkta **11**. Otparavanjem otapala se izolira konačni produkt u obliku viskozne žućkaste tekućine. Zatim slijedi strukturna karakterizacija NMR spektroskopijom i spektrometrijom masa te ekotoksikološka analiza.

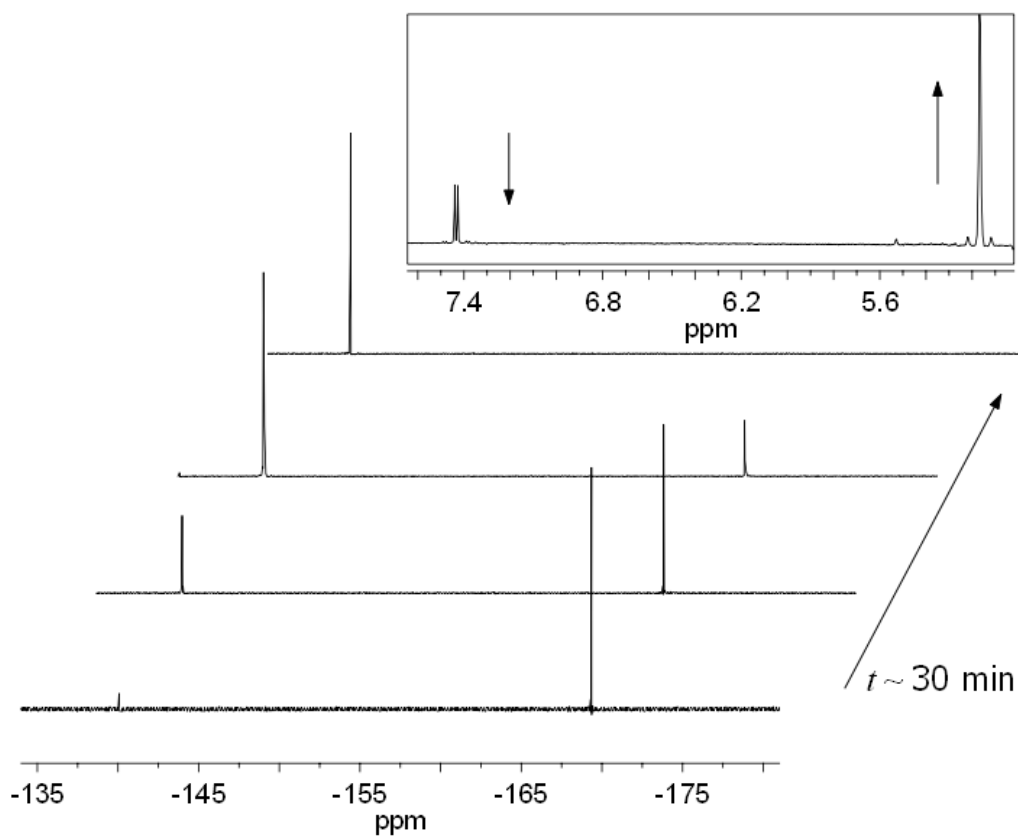
4. REZULTATI I RASPRAVA

4. 1. NMR analiza reakcijske smjese 5-FU i HOCl

Reakcija između HOCl i 5-FU odvija se u vodenom mediju. Tijekom reakcije dolazi do promjene pH medija, odnosno zakiseljavanja uslijed reakcije (7):



Monitoring reakcije proveden je pomoću ^{19}F -NMR (376 MHz) i ^1H -NMR (400 MHz) spektroskopske analize alikvota reakcijske smjese u određenim vremenskim razmacima s ukupnim trajanjem oko 30 min na temperaturi od 25 °C uz dodatak D_2O (Slika 5.) (Hok i sur.).

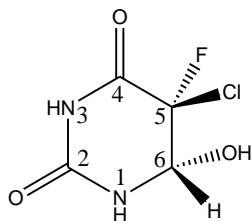


Slika 5. ^1H - i ^{19}F -NMR spektroskopska analiza reakcijske smjese 5-FU **1** i klorhidrina **3a** u D_2O . Strjelice prikazuju relativnu promjenu signala s vremenom.

Tijekom reakcije između 5-FU i HOCl u ^{19}F -NMR spektrima nestaje signal koji odgovara 5-FU (-169.28 ppm) te se pojavljuje signal produkta (-140.37 ppm). Po završetku reakcije signal koji odgovara 5-FU u potpunosti je nestao.

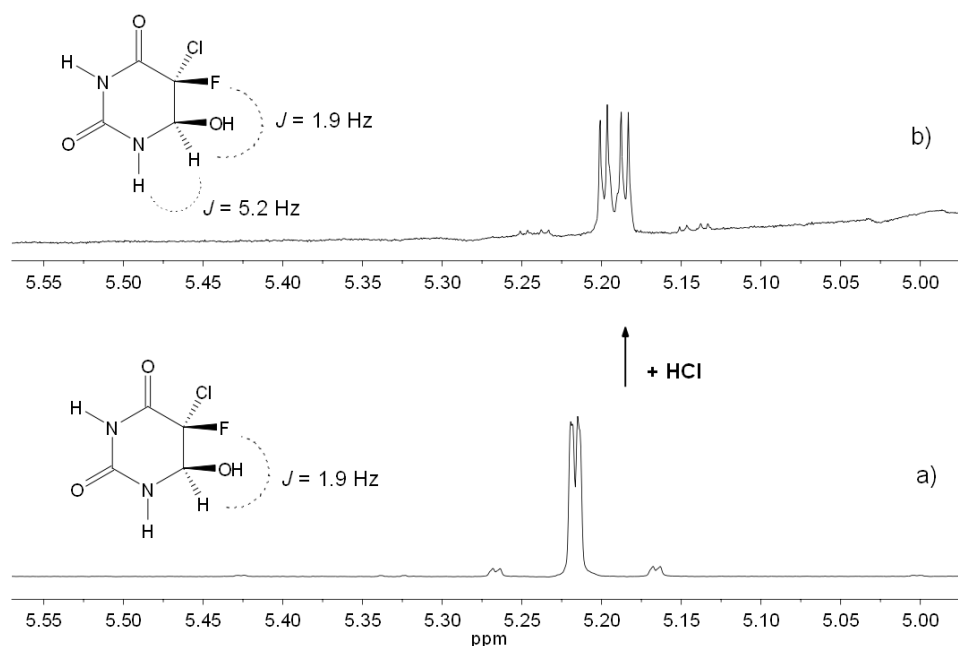
U ^1H -NMR spektru u D_2O signal C6-H na 7.40 ppm (d , $^3J_{\text{F,H}} = 5.5$ Hz) nestaje iz aromatskog područja uz istovremeno pojavljivanje signala na 5.19 ppm (d , $^3J_{\text{F,H}} = 1.9$ Hz). Velika promjena kemijskog pomaka od 2.2 ppm u više magnetsko polje posljedica je rehibridizacije C5 ugljikova atoma iz sp^2 u sp^3 , što sugerira da je položaj kloriranja C5, a ne C6 ugljikov atom. Multiplicitet obaju signala (dubleti u ^1H -NMR spektrima reaktanta i produkta u D_2O) potvrđuje da je vodikova jezgra na C6 položaju spregnuta sa spinom jezgre fluora u C5 položaju u 5-FU, odnosno sa spinom jezgre fluora u C5 položaju u kloriranom produktu klorhidrinu **3a**.

Nestajanje jednog i istovremeno nastajanje drugog signala u ^{19}F - i ^1H -NMR spektrima upućuje na proces u kojem iz jednog reaktanta nastaje samo jedan produkt. Izolacijom produkta i snimanjem ^{13}C - i ^1H -NMR spektara potvrđena je pretpostavka da se radi o samo jednom spoju, a ne o smjesi produkata. Dobiveni spektri u skladu su sa strukturom klorhidrina **3a** (Slika 6.).



Slika 6. Strukturna formula klorhidrina **3a** s označenim brojevima atoma unutar prstena.

Zakiseljavanjem vodene otopine (ili reakcijske smjese) klorhidrina **3a**, u ^1H -NMR spektru u D_2O , uočava se dodatno cijepanje signala na 5.19 ppm (dd , $^3J_{\text{F,H}} = 1.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz). Dublet dubleta je posljedica sprege C6-H s C5-F i N1-H (Slika 7.). Ranije je pokazano da se cijepanje C6-H signala s amidnim protonom može vidjeti kada je izmjena N1-H u deuteriranoj vodi iznimno spora zbog inhibicije kiselinom (Kokko i sur., 1962; Hurd i Reid, 1977).



Slika 7. ^1H -NMR spektar klorhidrina **3a** s odgovarajućim konstantama sprezanja u D_2O bez HCl a) i uz dodatak HCl b).

U ^1H -NMR spektru klorhidrina u DMSO-d_6 nalaze se četiri signala (Prilog 1.). Multiplet na 4.80 ppm odgovara signalu vodikovog atoma na C6 položaju. Razlika u multiplicitetu signala vodika na položaju C6 u odnosu na ^1H -NMR spektar snimljen u D_2O bez HCl, posljedica je složenih cijepanja s vodikovim atomom dušika na N1-H ($^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz), vodikovim atomom iz hidroksilne skupine vezanoj u C6 položaju ($^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz) i fluorom u položaju C5 ($^3J_{\text{H,F}} = 1.9$ Hz). Budući da su konstante sprege N1-H i C6-OH s C6-H sličnog iznosa, dolazi do superpozicije dvaju dubleta pa se u spektru vidi kvazi-triplet koji je dodatno pocijepan pod utjecajem fluora u C5 položaju (*ddd* ili triplet dubleta). Multiplicitet signala će biti značajna eksperimentalna potvrda regioselektivnosti kloriranja klorhidrina, što će biti objašnjeno u daljnjem tekstu. Relativno mala konstanta sprege vodika C6-H i fluora C5-F ($^3J_{\text{F,H}} = 1.9$ Hz) sugerira da se fluor na C5 i vodikov atom na C6 položaju u klorhidrinskom produktu nalaze u *trans* položaju. Prema literaturi (Miyashinta i sur., 1982) u *cis* izomeru klorhidrina konstanta sprege između vodikovog C6-H atoma i fluornog C5-F atoma iznosila bi preko 10 Hz.

U ^1H -NMR spektru klorhidrina u DMSO-d_6 (Prilog 1.) se nalaze se još tri signala koja pripadaju imidnom vodikovom atomu N3-H (na 11.03 ppm), amidnom vodikovom atomu N1-H (na 8.87 ppm) i vodikovom atomu hidroksilne skupine C6-OH (na 7.40 ppm).

U ^{13}C -NMR spektru klorhidrina u DMSO-d_6 nalaze se četiri signala (Prilog 2.).

Na 163.20 ppm nalazi se dublet ($^2J_{F,C} = 26.9$ Hz), a sprezanje s fluorom u položaju C5 sugerira da se radi o ugljikovom atomu C4, odnosno karbonilnoj skupini u susjedstvu C5 ugljika na koji je vezan fluor. Signal drugog karbonilnog ugljika (singlet) nalazi se na 151.22 ppm i odgovara C2 položaju. Budući da je atom fluora na C5 položaju udaljen četiri veze od C2 atoma, ne dolazi do sprege između jezgri fluora i ugljika. Dublet koji se nalazi na 97.30 ppm odgovara C5 ugljikovom atomu i spreže se velikom konstantom ($^1J_{F,C} = 255.0$ Hz) s jezgrom fluora u položaju C5. Četvrti signal je dublet na 77.22 ppm koji odgovara C6 ugljikovom atomu, koji je također spregnut s fluorom u položaju C5 ($^2J_{F,C} = 26.3$ Hz). Najveća relativna promjena kemijskog pomaka od gotovo 30 ppm u niže magnetsko polje u odnosu na ^{13}C -NMR spektar 5-FU, vezana je uz rehibridizaciju C5 ugljikova atoma iz sp^2 u sp^3 , što je još jedna eksperimentalna potvrda da je položaj kloriranja C5, a ne C6 ugljikov atom.

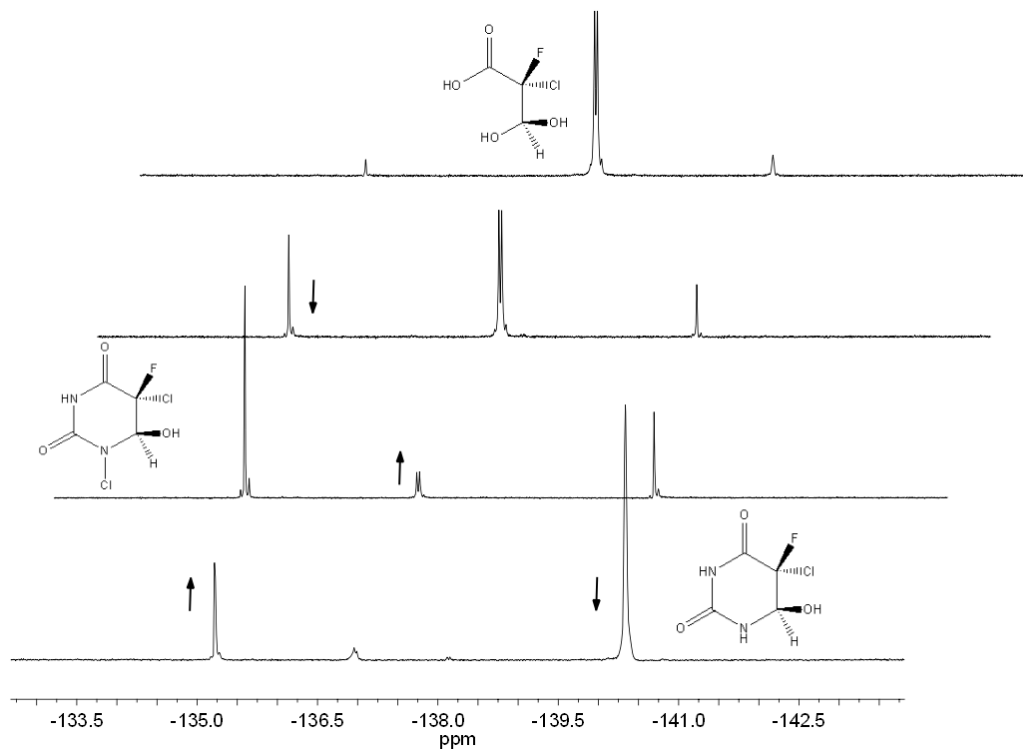
4.2. LC-MS analiza klorhidrina **3a**

Spektrometrijom masa potvrđeno je da klorirani produkt 5-FU ima molekulsku masu 182 što odgovara molekulskoj masi klorhidrina **3a**. U Prilogu 3. prikazan je kromatogram ukupne ionske struje klorhidrina **3a** pri uvjetima deprotoniranja (ESI-), a u Prilogu 4. maseni spektar, pri čemu signal s omjerom mase i naboja 181 odgovara deprotoniranom obliku klorhidrina **3a**.

4. 3. NMR analiza reakcijske smjese klorhidrina **3a** i HOCl

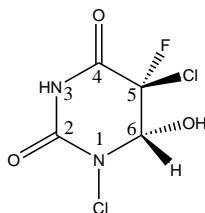
Uvođenjem plinovitog klora (Cl_2) u vodenu otopinu klorhidrina **3a** dolazi do daljnjeg kloriranja pri čemu nastaje sekundarni produkt **11** preko N-kloriranog međuprodukta **6**.

Monitoring reakcije proveden je pomoću ^{19}F -NMR spektroskopske analize alikvota reakcijske smjese u deuteriranom otapalu (D_2O) u određenim vremenskim razmacima. Kloriranjem se signal klorhidrina **3a** u ^{19}F -NMR spektru (-140.37 ppm) smanjuje, a povećava se signal na -135.25 ppm koji odgovara N1-kloramidu **6**. Istovremeno nastaje signal hidrata **11** (*d*, -136.77 ppm). Na kraju reakcije, u spektru dominira dublet konačnog produkta **11** na -136.77 ppm (Slika 8.).



Slika 8. ^{19}F -NMR spektroskopska analiza alikvota reakcijske smjese klorhidrina **3a**, N1-kloramida **6** i hidrata **11** u D_2O . Strjelice prikazuju relativnu promjenu signala s vremenom.

U svrhu izolacije i identifikacije nestabilnog N-kloriranog međuprodukta **6**, reakcijska smjesa je tretirana kloroformom. Odjeljivanje se temelji na razlici u topljivosti klorhidrina **3a** i N-kloriranog međuprodukta **6**. Klorhidrin **3a** je netopljiv u kloroformu, a bolju topljivost N-kloriranog međuprodukta **11** osigurava povećanje lipofilnosti kloriranjem. Nakon izolacije, kloroform je otparen i snimljeni su ^{13}C - i ^1H -NMR spektri u DMSO-d_6 i D_2O . Na temelju spektara, zaključena je struktura N1-kloramida **6** (Slika 9.)



Slika 9. Strukturna formula N1-kloramida **6** s označenim brojevima atoma u prstenu.

^{13}C -NMR spektar reakcijske smjese klorhidrina **3a** i N1-kloramida **6** u DMSO- d_6 prikazuje osam signala (Prilog 3.). Slično klorhidrinu **3a**, dublet na 163.34 ppm ($^2J_{\text{C,F}} = 28.7$ Hz) odgovara C4 karbonilnom ugljikovom atomu, a multiplicitet je posljedica sprege s fluorom u položaju C5. Singlet na 150.52 ppm pripada C2 karbonilnom ugljikovom atomu, a izostanak sprege s fluorom u položaju C5 posljedica je veće udaljenosti F i C2 atoma. Dublet na 95.76 ppm ($^1J_{\text{C,F}} = 255.68$ Hz) s velikom konstantom sprege pripada C5 ugljikovom atomu na koji je fluor izravno vezan, dok dublet na 76.72 ppm ($^2J_{\text{C,F}} = 26.8$ Hz) pripada C6 ugljikovom atomu koji je, također, spregnut s fluorom u položaju C5. U odnosu na klorhidrin **3a**, najveća promjena kemijskog pomaka prema višem magnetskom polju dogodila se u položaju C6 što sugerira da je došlo do kloriranja N1, a ne N3 dušikovog atoma.

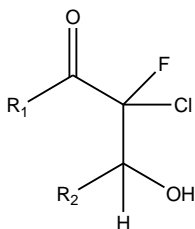
U ^1H -NMR spektru ekstrahiranog N-kloriranog produkta **6** u DMSO- d_6 prisutan je samo jedan N-H signal na 12.07 ppm koji pripada imidnom N3-H. Jedna od eksperimentalnih potvrda kloriranja N1-položaja klorhidrina **3a** je nestanak signala amidnog N1-H vodikovog atoma prisutnog u ^1H -NMR spektru klorhidrina **3a** na 8.87 ppm.

U ^1H -NMR spektru u D_2O , dublet na 5.55 ppm s konstantom sprege $^3J_{\text{H,F}} = 1.9$ Hz pripada C6-H atomu, a nepostojanje sprege s N1-H atomom nakon dodatka HCl u vodenu otopinu zbog vezanog klora u N1 položaju (u ^1H -NMR spektru klorhidrina iznosi $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz) još je jedna eksperimentalna potvrda da se kloriranje događa u N1, a ne N3 položaju.

Uvođenjem plinovitog klora (Cl_2) u vodenu otopinu N1-kloramida **6** dobiven je sekundarni produkt kloriranja **11** čiji ^{13}C -NMR spektar u DMSO- d_6 (Prilog 4.) ukazuje na eliminaciju fragmenta koji sadrži C2 ugljikov atom (dekarboksilacija). Sva tri signala u ^{13}C -NMR spektru u sprezi su s fluorovim atomom koji odgovara C5-F u klorhidrinu **3a**: dublet na 165.00 ppm ($^2J_{\text{C,F}} = 28.2$ Hz) pripada karbonilnom ugljikovom atomu koji odgovara C4 u klorhidrinu **3a**, dublet na 105.70 ppm ($^1J_{\text{C,F}} = 263.3$ Hz) pripada ugljikovom atomu koji odgovara C5 u klorhidrinu **3a**, a dublet na 90.10 ppm ($^2J_{\text{C,F}} = 28.2$ Hz) pripada ugljikovom atomu koji odgovara C6 u klorhidrinu **3a**.

U ^{19}F -NMR spektru u DMSO- d_6 nalazi se dublet na -136.77 ppm ($^3J_{\text{F,H}} = 15.0$ Hz), a u ^1H -NMR spektru u DMSO- d_6 dublet ($^3J_{\text{H,F}} = 15.0$ Hz) na 5.06 ppm koji odgovara vodikovom atomu vezanom na ugljik u susjedstvu fluora.

Na temelju NMR spektara predložena je struktura prikazana na Slici 10. Međutim, NMR spektroskopijom nije bilo moguće u potpunosti strukturno okarakterizirati produkt **11** pa je provedena MS analiza.

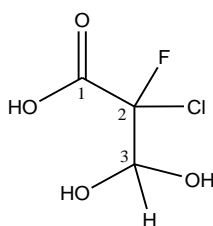


Slika 10. Predložena strukturna formula konačnog produkta kloriranja klorhidrina **3a**.

4. 4. LC-MS analiza hidrata **11**

Tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (HPLC) spregnutom s elektrosprej analizatorom (ESI) dobiven je kromatogram ukupne ionske struje (TIC, engl. *total ion chromatogram*) (Prilog 7.) i maseni spektar eluiranog pika pri uvjetima deprotoniranja (ESI-) (Prilog 8.). Konačni produkt kloriranja klorhidrina, pri uvjetima analize, ima vrijeme zadržavanja 1.9 min. Analizom masenog spektra je zaključeno da je molekulska masa konačnog produkta 158 te je, u skladu sa strukturom predloženom temeljem NMR spektara (Slika 10.), utvrđeno da se radi o hidratnom produktu **11** (Slika 11.) Hidratni oblik nastaje, nakon pucanja prstena, hidrolizom amidne veze i eliminacijom derivata uree, a u daljnjem tekstu predložen je reakcijski mehanizam.

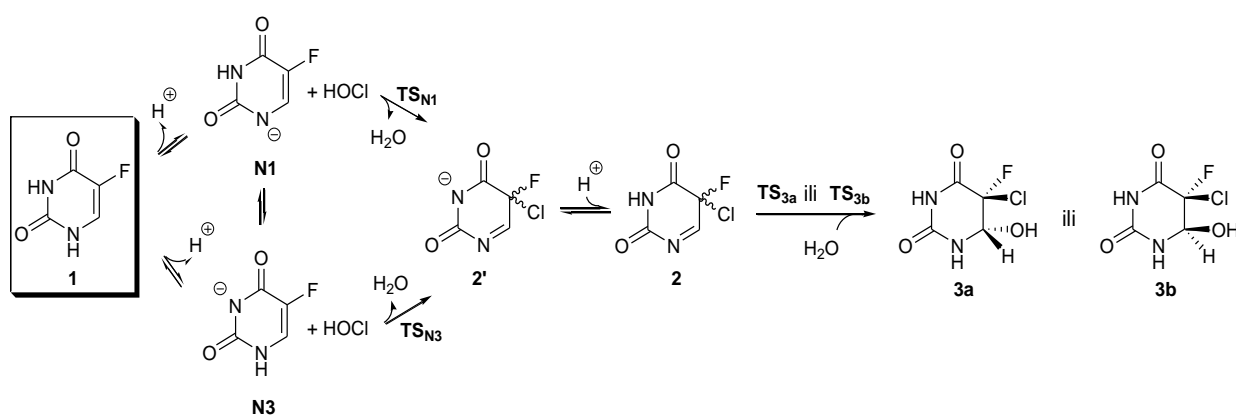
Od ostalih signala koji su prisutni u spektru velikom relativnom zastupljenošću ističu se signal molekulske mase 92, koji odgovara deprotoniranom dimeru mravlje kiseline, zatim 316 koji odgovara deprotoniranom dimeru hidratnog produkta **11**. Signal s omjerom m/z 171 (molekulske mase 172) odgovara deprotoniranom poluacetalnom obliku produkta **11** (metilirana jedna hidroksilna skupina hidrata **11**), a signal s molekulskom masom 200 odgovara deprotoniranom aduktu zaostalog klorhidrina **3a** s vodom te signal molekulske mase 82 koji odgovara deprotoniranom aduktu dvaju molekula vode s mravljom kiselinom.



Slika 11. Strukturna formula hidrata **11** s označenim brojevima atoma u prstenu.

4. 5. Reakcijski mehanizam kloriranja 5-fluorouracila

Kvantno-kemijskim metodama su proučavani različiti mehanizmi reakcije 5-FU i HOCl (Tandarić, 2016). Razmatrani su mehanizmi epoksidacije C5-C6 dvostruke veze u 5-FU, usklađena adicija Cl⁺ i OH⁻ na dvostruku vezu i N-kloriranje 5-FU. Međutim, izračunate energetske barijere za te procese su previsoke, stoga je, kao energetski najpovoljniji, predložen mehanizam C5-kloriranja preko iminskog međuprodukta koji podrazumijeva anione kao reaktante (Slika 12.). Molekularni oblik 5-FU **1** dominantno egzistira u neutralnoj vodenoj otopini (pK_a (5-FU) = 7.93), ali anionski oblik je znatno reaktivniji. U literaturi je to potvrđeno na sličnom sustavu. Naime, bromiranje uracilnog aniona nekoliko redova veličine je brže od bromiranja odgovarajućeg molekularnog oblika (Tee i Banerjee, 1979).



Slika 12. Shema kloriranja 5-FU **1** preko iminskog međuprodukta **2** uz anione kao reaktante.

5-FU **1** egzistira u ravnotežnoj smjesi dvaju monoaniona, **N1**- i **N3**-aniona, koji se razlikuju u nukleofilnoj reaktivnosti. Tablica 1. prikazuje Gibbsove slobodne energije (G), Gibbsove slobodne energije solvatacije (ΔG_{solv}) te vrijednosti ukupnih Gibbsovih slobodnih energija dobivenih zbrajanjem G i ΔG_{solv} pri temperaturi od 298.15 K ($(G + \Delta G_{\text{solv}})_{298}$) za reaktante, prijelazna stanja, međuprodukte i produkte, koji odgovaraju predloženom reakcijskom mehanizmu (Slika 12.). U tablici je naveden broj imaginarnih vibracijskih frekvencija (NImag) za pojedinu stacionarnu točku te njihove vrijednosti. Gibbsove slobodne energije svih struktura izračunate su za kompleks s dvije molekule vode (eksplicitna solvatacija).

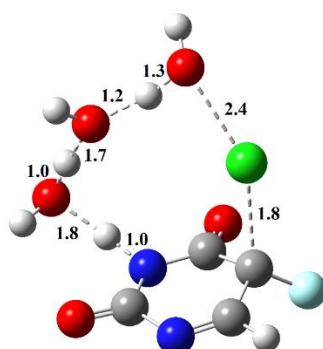
Tablica 1. Energije minimuma i prijelaznih stanja za reakcijski mehanizam kloriranja 5-FU **1** s HOCl preko iminskog međuprodukta **2** izračunate na B3LYP/6-31+G(d) razini.

Struktura	NImag (cm ⁻¹)	G (Hartree)	ΔG_{solv} (kJ/mol)	$(G+\Delta G_{\text{solv}})_{298}$ (Hartree)
1	0	-666.860069	-76.23	-666.889104
N1*	0	-666.351494	-245.18	-1202.430234
N3*	0	-666.337934	-271.29	-1202.426618
TS _{N1}	1 (467.15i)	-1202.299106	-261.37	-1202.398658
TS _{N3}	1(31.58i)	-1202.268231	-280.12	-1202.374923
2'***	0	-1125.924504	-252.80	-1202.439345
2***	0	-1126.430652	-72.97	-1202.877000
TS _{3a}	1 (723.21i)	-1202.810949	-133.80	-1202.861737
TS _{3b}	1 (687.43i)	-1202.808135	-133.26	-1202.858891
3a	0	-1202.857292	-129.87	-1202.906757
3b	0	-1202.858347	-115.14	-1202.902203

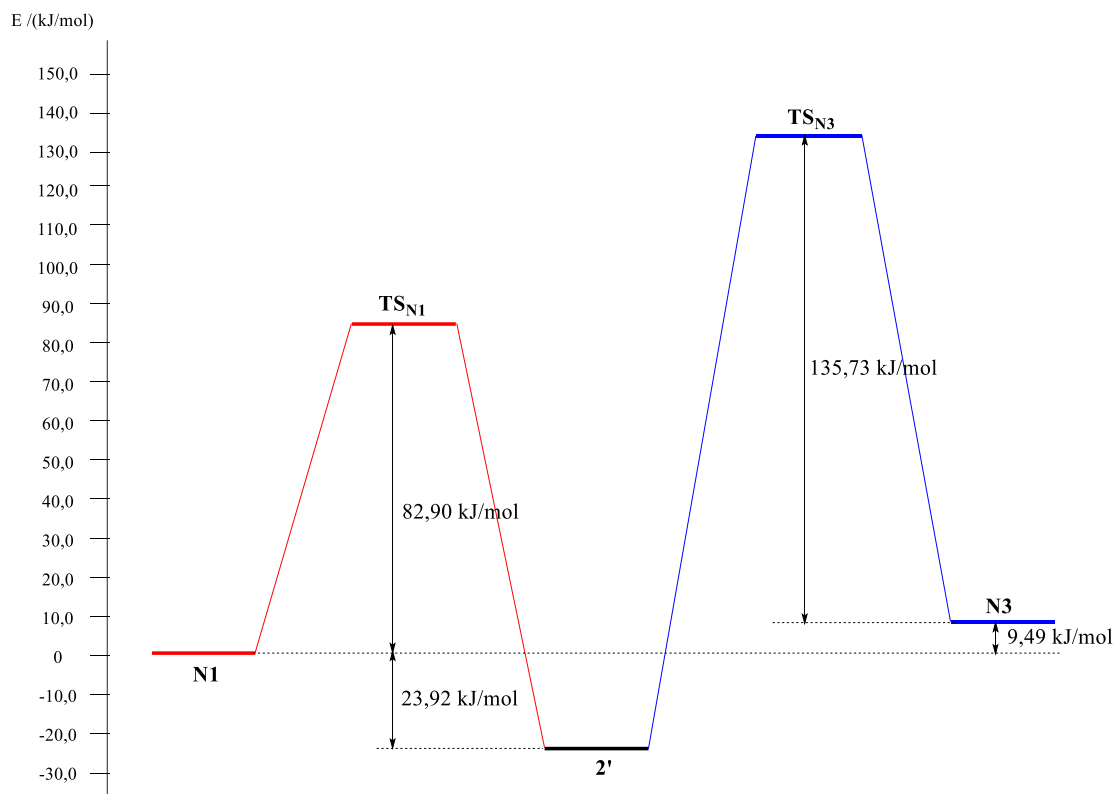
* U svrhu usporedbe s energijama prijelaznih stanja, Gibbsovim slobodnim energijama aniona **N1** i **N3** je dodana vrijednost G implicitno solvatirane jedne molekule HOCl (-535.985355 Hartree).

** U svrhu usporedbe s energijama prijelaznih stanja, Gibbsovim slobodnim energijama aniona **2'** i iminskog međuprodukta **2** je dodana vrijednost G implicitno solvatirane jedne molekule vode (-76.418556 Hartree).

N1-anion je stabilniji od **N3**-aniona za 9.45 kJ/mol. Energetska barijera adicije Cl⁺ na C5 ugljikov atom N1-aniona 5-FU, uz istovremeno deprotoniranje N3-H preko mosta dvaju molekula voda (TS_{N1}) (Slika 13.), manja je za 52.83 kJ/mol od barijere u analognoj reakciji kloriranja N3-aniona (TS_{N3}) (Slika 14.). To upućuje na zaključak da se kloriranje 5-FU odvija preko N1-aniona, a ne N3-aniona, pri čemu nastaje anionski iminski međuprodukt **2'** koji je u ravnoteži s molekulskim oblikom **2**.

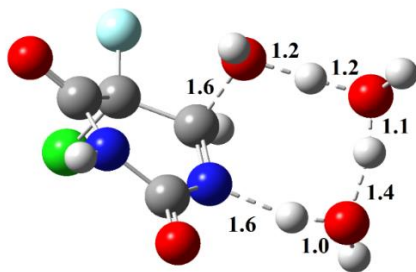


Slika 13. Struktura prijelaznog stanja TS_{N1} optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.

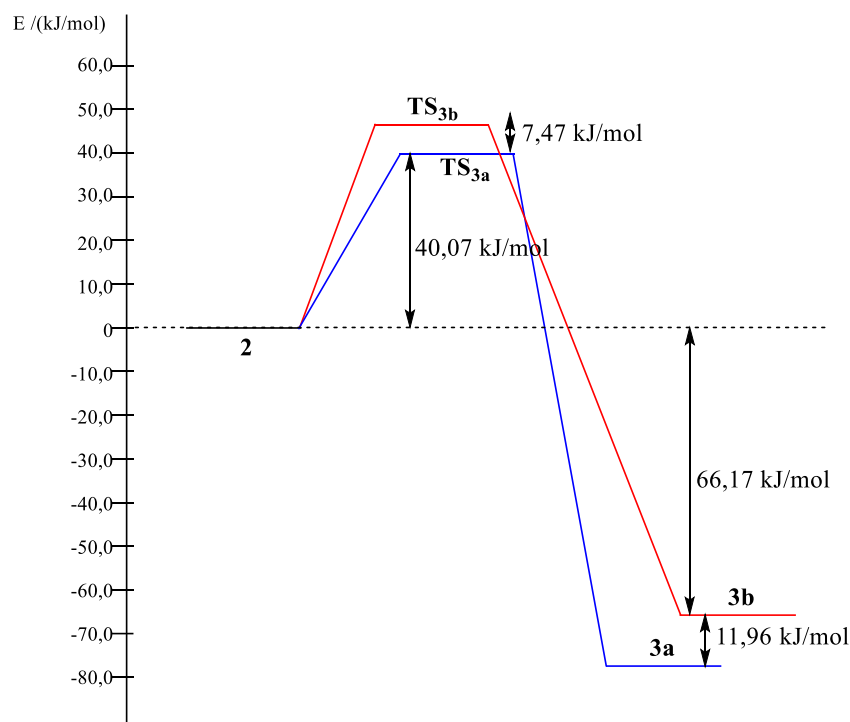


Slika 14. Grafički prikaz relativnih energetskih odnosa minimuma i prijelaznih stanja kloriranja anionskih oblika 5-FU **1**.

Imin **2** podliježe adiciji vode koja može rezultirati nastajanjem *trans*- ili *cis*-klorhidrinskog produkta (**3a** ili **3b**) (Slika 12.). Računalni rezultati upućuju da je anti-adicija **TS_{3a}** (Slika 15.) (voda pristupa N1-C6 dvostrukoj vezi sa suprotne strane od C5-Cl veze) brži proces od *cis*-napada **TS_{3b}**, i rezultira nastajanjem *trans*-klorhidrina **3a** koji je za 11.96 kJ/mol stabilniji od *cis*-klorhidrina **3b** (Slika 16.). Nastajanje *trans*-klorhidrina **3a** je kinetički i termodinamički favoriziran proces i u skladu je s eksperimentalnim rezultatima.

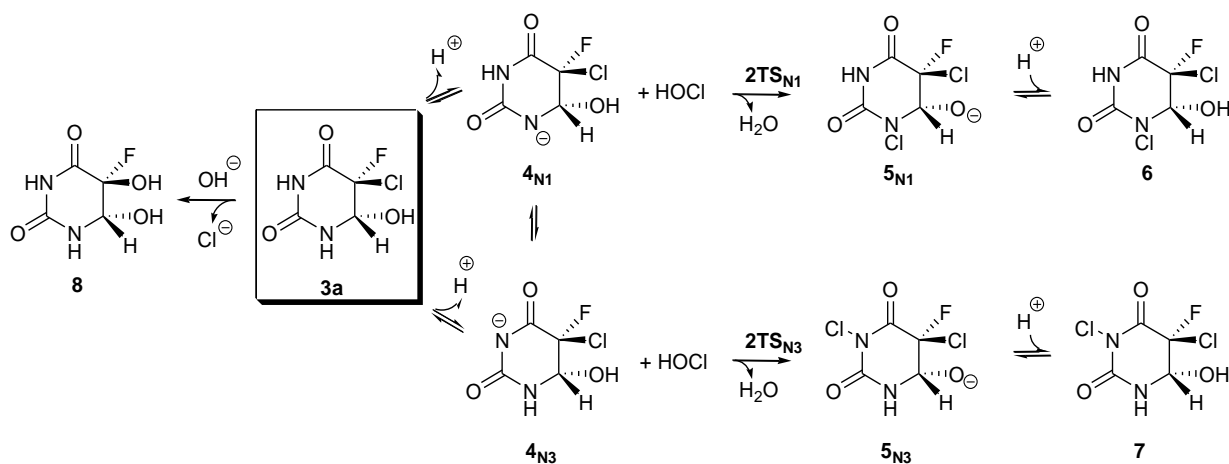


Slika 15. Struktura prijelaznog stanja **TS_{3a}** optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.



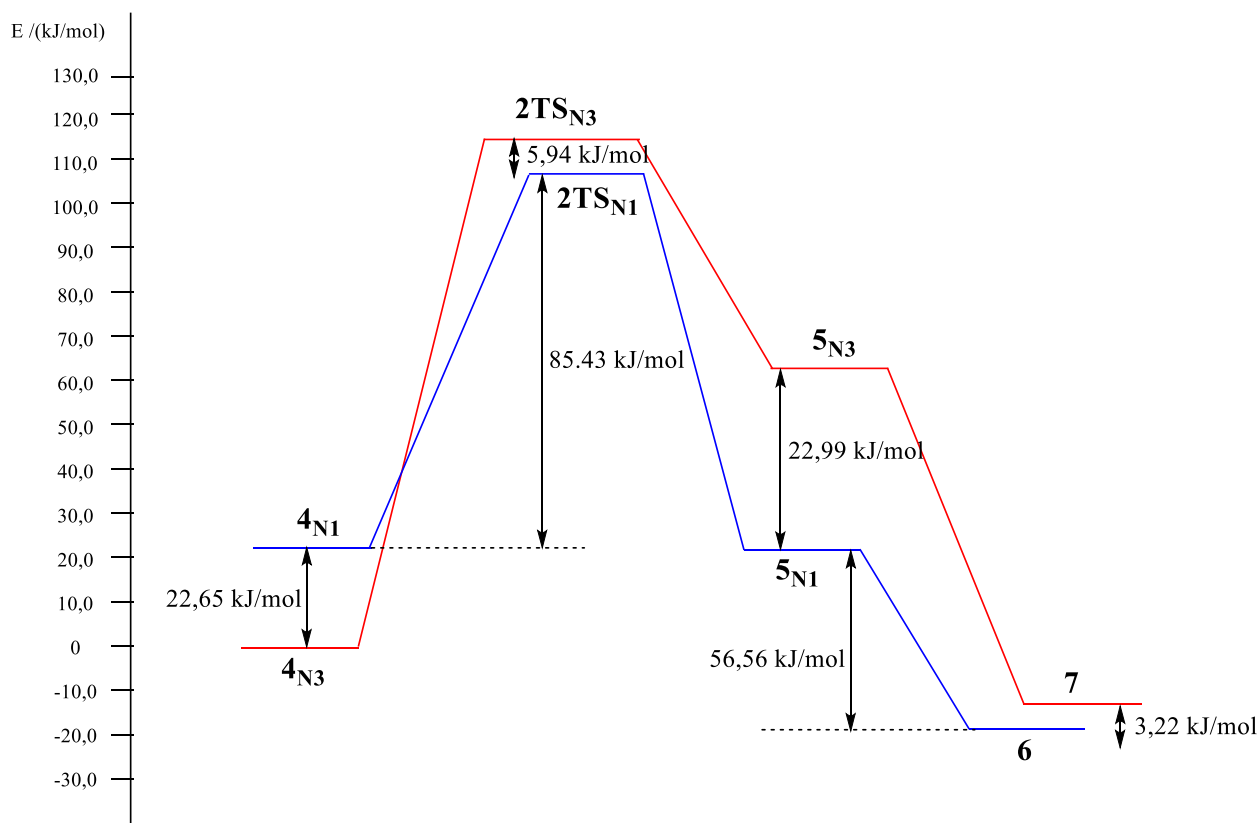
Slika 16. Grafički prikaz relativnih energetskih odnosa minimuma i prijelaznih stanja adicije vode na iminski međuprodukt **2**.

U bazičnom mediju (pH = 10-11) klorhidrin **3a** lako konvertira u glikol **8** (Slika 17.). Pri duljem izlaganju hidroksilnim ionima, glikol **8** podliježe reakcijama razgradnje, što je opisano ranije (Legay i sur., 2014). Mehanizam dekloriranja i ponašanje klorhidrina **3a** u bazičnim uvjetima je izvan okvira ovog rada.

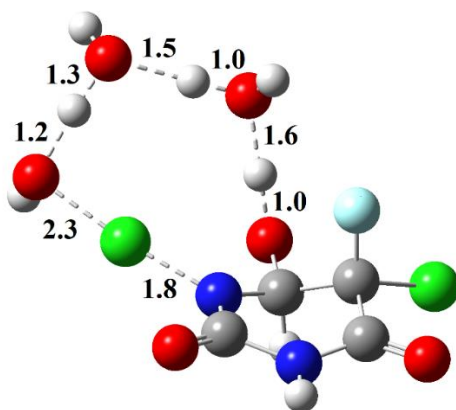


Slika 17. Shema kloriranja klorhidrina **3a** preko anionskih međuprodukata do N-kloriranih produkata.

U neutralnom ili slabo kiselom mediju, klorhidrin **3a** u reakciji s HOCl daje N1- (**5_{N1}**) ili N3- (**5_{N3}**) klorirani produkt (Slika 17.). Radi se o usklađenom procesu adicije Cl⁺ na N-anion, uz istovremeno deprotoniranje C6-OH preko mosta dvaju molekula voda. Regioselektivnost kloriranja u N1-položaju amida potvrđena je računalnim izračunima. Razmatrani su mehanizmi kloriranja s HOCl oba anionska oblika klorhidrina **3a**. N3-anion je rezonantno više stabiliziran od N1-aniona (za 22.65 kJ/mol), prema tome, N1-anion je reaktivniji (Slika 18.). Reakcija kloriranja je kinetički kontrolirana, jer je, unatoč većoj stabilnosti **4_{N3}**, barijera kloriranja znatno veća (za 28.59 kJ/mol) od barijere kloriranja **4_{N1}** (**2TS_{N1}** Slika 19.). Nastali anionski produkt **5_{N1}** slične je energije kao i reaktant, a od **5_{N3}** je stabilniji za 22.99 kJ/mol. Brzim protoniranjem anioni **5_{N1}** i **5_{N3}** se stabiliziraju do N1-kloramida **6** i N3-kloramida **7**, pri čemu je N1-kloramid stabilniji 3.22 kJ/mol.



Slika 18. Grafički prikaz relativnih energetskih odnosa minimuma i prijelaznih stanja kloriranja klorhidrina **3a** do N1- (**6**) i N3- (**7**) kloramida uz anionske oblike kao reaktante.



Slika 19. Struktura prijelaznog stanja $2TS_{N1}$ optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.

Tablica 2. prikazuje Gibbsove slobodne energije (G), Gibbsove slobodne energije solvatacije (ΔG_{solv}) te vrijednosti ukupnih Gibbsovih slobodnih energija dobivenih zbrajanjem G i ΔG_{solv} pri temperaturi od 298.15 K ($(G+\Delta G_{\text{solv}})_{298}$) za reaktante, prijelazna stanja, međuprodukte i produkte, koji odgovaraju predloženom reakcijskom mehanizmu (Slika 17.). U tablici je naveden broj imaginarnih vibracijskih frekvencija (N_{Imag}) za pojedinu stacionarnu točku te njihove vrijednosti. Gibbsove slobodne energije svih struktura izračunate su za kompleks s dvije molekule vode (eksplicitna solvatacija).

Tablica 2. Energije minimuma i prijelaznih stanja za reakcijski mehanizam kloriranja klorhidrina **3a** s HOCl preko aniona izračunate na B3LYP/6-31+G(d) razini.

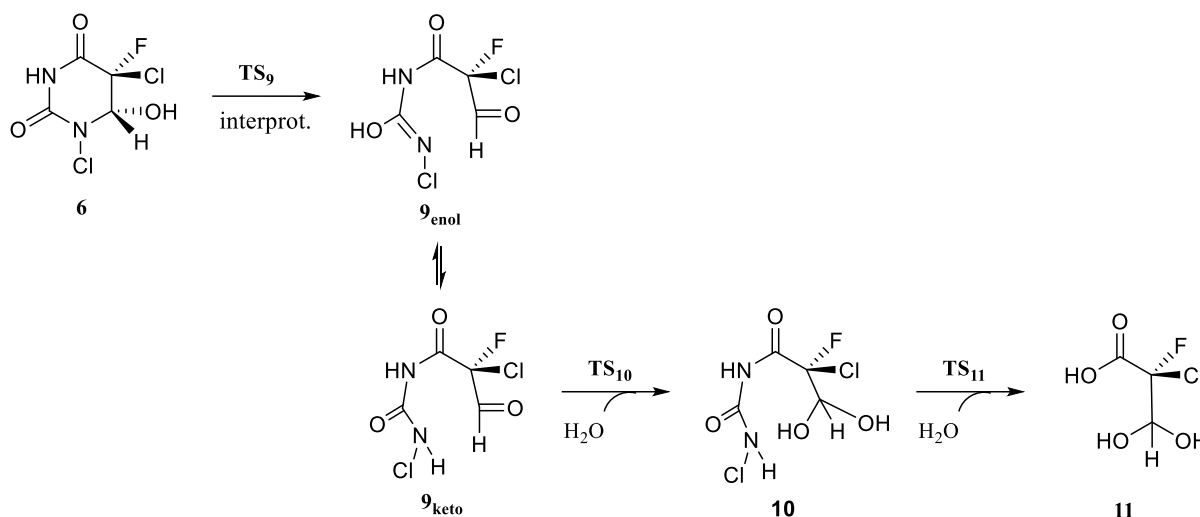
Struktura	N_{Imag} (cm^{-1})	G (Hartree)	ΔG_{solv} (kJ/mol)	$(G+\Delta G_{\text{solv}})_{298}$ (Hartree)
4_{N1}^*	0	-1202.353491	-255.73	-1738.436247
4_{N3}^*	0	-1202.359376	-262.92	-1738.444873
$2TS_{N1}$	1 (534.29i)	-1738.304714	-259.91	-1738.403709
$2TS_{N3}$	1(418.82i)	-1738.302706	-259.24	-1738.401446
5_{N1}^{**}	0	-1661.924056	-229.70	-1738.430101
5_{N3}^{**}	0	-1661.907860	-249.24	-1738.421347
5_{N1}^{***}	0	-1661.924056	-229.70	-1662.432227
5_{N3}^{***}	0	-1661.907860	-249.24	-1662.423473
6	0	-1662.407793	-120.71	-1662.453768
7	0	-1662.407569	-118.07	-1662.452540

* U svrhu usporedbe s energijama prijelaznih stanja, Gibbsovim slobodnim energijama anionskih kompleksa 4_{N1} i 4_{N3} je dodana vrijednost G implicitno solvatirane jedne molekule HOCl (-535.985355 Hartree).

** U svrhu usporedbe s energijama prijelaznih stanja, Gibbsovim slobodnim energijama anionskih kompleksa 5_{N1} i 5_{N3} je dodana vrijednost G implicitno solvatirane jedne molekule vode (-76.418556 Hartree).

*** Relativne Gibbsove energije anionskih kompleksa 5_{N1} i 5_{N3} , u odnosu na N-kloramide **6** i **7** u kompleksu s dvije molekule vode, korigirane su za iznos ΔG_r iz izraza za reakciju $6 \rightarrow 5_{N1} + H^+$, odnosno $7 \rightarrow 5_{N3} + H^+$, gdje je za $G(H^+)_{solv}$ uzeta eksperimentalna vrijednost od -0.420682 Hartree (Tissandier i sur., 1998).

Daljnijm kloriranjem s HOCl, N1-kloramid **6** lako konvertira u produkt **11** čija je struktura određena spektrometrijom masa (Slika 11.). Intramolekulski proton-transfer s C6-OH na kisik karbonilne skupine na položaju C2 uzrokuje slabljenje veze između N1 dušikovog atoma i C6 ugljikovog atoma što u konačnici dovodi do pucanja prstena (Slika 20.). Pritom nastaje aldehidni oblik (9_{keto} i 9_{enol}) koji je u ravnoteži s hidratnim oblikom **10**, koji nastaje adicijom vode na aldehidnu skupinu. Ravnoteža je pomaknuta prema hidratnom obliku. Hidrolizom amidne skupine oslobađa se N-klorirani derivat uree i nastaje hidratni produkt **11**.



Slika 20. Shema kloriranja N1-kloramida **6** i nastajanje hidratnog produkta **11**.

Relativni energetski odnosi minimuma i prijelaznih stanja prikazani su na energetskom dijagramu (Slika 24.). U tablici 3. su navedene Gibbsove slobodne energije (G), Gibbsove slobodne energije solvatacije (ΔG_{solv}) te vrijednosti ukupnih Gibbsovih slobodnih energija dobivenih zbrajanjem G i ΔG_{solv} pri temperaturi od 298.15 K ($(G + \Delta G_{solv})_{298}$) za reaktant, prijelazna stanja, međuprodukte i produkt, koji odgovaraju predloženom reakcijskom mehanizmu (Slika 20.). U tablici je naveden broj imaginarnih vibracijskih frekvencija (NImag) za pojedinu stacionarnu točku te njihove vrijednosti. Gibbsove slobodne energije svih struktura izračunate su za kompleks s dvije molekule vode (eksplicitna solvatacija).

Tablica 3. Energije minimuma i prijelaznih stanja za reakcijski mehanizam intramolekulskog proton-transfera N1-kloramida **6** i raspada do hidratnog produkta **11**, izračunate na B3LYP/6-31+G(d) razini.

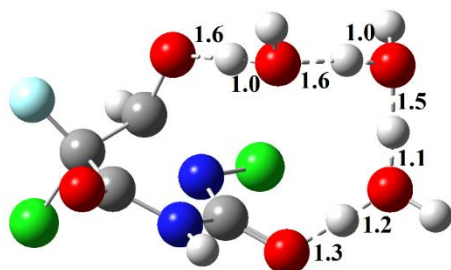
Struktura	NImag (cm ⁻¹)	G (Hartree)	ΔG_{solv} (kJ/mol)	$(G+\Delta G_{\text{solv}})_{298}$ (Hartree)
6 *	0	-1662.407793	-120.71	-1815.290880
TS₉ **	1 (309.75i)	-1738.804904	-108.03	-1815.264607
9_{keto} *	0	-1662.391269	-97.78	-1815.265623
9_{enol} *	0	-1662.388288	-94.47	-1815.261384
TS₁₀ **	1 (855.29i)	-1738.776360	-117.44	-1815.239648
10 **	0	-1738.823435	-94.18	-1815.277863
TS₁₁	1(573.47i)	-1815.181519	-136.02	-1815.233327
11 ***	0	-1130.461885	-96.23	-1815.314930

* U svrhu usporedbe s energijama prijelaznih stanja, Gibbsovim slobodnim energijama kompleksa **6**, **9_{keto}** i **9_{enol}** je dodana vrijednost G implicitno solvatiranih dvaju molekula vode (-152.837112 Hartree).

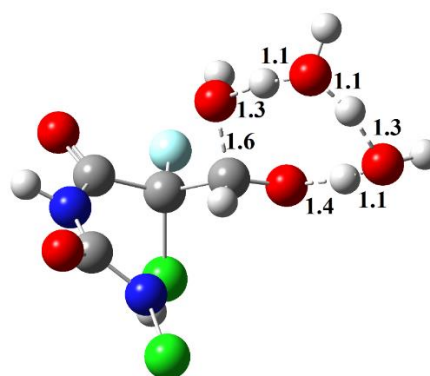
** U svrhu usporedbe s energijama prijelaznih stanja, Gibbsovim slobodnim energijama kompleksa **TS₉**, **TS₁₀** i **10** je dodana vrijednost G implicitno solvatirane jedne molekule vode (-76.418556 Hartree).

*** U svrhu usporedbe s prijelaznim stanjem **TS₁₁** i reaktantom **10**, Gibbsovoj slobodnoj energiji kompleksa **11** je dodana vrijednost G implicitno solvatirane jedne molekule N-kloriranog derivata uree dobivenog raspadom hidratnog intermedijera **10** (empirijska formula: CON₂ClH₃, G = -684.816392 Hartree).

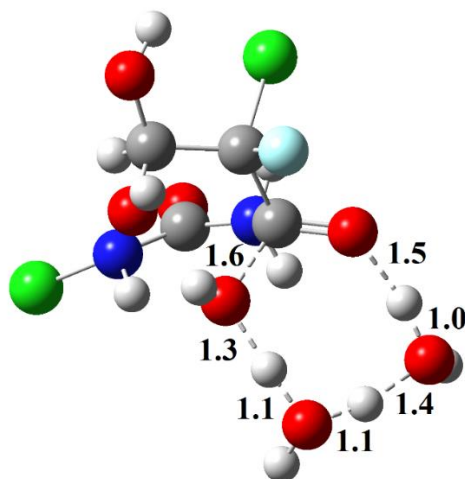
Strukture prijelaznih stanja **TS₉**, **TS₁₀** i **TS₁₁** prikazane su na slikama 21., 22. i 23.



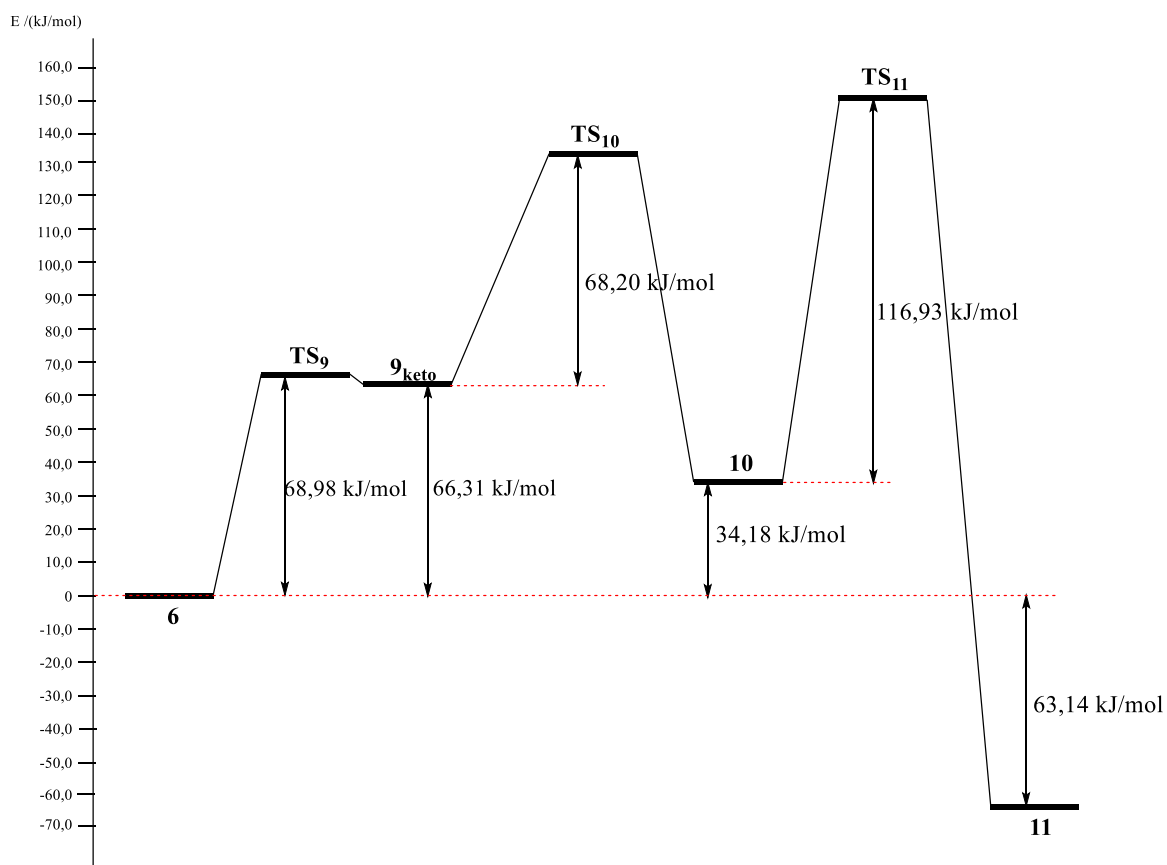
Slika 21. Struktura prijelaznog stanja **TS₉** optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.



Slika 22. Struktura prijelaznog stanja **TS₁₀** optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.



Slika 23. Struktura prijelaznog stanja **TS₁₁** optimizirana na B3LYP/6-31+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.

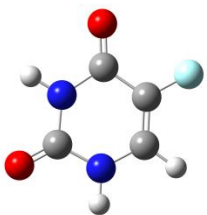
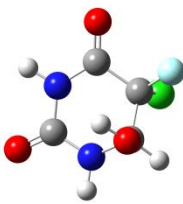
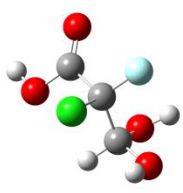


Slika 24. Grafički prikaz relativnih energetskih odnosa minimuma i prijelaznih stanja intramolekulskog proton-transfera N1-kloramida **6** i raspada do hidratnog produkta **11**.

4. 6. Ekotoksikološka analiza

U izradi ovog rada, ekotoksikološka analiza je provedena na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Laboratoriju za ekotoksikologiju unutar Službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju. Ispitivanja su provedena na 5-FU **1**, klorhidrinu **3a** i produktu **11** mjerenjem akutne toksičnosti za 24 h, pri čemu je korišten testni organizam voden buha (*Daphnia magna*). Rezultati su dobiveni pomoću programa GraphPad Prism7 (GraphPad Prism7, University of California San Diego), a izraženi su kao EC₅₀. EC₅₀ je koncentracija ispitivane supstancije koja na 50% testnih organizama ima letalan učinak. Ustanovljeno je da je klorhidrin **3a** manje, a produkt **11** više toksičan od 5-FU **1** (Tablica 4). Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da kloriranje kao metoda obrade otpadnih voda u slučaju 5-FU nije ekološki prihvatljiva te da bi takve otpadne vode trebalo tretirati na druge načine.

Tablica 4. EC₅₀ vrijednosti 5-FU **1**, klorhidrina **3a** i produkta **11** za testni organizam *Daphnia magna*.

5-FU 1	KLORHIDRIN 3a	SPOJ 11
		
EC ₅₀ = 285.8 mg/L	EC ₅₀ = 425.5 mg/L	EC ₅₀ = 212.6 mg/L

5. ZAKLJUČAK

Sve veća proizvodnja i potrošnja farmaceutika posljednjih nekoliko desetljeća dovela je do akumuliranja lijekova i njihovih metabolita u okolišu. Osim potencijalno štetnih učinaka lijekova i njihovih razgradnih produkata, zabrinjava i činjenica da prilikom kemijske obrade otpadnih voda nastaju produkti koji mogu imati nepovoljniji ekotoksikološki profil od ishodnih supstancija. Jedna od najčešće korištenih metoda za kemijsku obradu otpadnih voda je kloriranje hipoklorastom kiselinom (HOCl). U ovom je radu obrađen 5-fluorouracil (5-FU, **1**) kao primjer supstancije podložne transformaciji induciranoj procesom kloriranja. Kvantno-kemijskim i eksperimentalnim metodama detaljno je istražen mehanizam reakcije kloriranja 5-FU te je napravljena ekotoksikološka analiza ishodne supstancije 5-FU **1**, međuprodukta klorhidrina **3a** i produkta hidrata **11**, u svrhu procjene utjecaja navedenih supstancija na vodeni ekosustav.

U eksperimentalnom je dijelu simulirana reakcija kloriranja. Pripravljani su klorhidrin **3a** i hidratni produkt **11** uvođenjem plinovitog klora (Cl₂) u vodenu suspenziju 5-FU **1**. Doseg reakcije je praćen NMR spektroskopijom. Produkti su izolirani u visokom iskorištenju, a njihova je struktura određena pomoću ¹⁹F-, ¹H- i ¹³C-NMR spektroskopije te spektrometrije masa.

Kvantno-kemijskim izračunima istražen je reakcijski mehanizam kloriranja 5-FU **1**. Na B3LYP teorijskoj razini uz 6-31+G(d) bazni skup locirane su stacionarne točke odgovarajućih reakcija. Solvatacijski model SMD, uz vodu kao otapalo, korišten je za implicitnu solvataciju, dok je svakom prijelaznom stanju i minimumu pridružen optimalan broj eksplicitnih molekula vode.

Pokazano je da klorhidrin **3a** nastaje preko iminskog međuprodukta **2**, produkta adicije HOCl na N1-anion 5-FU. Energetska barijera **TS_{N1}** za nastajanje iminskog aniona **2'** iz N1-aniona 5-FU (**N1**) iznosi 82.90 kJ/mol, i manja je od analogne energetske barijere **TS_{N3}** preko N3-aniona za 52.83 kJ/mol. Energetska barijera adicije vode na imin **2** iznosi 40.07 kJ/mol, pri čemu nastaje *trans*-klorhidrin **3a** kao termodinamički i kinetički favoriziran produkt. Klorhidrin **3a** je dalje podložan kloriranju s HOCl do N1-kloramida **6**. Regioselektivnost kloriranja u N1-položaj klorhidrina **3a** potvrđena je eksperimentalno i teorijski. Kvantno-kemijskim izračunima je pokazano da je N1-kloriranje kinetički i termodinamički favoriziran proces. Energetska barijera kloriranja klorhidrinskog N1-aniona **2TS_{N1}** iznosi 85.43 kJ/mol. Prijelazno stanje kloriranja N1-aniona uz istovremeno deprotoniranje C6-OH hidroksilne skupine **2TS_{N1}**, energetski je povoljnije od analogne reakcije adicije Cl⁺ na N3-anion **2TS_{N3}** za 5.94 kJ/mol, a nastali N1-kloramid **6** je stabilniji od N3-kloramida **7** za 3.22 kJ/mol. Daljnjim kloriranjem nastalog N-kloriranog međuprodukta **6**, dolazi do pucanja prstena uslijed intramolekulskog proton-transfera s hidroksilne skupine C6-OH na karbonilnu skupinu u položju C2. Energetska barijera **TS₉** iznosi 68.98 kJ/mol, a energetska barijera adicije molekule vode **TS₁₀** na

aldehidni međuprodukt **9_{keto}** iznosi 68.20 kJ/mol. Adicijom molekule vode nastaje hidratni međuprodukt **10**, iz kojega nastaje hidratni produkt **11** hidrolizom amidne veze. Energetska barijera za proces hidrolize amida **TS₁₁** iznosi 116.93 kJ/mol.

Poznavanje mehanizma kloriranja 5-FU **1** i produkata koji pritom nastaju ključno je za razumijevanje okolišne sudbine ovog lijeka. Izrazitu zabrinutost izaziva veća toksičnost dobivenog produkta kloriranja **11** u odnosu na 5-FU **1**, utvrđena na testnom organizmu voden buhi (*Daphnia magna*). Rezultati izneseni u ovom radu sugeriraju da je potrebno razmotriti drukčije pristupe obradi otpadnih voda kako bi se izbjegao toksičan utjecaj kloriranih produkata na ekosustav. Proporcionalno otkrivanju štetnog utjecaja farmaceutika na okoliš i posljedičnog rasta zabrinutosti, raste i broj znanstvenih radova u kojima se predlažu inovativni načini obrade otpadnih voda, tzv. *napredni oksidacijski procesi* (AOPs, engl. *Advanced oxidation processes*). Takvi procesi, ne samo da su efikasniji u metaboliziranju farmaceutika otpornih na klasične postupke koji se provode u postrojenjima za obradu otpadnih voda (WWTPs, engl. *Wastewater treatment plants*) (među koje spada i 5-FU), nego i stvaraju produkte koji su manje toksični (Lutterbeck i sur., 2015). Najnoviji podaci iz literature predlažu Fenton oksidaciju kao vrlo efikasan postupak koji podrazumijeva reakciju između vodikovog peroksida H₂O₂ i feri Fe³⁺ ili fero Fe²⁺ iona pri čemu nastaje hidroksilni radikal HO• koji oksidira ciljne komponente (Governo i sur., 2017).

Osim novih načina obrade otpadnih voda, veća ekološka osviještenost sve više usmjerava farmaceutsku industriju zelenoj farmaciji, a u dizajniranju tzv. „zelenih lijekova“ važno mjesto zauzimaju i kvantno-kemijske metode.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na uloženom vremenu, strpljenju i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Posebno zahvaljujem dr. sc. Davoru Šakiću i Tani Tandarić, mag. med. biochem., na pomoći, podršci i konstruktivnim savjetima.

Zahvaljujem dr. sc. Adeli Krivohlavek i mr. sc. Lei Ulm s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar na pomoći pri izradi ovog rada.

7. POPIS LITERATURE

1. Antelo JM, Arce F, Parajo M, Pousa AI, Perez-moure JC. Chlorination of N-Methylacetamide: A kinetic study. *Int J Chem Kinet*, 1995, 27 (10), 1021-1031.
2. Atkins P, de Paula J. Atkins' Physical Chemistry, 10th edition. Oxford, 2014, Oxford University press, str. 568.
3. Bachrach SM. Computational Organic Chemistry. 2nd ed., New Jersey, John Wiley & Sons, 2014, str. 29-41.
4. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Phys Rev A*, 1988, 38, 3098-3100.
5. Becke AD. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. *J Chem Phys*, 1992, 96, 2155-2160.
6. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*, 1993, 98, 5648-5652.
7. Birnbaum LS, Fenton SE. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*, 2003, 111 (4), 389-94.
8. Blatchley ER 3rd, Gong WL, Alleman JE, Rose JB, Huffman DE, Otaki M, Lisle JT. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environ Res*, 2007, 79 (1), 81-92.
9. Boxall BA, Rudd MA, Brooks BW, Caldwell DJ, Choi K, Hickmann S, Innes E, Ostapyk K, Staveley JP, Verslycke T, Ankley GT, Beazley KF, Belanger SE, Berninger JP, Carriquiriborde P, Coors A, DeLeo PC, Dyer SD, Ericson JF, Gagne F, Giesy JP, Guin T, Hallstrom L, Karlsson MV, Larsson DGJ, Lazorchak JM, Mastrocco F, McLaughlin A, McMaster ME, Meyerhoff RD, Moore R, Parrott JL, Snape JR, Murray-Smith R, Servos MR, Sibley PK, Straub JO, Szabo ND, Topp E, Tetralet GR, Trudeau VL, Der Kraak GV. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What are the Big Questions?. *Env Health Perspect*, 2012, 120, 1221-1229.

10. Brezovšek P, Eleršek T, Filipič M. Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Res*, 2014, 52, 168-77.
11. Bu Q, Wang B, Huang J, Deng S, Yu G. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *J Hazard Mater*, 2013, 262, 189-211.
12. Carvajal G, Roser DJ, Sisson SA, Keegan A, Khan SJ. Bayesian belief network modelling of chlorine disinfection for human pathogenic viruses in municipal wastewater. *Water Res*, 2017, 109, 144-154.
13. Cramer CJ. *Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models*, 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2004, str. 356.-357.
14. Daughton CG. Emerging Chemicals as Pollutants in the Environment: a 21st Century Perspective. *Renew Resour J*, 2005, 23, 6–23.
15. DellaGreca M, Iesce MR, Pistillo P, Previtiera L, Temussi F. Unusual products of the aqueous chlorination of atenolol. *Chemosphere* 2009, 74, 730-734.
16. Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J Chem Phys*, 1971, 54, 724.
17. Eleršek T, Milavec S, Korošec M, Brezovšek P, Negreira N, Zonja B, López de Alda M, Barceló D, Heath E, Ščančar J, Filipič M. Toxicity of the mixture of selected antineoplastic drugs against aquatic primary producers. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23 (15), 14780-14790.
18. Faust SD, Aly OM. *Chemistry of Water Treatment*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, str. 488.
19. Fick J, Brodin T, Heynen M, Klaminder J, Jonsson M, Grabicova K, Randak T, Grabic R, Kodes V, Slobodnik J, Sweetman A, Earnshaw M, Barra Caracciolo A, Lettieri T, Loos R. Screening of benzodiazepines in thirty European rivers. *Chemosphere*, 2017, 176, 324-332.
20. Foresman JB, Frisch A. *Exploring chemistry with electronic structure methods*. 2nd ed., Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1996, 3-90.

21. Fukui K. The path of chemical-reactions - The IRC approach. *Acc Chem Res*, 1981, 14, 363-68.
22. Furst AL, Hoepker AC, Francis MB. Quantifying Hormone Disruptors with an Engineered Bacterial Biosensor. *ACS Cent. Sci.*, 2017, 3 (2), 110-116.
23. Gaussian 09, Revision A.02. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam NJ, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox D J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
24. GaussView, Version 5. Dennington R; Keith T; Millam J. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.
25. Gould JP, Richards JT, MtLes MG. The kinetics and primary products of uracil chlorination. *Water Res*, 1984, 18 (2), 205-212.
26. GraphPad Prism7, Motulsky H, University of California San Diego, 2017.
27. Governo M, Santos MSF, Alves A, Madeira LM. Degradation of the cytostatic 5-Fluorouracil in water by Fenton and photo-assisted oxidation processes. *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24, 844–854.
28. Haas, CN. Assessing the Need for Wastewater Disinfection. *J Wat Pollut Cont Fed*, 1987, 59, 856-64.
29. Hass U, Dünbier U, Massmann G. Occurrence of psychoactive compounds and their metabolites in groundwater downgradient of a decommissioned sewage farm in Berlin (Germany), *Environ Sci Pollut Res*, 2012, 19, 2096-2106.
30. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*, 1964, 136, B864-B71.

31. Hok L, Tandarić T, Šakić D, Ulm L, Krivohlavek A, Vrčec V. U pripremi za tisak.
32. Hratchian HP, Schlegel HB. Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J Chem Theory and Comput*, 2005, 1, 61-69.
33. Hurd RE, Reid BR. NMR spectroscopy of the ring nitrogen protons of uracil and substituted uracils; relevance to A psi base pairing in the solution structure of transfer RNA. *Nucleic Acids Res*, 1977, 4(8), 2747-2755.
34. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2015. godini, 2015., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 14. 3. 2017.
35. Katzung BG, Trevor AJ. Basic & clinical pharmacology, 13th ed., New York, 2015, McGraw-Hill Education, str. 929.
36. Klaster Andrija, 2011, <http://andrija.pharma.hr/Andrija/HOME.html>, pristupljeno 25. 3. 2017.
37. Klaster Isabella, 2007, <http://www.srce.hr/isabella>, pristupljeno 25. 3. 2017.
38. Kokko JP, Mandell L, Goldstein JH. An N.m.r. Investigation of Proton Mobility in Substituted Uracils. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 1042-1047.
39. Kosjek T, Perko S, Žigon D, Heath E. Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. *J Chromatogr A*, 2013, 1290, 62-72.
40. Kračun-Kolarević M, Kolarević S, Atanacković A, Marković V, Gačić Z, Paunović M, Vuković-Gačić B. Effects of 5-Fluorouracil, Etoposide and CdCl₂ in Aquatic Oligochaeta *Limnodrilus udekemianus* Claparede (Tubificidae) Measured by Comet Assay. *Water Air Soil Pollut*, 2015, 226-242.
41. Kümmerer K, urednik. Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Berlin, 2008, Springer, str. 74.
42. Legay, R, Massou, S, Azema J, Martino R, Malet-Martino M. Hydrolytic pathway of 5-fluorouracil in aqueous solution for clinical use. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98, 446-462.

43. Li W, Tanumihardja J, Masuyama T, Korshin G. Examination of the kinetics of degradation of the antineoplastic drug 5-fluorouracil by chlorine and bromine. *J Haz Mat*, 2015, 282, 125-132.
44. Lutterbeck CA, Wilde ML, Baginska E, Leder C, Machado EL, Kümmerer K. Degradation of 5-FU by means of advanced (photo)oxidation processes: UV/H₂O₂, UV/Fe²⁺/H₂O₂ and UV/TiO₂ — Comparison of transformation products, ready biodegradability and toxicity. *Sci Total Environ*, 2015, 527-528, 232-245.
45. Miyashita O, Kasahara T, Matsumura K, Shimadzu H, Takamoto M, Hashimoto N. Studies on fluorinated pyrimidines. IV. Stereochemistry of 6-alkoxyl-5-fluoro-5,6-dihidrouracils and 5-alkoxycarbonyl-5-fluoro-6-substituted-5,6-dihidroracils. *Chem Pharm Bull*, 1982, 36 (7), 2333-2341.
46. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Heindel JJ. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl*, 2008, 31 (2), 201-208.
47. Le-Minh M, Khan SJ, Drewes JE, Stuetz RM. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Res*, 2010, 44, 4295-4323.
48. Pliego JR Jr. Basic hydrolysis of formamide in aqueous solution: A reliable theoretical calculation of the activation free energy using the cluster-continuum model. *Chem Phys*, 2004, 306, 273-280.
49. Pople JA, Gill PMW, Johnson BG. Kohn-Sham density-functional theory within a finite basis set. *Chem Phys Lett*, 1992, 199, 557-560.
50. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit*, 2009, 15 (6), 137-45.
51. Sažetak opisa svojstava lijeka (5-fluorouracil), 2015., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 25. 3. 2017.
52. Sharma VK. Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl₂, ClO₂, O₃, and Fe(VI): Kinetics assessment. *Chemosphere*, 2008, 73, 1379-1386.
53. Soufan M, Deborde M, Legube B. Aqueous chlorination of diclofenac: kinetic study and transformation products identification. *Water Res*, 2012, 46 (10), 3377-3386.

54. Spinworks 4.2.0.0., Marat K, University of Manitoba, 2015.
55. Šakić D, Šonjić P, Tandarić T, Vrčec V. Chlorination of N-methylacetamide and amide-containing pharmaceuticals. Quantum-chemical study of the reaction mechanism. *J Phys Chem A*, 2014, 118 (12), 2367-2376.
56. Tandarić T. Diplomski rad: Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.
57. Tandarić T, Vrčec V, Šakić D. A quantum chemical study of HOCl-induced transformations of carbamazepine. *Org Biomol Chem*, 2016, 14 (46), 10866-10874.
58. Tee O, Banerjee S. Mechanisms of bromination of uracil derivatives. Formation of adducts in acidic aqueous solutions and their dehydration to 5-bromouracils. *Can J Chem*, 1979, 57, 626-634.
59. Tissandier MD, Cowen KA, Feng WY, Gundlach E, Cohen MH, Earhart AD, Coe JV. The Proton's Absolute Aqueous Enthalpy and Gibbs Free Energy of Solvation from Cluster-Ion Solvation Data. *J Phy Chem A*, 1998, 102, 7787-7794.
60. Valić F, Antičić K, Beritić-Stahuljak D, Brumen V, Cigula M, Doko-Jelinić J, Kaić-Rak A, Mustajbegović J, Preka N, Pucarín J, Senta A, Vitale K, Zebec M, Žuškin E. Zdravstvena ekologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2001, str. 118.
61. Vrčec, V. Farmakoekologija – okolišna sudbina lijekova. *Kem Ind*, 2017, 66 (3-4), 135-144.
62. Wastewater Technology Fact Sheet Chlorine Disinfection, 1999., <https://www.epa.gov>, pristupljeno 25. 3. 2017.
63. Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 167.-188.
64. WHO Model List of Essential Medicines, 2015., <http://www.who.int>, pristupljeno 13. 3. 2017.

8. SAŽETAK

Lucija Hok

Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila i ekotoksikološka analiza kloriranih produkata

Sve veća proizvodnja i potrošnja farmaceutika posljednjih nekoliko desetljeća dovela je do akumuliranja lijekova i njihovih metabolita u okolišu. Pojava lijekova u okolišu postala je goruća ekološka tema. Jedan od takvih farmaceutika je 5-fluorouracil (5-FU), antimetabolit koji se nalazi u okolišu u koncentracijama i do 92 ng/L. Eksperimentalno je pokazano da se tijekom postupka kloriranja, koji predstavlja jednu od najučestalijih metoda obrade otpadnih voda, 5-FU **1** pregrađuje u klorhidrinski **3a** i hidratni produkt **11**. Strukturne karakteristike dobivenih spojeva određene su ¹H-, ¹⁹F- i ¹³C-NMR spektroskopijom te spektrometrijom masa. Kvantno-kemijskim metodama istražen je reakcijski mehanizam kloriranja 5-FU **1** s hipoklorastom kiselinom HOCl. Korišten je B3LYP funkcional uz 6-31+G(d) bazni skup. Solvatacijski efekti opisani su implicitnim SMD solvatacijskim modelom te korištenjem optimalnog broja eksplicitnih molekula otapala (H₂O). Pokazano je da dolazi do nastajanja klorhidrina **3a** preko iminskog međuprodukta **2**. Daljnjim kloriranjem klorhidrina **3a** nastaje N1-kloramid **6** iz aniona klorhidrina **4_{N1}**. Kloriranjem N1-kloramida **6** dolazi do pucanja prstena i nastajanja hidratnog produkta **11**. Rezultati dobiveni kvantno-kemijskim metodama u skladu su s eksperimentalno dobivenim podacima. Ekotoksikološkom analizom na testnom vodenom organizmu *Daphnia magna* utvrđeno je da je klorhidrin **3a** manje toksičan, a produkt **11** više toksičan od ishodne supstancije 5-FU **1**. Dobiveni rezultati ključni su za poznavanje ekološke sudbine 5-FU **1** i predlaganje novih, manje toksičnih načina obrade otpadnih voda.

Ključne riječi: 5-fluorouracil, kloriranje, kvantno-kemijske metode, ekotoksikološka analiza

9. SUMMARY

Lucija Hok

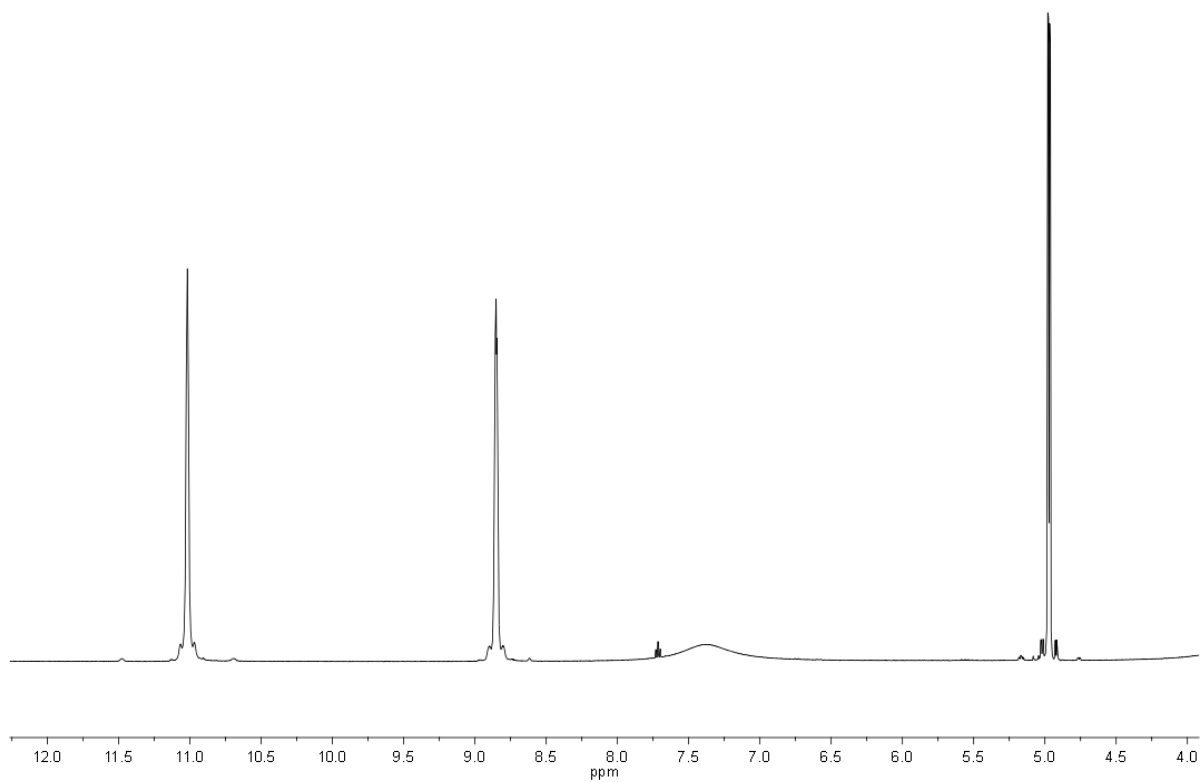
Reaction mechanism of chlorination of 5-fluorouracil and ecotoxicological analysis of chlorinated products

In the last few decades, the increasing production and consumption of pharmaceuticals has led to the accumulation of drugs and their metabolites in the environment. The occurrence of pharmaceuticals in environment has become a burning ecological issue. One of these pharmaceuticals is 5-fluorouracil (5-FU, **1**), antimetabolite drug which has been found in the environment in concentrations up to 92 ng/L. In this work, it is experimentally shown that during the chlorination process, which is one of the most common method for wastewater treatment, the 5-FU **1** yields chlorohydrin product **3a** and hydrated product **11**. Structural characteristics of **3a** and **11** are determined using ^1H -, ^{19}F -, ^{13}C -NMR spectroscopy and mass spectrometry. Reaction mechanism of chlorination of 5-fluorouracil is investigated using quantum-chemical methods. B3LYP functional with 6-31+G(d) basis set is applied. The solvent effects are described by the implicit SMD solvation model, using the optimal number of the explicit solvent molecules (H_2O). It has been shown that 5-FU **1** is chlorinated via imine intermediate **2** to chlorohydrin **3a**. Further chlorination of chlorohydrin **3a** yield to N1-chloramide **6** from the anion of chlorohydrin 4_{N1} . The chlorination of N1-chloramide **6** results in breaking of the ring and formation of a hydrated product **11**. The results obtained with quantum-chemical methods are in agreement with experimental data. Ecotoxicological analysis on aquatic organism *Daphnia magna* has been shown that chlorohydrin **3a** is less toxic, but product **11** is more toxic than starting substance 5-FU **1**. Results of this study play a key role in predicting the ecological fate of 5-FU **1** and proposing new, less toxic, ways of wastewater treatment.

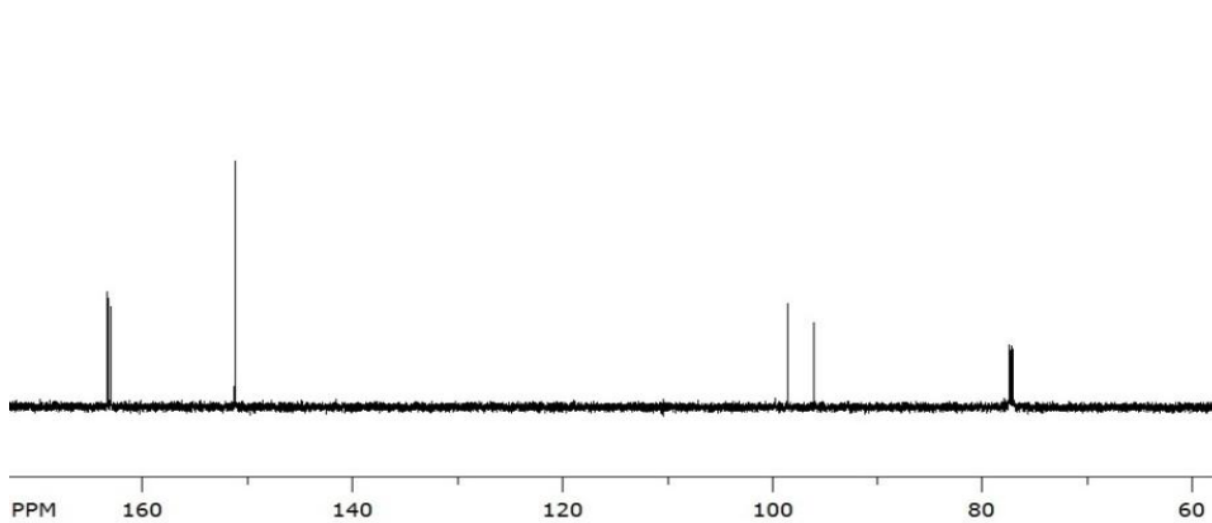
Key words: 5-fluorouracil, chlorination, quantum-chemical methods, ecotoxicological analysis

PRILOZI

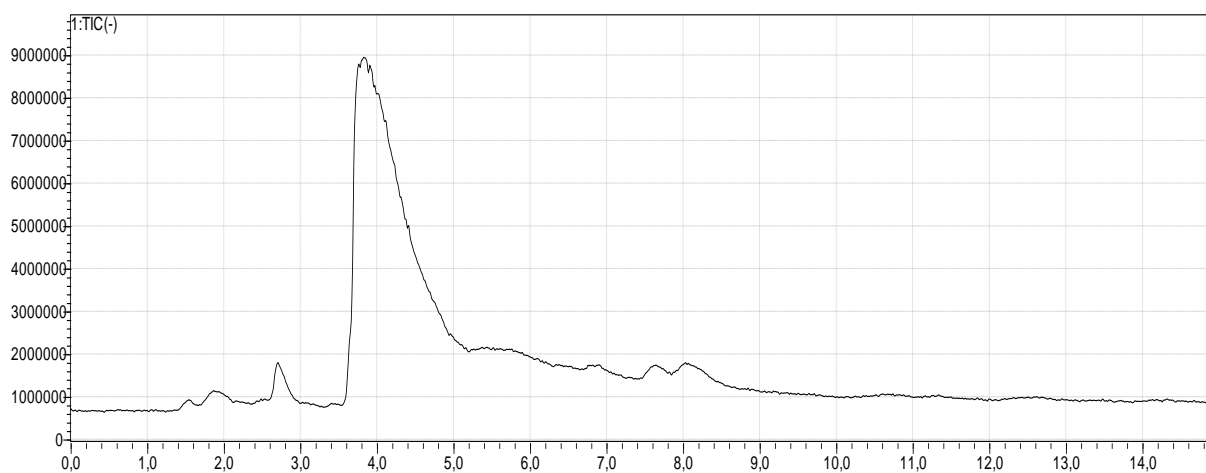
Prilog 1. ^1H -NMR spektar klorhidrina **3a** (u DMSO- d_6).



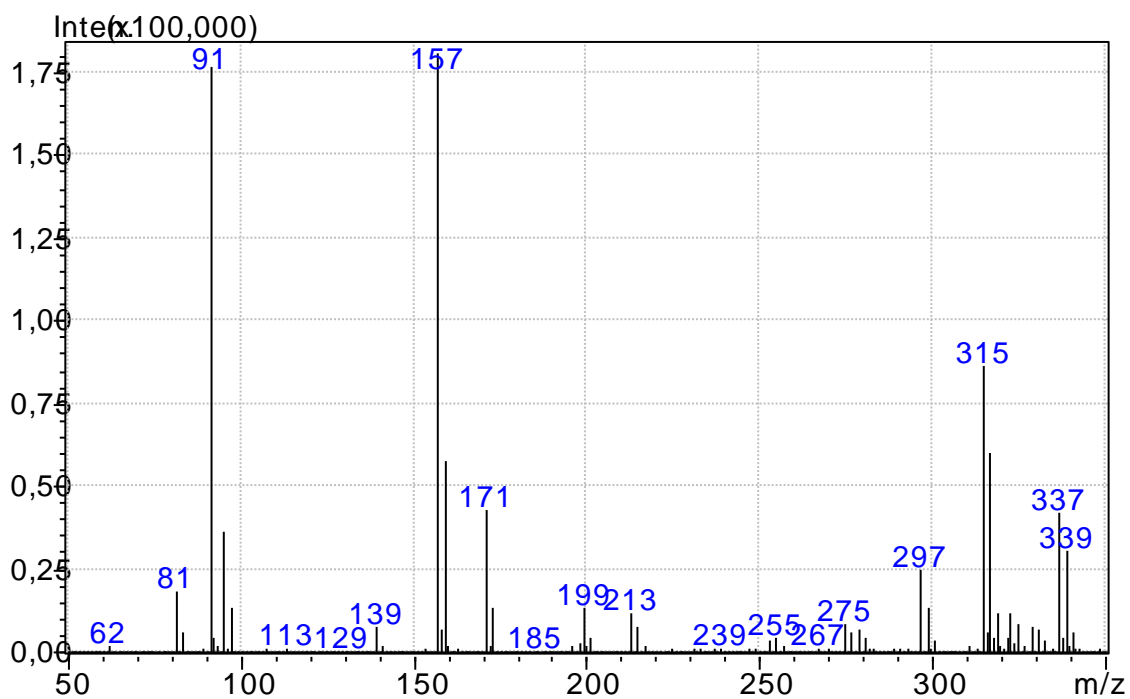
Prilog 2. ^{13}C -NMR spektar klorhidrina **3a** (u DMSO- d_6).



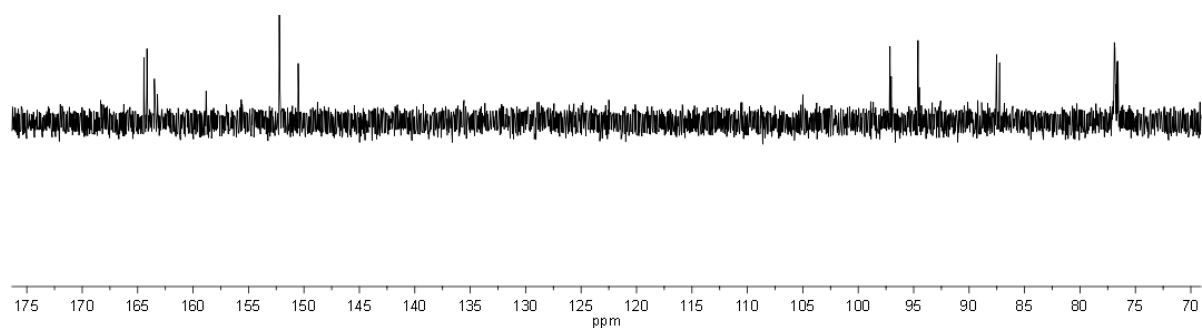
Prilog 3. Kromatogram ukupne ionske struje klorhidrina **3a** pri uvjetima deprotoniranja (ESI-).



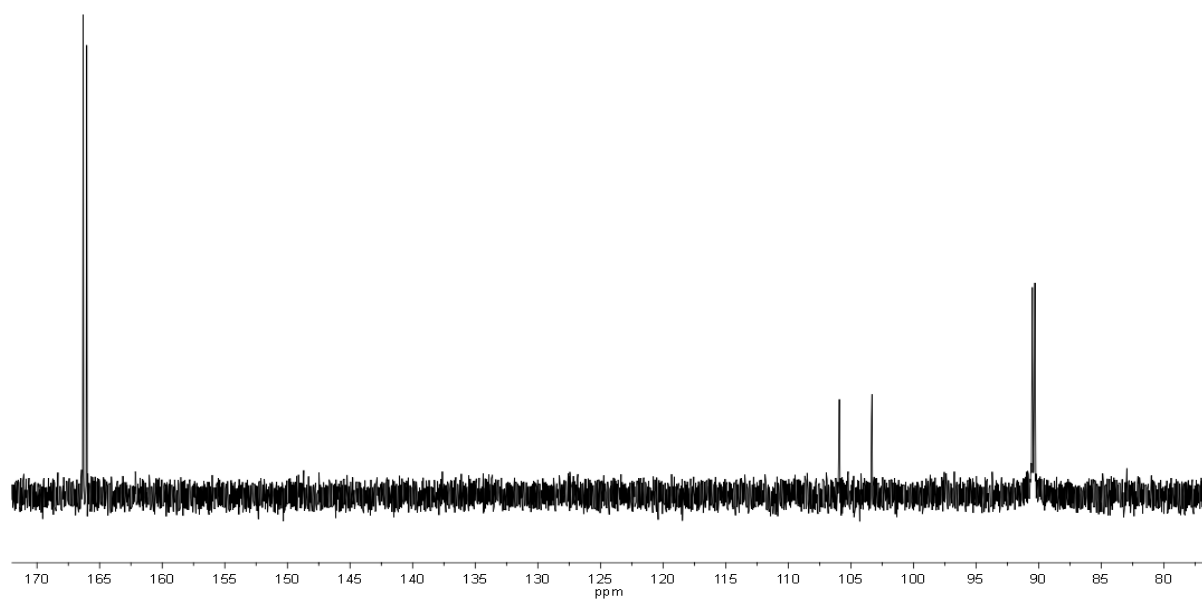
Prilog 4. Maseni spektar klorhidrina **3a** eluiranog nakon 4.0 min (ESI-).



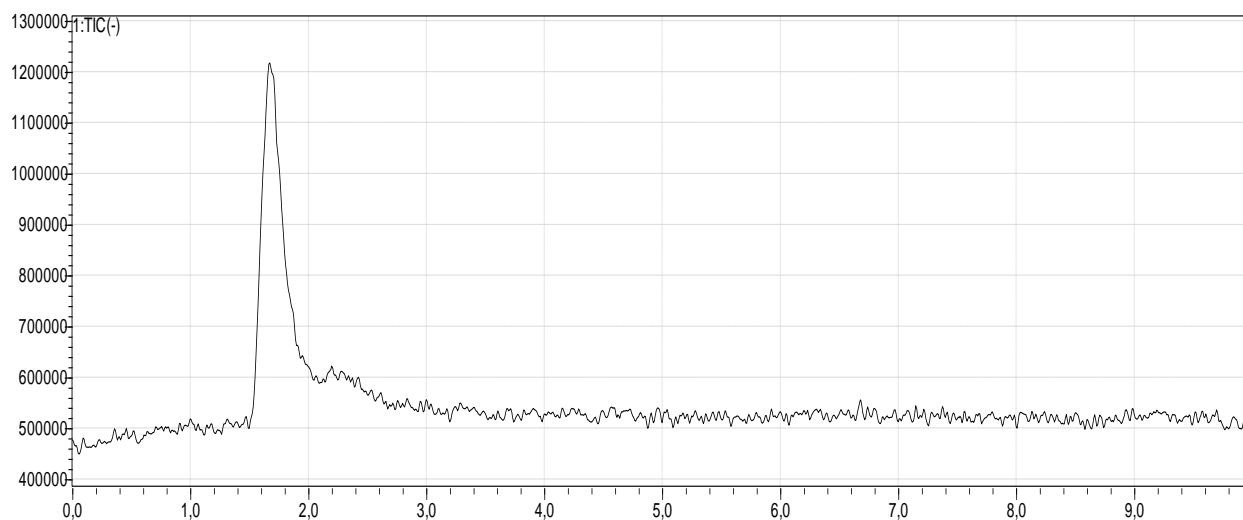
Prilog 5. ^{13}C -NMR spektar smjese klorhidrina **3a** i N1-kloramida **6** u DMSO-d_6 .



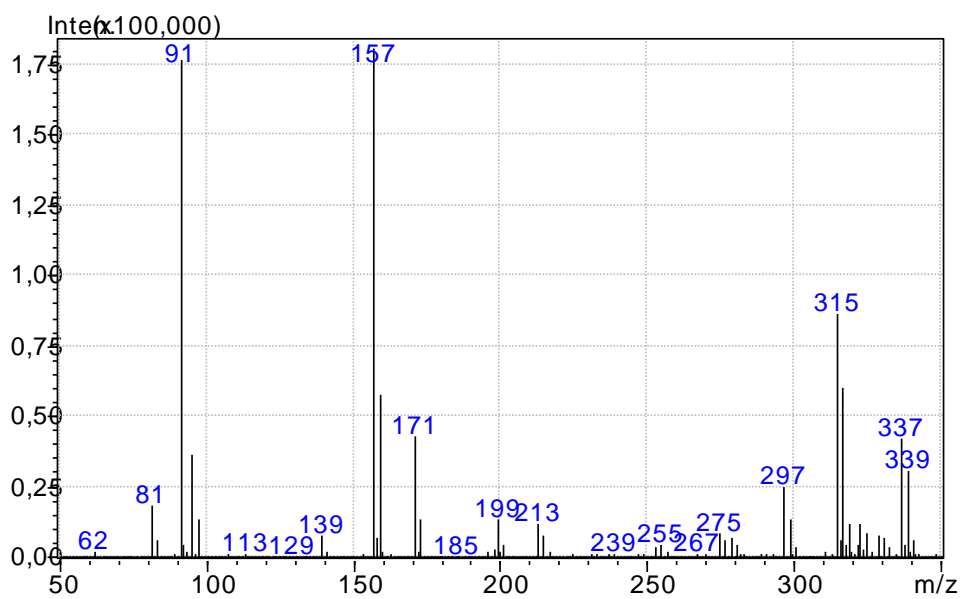
Prilog 6. ^{13}C -NMR spektar hidrata **11** u DMSO-d_6 .



Prilog 7. Kromatogram ukupne ionske struje hidratnog produkta **11** pri uvjetima deprotoniranja (ESI-).



Prilog 8. Maseni spektar hidrata **11** eluiranog nakon 1.9 min (ESI-).



Prilog 5. Geometrije lociranih minimuma i prijelaznih stanja optimiziranih na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini.

I				H	-4.53611400	-0.27403800	0.00043600
C	-0.40061100	-0.82162800	0.09965100	O	5.28503200	0.05325600	0.00121600
C	0.69570200	1.32782000	-0.02142000	H	4.29684500	0.07952600	0.00027800
C	1.92420000	0.77086400	-0.04841400	H	5.52074500	0.99225300	0.00189700
C	2.10874800	-0.67614800	0.00260600				
N	-0.43984600	0.55166000	0.05820400	N3			
O	-1.40408100	-1.53828600	0.15637200	C	-0.37371400	-1.10421900	-0.14534100
O	3.16889600	-1.27751000	-0.01407400	C	2.05916300	-1.27787600	0.02579900
N	0.87536600	-1.35657400	0.07571800	C	2.13693800	0.06517200	0.06809900
F	3.02965500	1.53336300	-0.12687900	C	0.92765600	0.90879000	0.00297100
H	0.54506300	2.40056400	-0.06222600	N	0.81957400	-1.86322800	-0.08437000
H	-1.36692000	1.01163700	0.09438400	O	-1.44014100	-1.74668800	-0.21852000
H	0.92970800	-2.37042200	0.10247200	O	1.00833700	2.14632700	0.05971300
O	-4.00258100	-0.68667100	-0.34241700	N	-0.26587100	0.24167100	-0.12067200
H	-3.14257300	-1.13130400	-0.15971400	F	3.35713700	0.66500000	0.17641600
H	-4.69387900	-1.22406300	0.07004900	H	2.92779500	-1.92682100	0.07394700
O	-2.97190300	1.78863800	0.09342900	H	0.70647100	-2.86723000	-0.09046200
H	-3.55718300	1.00349700	-0.05216900	O	-2.51306400	1.94062100	-0.32901600
H	-3.32063500	2.24940100	0.87064900	H	-2.18170100	2.71955800	0.14245100
				H	-1.72338600	1.32975100	-0.32523300
N1				O	-3.98456600	-0.45666300	0.46453100
C	1.49203800	0.18477100	-0.00067100	H	-3.70392600	0.46236800	0.28139500
C	0.06245200	-1.62438900	-0.00024200	H	-3.18019800	-0.97171000	0.24261200
C	-1.07400200	-0.85007900	0.00000900				
C	-0.99225100	0.57366300	-0.00001800	TS_{N1}			
N	1.32493100	-1.16211900	-0.00058600	C	1.40410100	-0.85985200	0.12892000
O	2.59691100	0.76902000	-0.00102300	C	2.07760200	-0.19947200	-1.02792800
O	-1.92443700	1.40532400	0.00022000	C	0.83873300	1.72657300	-0.71359600
N	0.33626100	0.99264000	-0.00035600	C	0.97371700	0.15716900	1.17723500
H	0.48890700	1.99548100	-0.00042200	H	-4.16989800	0.14994900	-0.21036000
F	-2.31892700	-1.43703400	0.00034800	N	1.83679800	0.99329800	-1.42737600
H	-0.05326500	-2.70954800	-0.00015900	N	0.56376700	1.35106600	0.59819900
O	-4.66567300	0.68616800	0.00040900	O	0.29588700	2.68915400	-1.22777900
H	-3.73920000	1.02205200	0.00038200	Cl	-0.19378600	-1.61379900	-0.44433100

O	-2.57221500	-2.14877600	-0.87694900	C	0.37215100	0.99671400	1.06966200
O	-3.28370200	-0.02404000	0.13732000	C	-0.83504500	0.53427600	0.29748500
H	-2.94547400	-1.02672900	-0.33711100	C	-0.67926400	-0.93700300	-0.18742300
H	-2.76159800	-2.84191500	-0.22426700	N	1.51303000	0.44859500	0.96607200
H	2.81695000	-0.79993800	-1.56275000	O	2.78540700	-0.82469100	-0.43403100
O	0.91395900	-0.07639100	2.36705000	O	-1.71388200	-1.59543900	-0.35795200
H	-0.27609600	1.81232100	1.01266300	N	0.56783400	-1.36255900	-0.41351700
F	2.22920700	-1.82680700	0.66143000	F	-1.94296700	0.67544700	1.11572500
H	-2.51208100	1.34548100	0.67113400	Cl	-1.09521300	1.65155800	-1.12185200
O	-2.04371000	2.20854100	0.92328800	H	0.21449800	1.82289700	1.76895000
H	-1.97091900	2.69170600	0.08446200	O	-4.45908700	-1.05033500	0.20339900
TS_{N3}				H	-3.53822800	-1.30419800	-0.03032400
C	0.68034200	1.84558700	-0.57822700	H	-4.33933500	-0.19371900	0.63895200
C	2.20884700	0.03669800	-0.45749300	O	5.39729300	0.06803800	0.12601500
C	1.38640800	-0.53727900	0.67573300	H	5.73974600	-0.59029200	-0.49597600
C	0.49369100	0.33317700	1.33548600	H	4.42489900	-0.08207200	0.08719500
H	-0.75170000	1.89605100	1.01951500	2			
N	1.73301900	1.16990200	-1.04725100	N	1.48573600	1.91674200	-0.50246900
O	0.10933700	2.81543000	-1.08438700	C	2.05732400	0.78402400	-0.60836300
N	0.12045100	1.44058400	0.72897200	C	1.41594100	-0.55057100	-0.30596900
F	1.99289300	-1.46661400	1.46560400	C	-0.11742800	-0.48459800	-0.20799000
O	-2.08916600	-2.45229300	-0.95077200	O	-0.79504300	-1.49697000	-0.28496200
O	-3.34509200	-0.06291600	-0.72882900	N	-0.60823300	0.77199300	-0.00835400
H	-2.88523100	0.37914800	-1.46001200	H	-1.63006200	0.87003200	0.18282200
H	-2.97047800	-0.99451300	-0.74703700	C	0.12511400	1.97095500	-0.07169600
O	-2.66420100	1.53036800	1.43012800	O	-0.39923500	3.02739500	0.19261700
H	-3.27024600	2.27678000	1.31714400	Cl	2.07696100	-1.14096700	1.26668300
H	-2.90708700	0.89430500	0.70273900	H	3.09555400	0.73630900	-0.94234200
Cl	-0.38786300	-1.57855100	-0.15781000	F	1.76882200	-1.43895200	-1.28584400
H	-2.25508000	-3.14909600	-0.29279500	O	-3.63266000	-1.80557000	-0.18192000
O	3.24735300	-0.54107500	-0.78627700	H	-3.99943300	-2.24065800	-0.96527400
H	0.04158300	0.07360600	2.28881500	H	-2.65795000	-1.87598100	-0.25222000
2'				O	-3.34428400	0.80926100	0.54714800
C	1.63546700	-0.62581500	-0.03075300	H	-3.97612700	1.50262200	0.30897900
				H	-3.71817000	-0.05826700	0.26384000

TS_{3a}

C	-1.17482900	-0.69405600	0.07708700
C	0.35181900	-0.58515300	0.22544300
C	0.26696800	1.76198700	-0.05990900
C	-1.75933700	0.44269500	-0.78581300
H	0.71199900	-1.34958500	0.91642700
H	2.46119600	0.72273500	0.81079800
N	0.87626600	0.66262500	0.46373600
N	-0.98437700	1.57061600	-0.74900700
O	0.70816900	2.90131300	-0.01511600
O	-2.79330300	0.32532600	-1.41284200
O	0.93069200	-1.21964600	-1.13727700
O	3.47123200	0.48161100	0.84086300
H	3.75179200	0.45345500	1.76845300
H	3.49324000	-0.71670200	0.06289100
H	0.82543700	-0.55350900	-1.84267800
O	3.27329500	-1.54083800	-0.58410400
H	2.13341400	-1.39996800	-0.93595400
H	3.89793800	-1.54787100	-1.32792000
H	-1.35754500	2.40379600	-1.19537400
F	-1.53429800	-1.89858600	-0.44418500
Cl	-1.89296600	-0.57016100	1.73322900

TS_{3b}

C	-1.21819800	-0.32375500	0.43856300
C	0.31383100	-0.47603600	0.37385100
C	0.56448700	1.83523200	-0.05554100
C	-1.72856600	0.84368400	-0.44331700
H	0.62634900	-1.24991000	1.07789400
H	2.66799900	0.49780100	0.66577700
N	1.04981300	0.68148100	0.47689400
N	-0.77186700	1.81135200	-0.59841000
O	1.17711200	2.89020700	-0.13717800
O	-2.85129900	0.90430300	-0.90256600
O	0.62700600	-1.24435300	-0.99581200

O	3.61767100	0.09088400	0.61212700
H	3.98920500	0.06719200	1.50725100
H	3.35021800	-1.14440000	-0.08919000
H	0.56834400	-0.58782600	-1.71588200
O	2.92662800	-1.94226100	-0.65148600
H	1.78398800	-1.61789800	-0.90268300
H	3.46158100	-2.09787000	-1.44710000
H	-1.06352200	2.67719200	-1.04384500
F	-1.48633800	0.03949100	1.75188100
Cl	-2.08935300	-1.83614900	0.10290900

3a

C	-2.56297200	-0.62631900	0.60485600
C	-1.42426700	1.17060800	-0.69310700
C	-0.07683500	0.51840800	-0.29235400
C	-0.19167700	-1.00853600	-0.10503400
N	-2.44764200	0.67977200	0.20342500
O	-3.54147900	-1.10551400	1.14395200
O	0.72802300	-1.77469600	-0.32583200
N	-1.42242900	-1.42334500	0.34005300
H	-3.29443600	1.22589000	0.31060000
H	-1.52257800	-2.40546200	0.58243900
H	-1.33007300	2.25023000	-0.56888400
O	-1.71676400	0.98349100	-2.05780900
H	-1.91555400	0.05031300	-2.24713600
F	0.84924400	0.76911600	-1.25392700
Cl	0.50665200	1.20862000	1.26337800
O	4.54065100	0.61401200	0.97637000
H	4.21631300	-0.05267700	0.33411100
H	4.99479400	1.28223900	0.44332400
O	3.57473300	-1.37302400	-0.81724400
H	3.93291900	-2.23914800	-0.57189900
H	2.60602800	-1.45408800	-0.72064500

3b

C	2.58195400	-0.83533100	-0.42188500
---	------------	-------------	-------------

C	1.45268300	1.01808800	0.82289800	O	-4.50200600	-0.68501500	-0.15775700
C	0.09598000	0.38105600	0.44352800	H	-3.57283500	-1.00906600	-0.29971000
C	0.19210000	-1.14899900	0.25264500	H	-4.59387400	-0.66648700	0.80623700
N	2.47813200	0.48390800	-0.07050300	O	-3.31812400	2.01439200	-0.21933900
O	3.56696800	-1.35597700	-0.91015400	H	-3.92110700	1.25771300	-0.35657900
O	-0.75296200	-1.88817500	0.46288200	H	-2.45944100	1.55949800	-0.05342100
N	1.41052800	-1.59493000	-0.18453000				
H	3.35224600	0.99811300	-0.09723800	4_{N3}			
H	1.49009100	-2.58373400	-0.40554700	N	0.38214300	-1.73930700	0.10787100
F	-0.79598100	0.63245000	1.44171400	C	1.56149900	-1.18486300	-0.47816400
Cl	-0.54447100	1.07564600	-1.08830000	C	1.63953800	0.28222700	-0.01975700
H	1.64372600	0.74530300	1.86960600	C	0.28432100	1.02567700	-0.24747400
O	1.46214400	2.40597800	0.79556600	O	0.33118300	2.23641000	-0.46831800
H	1.13034100	2.71058100	-0.06995800	N	-0.84742600	0.29068500	-0.20187000
O	-4.26603500	0.70741700	-1.11696300	C	-0.84689300	-1.05165400	0.05704200
H	-4.05954700	-0.00070700	-0.47001600	O	-1.87805900	-1.71090100	0.24927600
H	-4.84745300	1.32186100	-0.64641200	H	0.27597200	-2.74629400	0.08312600
O	-3.61277700	-1.38618900	0.69806300	F	2.65164100	0.91118700	-0.69107100
H	-2.64402200	-1.51354700	0.70970400	Cl	2.07959600	0.33723000	1.75312200
H	-3.98116300	-2.23208200	0.40250100	O	1.60839200	-1.26974200	-1.90353000
				H	0.80152400	-0.85969000	-2.26255800
4_{N1}				H	2.44708400	-1.72884800	-0.14239100
N	-0.88472800	0.38467900	0.23575800	O	-4.54086900	-0.50027600	0.69981900
C	0.32116000	0.93115400	0.73685700	H	-3.70132400	-0.99429100	0.60592900
C	1.59869600	0.36026600	0.07524700	H	-4.32251600	0.36216500	0.29226600
C	1.58662300	-1.17878100	0.04096800	O	-3.25298100	1.73554600	-0.64569100
O	2.60680900	-1.85406300	0.09164000	H	-2.40962200	1.21470500	-0.54539200
N	0.32682800	-1.66281400	-0.07481600	H	-3.02417200	2.60239900	-0.27874100
C	-0.91297300	-0.89744900	-0.06973900				
O	-1.91285300	-1.58525400	-0.38340500	2TS_{N1}			
F	2.71782700	0.79033400	0.76663800	C	-0.50686200	-0.27640500	-0.81417000
Cl	1.77498700	0.97807700	-1.62208900	C	-0.46562500	2.01057100	0.15583500
O	0.43616300	0.65090400	2.15245200	C	-2.62876800	0.70680600	0.29487300
H	1.23833500	1.09223000	2.48049900	O	-3.82477200	0.68949400	0.53078500
H	0.32329700	2.01913400	0.58458000	O	4.29427300	0.75849200	-0.58858500
H	0.21474500	-2.66525300	-0.18115800	H	4.37267000	0.50079600	-1.52052300

Cl	1.98801700	0.96731600	-0.41065200	O	3.78425200	1.46296000	0.16277500
O	0.28984200	-1.37166300	-0.97495400	H	4.05444200	0.25640200	-0.27397600
N	0.19226400	0.88135300	-0.19504800	H	1.23288100	2.62228700	-0.51524200
H	0.82073000	-1.62935700	-0.14938500	H	4.32547400	-0.69695600	-1.64229100
O	1.81940100	-2.20049600	1.01773600	H	-0.20981800	1.92190500	0.98847200
H	-0.86954300	0.01127300	-1.81375400	H	4.29851100	1.62860900	0.96626300
H	2.79036700	-1.86723200	0.86404200				
H	1.56895900	-1.82811600	1.87604500	5_{N1}			
O	4.21570300	-1.29301400	0.73298000	C	0.37106000	-0.11040200	-0.59042200
H	4.31101500	-0.24125600	0.03472300	C	-0.85790100	1.56064700	0.88524100
H	4.89245100	-1.93443800	0.47460000	C	-1.39615200	-0.89527100	1.09698600
O	0.00337900	3.11205500	0.40822800	O	-1.82507200	-1.80741900	1.78019800
N	-1.88989600	1.85652900	0.25024800	Cl	0.58652400	2.61131600	-1.03408900
H	-2.37130600	2.71440500	0.50118000	O	1.38445500	-0.39291200	0.18511800
C	-1.77204900	-0.55978400	0.04856200	N	-0.27163700	1.28218000	-0.32466900
F	-1.38706300	-1.01987900	1.29509100	H	0.55110800	-0.08618900	-1.68280500
Cl	-2.76984900	-1.82369400	-0.73224600	O	-0.98936500	2.65338600	1.41751900
				N	-1.41126800	0.41617200	1.50783700
2TS_{N3}				H	-1.80525600	0.59961600	2.42401600
N	-1.32048300	-0.42830800	1.73168800	C	-0.82556300	-1.08116100	-0.31864300
C	-0.20223600	-1.11671700	1.30503000	F	-0.40042000	-2.36611300	-0.46312400
C	-1.85043600	0.74479400	1.06156800	Cl	-2.20892400	-0.85589800	-1.50624300
H	-1.44551500	-0.48216000	2.73523200	O	4.18141400	0.31782300	0.57099000
O	4.20098800	-0.80515400	-0.68627600	H	3.21256200	0.43535600	0.48604600
Cl	1.90728600	-1.13300500	-0.42565800	H	4.26884500	-0.63423500	0.37700300
O	0.41536300	-1.86860200	2.03832900	O	3.19378500	-2.37992700	-0.13386400
N	0.15050200	-0.91757800	-0.05253900	H	2.98024800	-3.00268400	0.57601100
C	-1.91702300	0.37217500	-0.43621400	H	2.44699800	-1.71790000	-0.10734500
F	-2.25643700	1.46831100	-1.16776100				
Cl	-3.22737200	-0.87184500	-0.71196100	5_{N3}			
H	-2.87229300	0.90227500	1.41826800	C	1.11251000	0.72478400	-0.12489700
O	-1.16750300	1.93114200	1.29870200	C	-1.45621000	0.47562300	0.14474200
C	-0.57537200	-0.19142000	-0.97214900	C	-0.02835700	-1.61475100	-0.12597300
O	-0.23887500	0.02224500	-2.11925000	O	0.06554500	-2.78698000	-0.41747100
O	1.32051000	2.18774400	0.34582900	O	1.98091400	1.55437000	0.37052900
H	2.30811300	1.84082900	0.34832800	N	-0.32609900	1.17573000	0.22112900

H	1.11301200	0.60480300	-1.23806000
O	-2.60727000	0.87214300	0.33780500
N	-1.22736200	-0.90485600	-0.22637600
C	1.13849700	-0.74344000	0.42964700
F	0.98593400	-0.74692000	1.80630300
Cl	2.69812600	-1.52124200	0.04070700
H	-0.36774500	2.10257500	0.63090900
Cl	-2.62093100	-1.80266300	-0.70353000
O	3.24120500	3.26450000	-1.29104000
H	3.05448100	4.09055500	-0.82228000
H	2.81879400	2.56711200	-0.70649700
O	-3.23755500	3.64201800	0.40965400
H	-3.08510400	2.67289200	0.46347000
H	-2.98627100	3.87292200	-0.49648600

6

C	-1.22896000	-0.36024000	0.81888500
C	0.19089000	-0.71525200	-1.21221900
C	1.41959500	-0.74865500	-0.26491500
C	1.07274500	-1.33495700	1.11724100
N	-0.90181400	-0.06699600	-0.48991200
O	-2.27317400	-0.06576300	1.37265000
O	1.84950600	-1.96976900	1.79243300
N	-0.22503100	-1.05588800	1.51521700
F	2.38646100	-1.51497600	-0.83838900
Cl	2.05579200	0.91259000	-0.02513500
O	-0.13153200	-1.97437700	-1.72917400
H	-0.35758800	-2.60366400	-1.02250400
H	0.43701400	-0.09596300	-2.07435600
H	-0.47898600	-1.31767700	2.46389800
Cl	-2.14364100	0.64511800	-1.44922900
O	3.16512200	3.65462000	0.24442900
H	4.08642800	3.80988800	0.50268400
H	2.69687000	4.48082300	0.43856400
O	-4.84928600	1.29871200	0.79171300
H	-5.29807700	1.28831600	1.64948700

H	-3.99316200	0.85944300	0.94444200
---	-------------	------------	------------

7

C	2.39024500	-0.24595100	0.43521100
C	0.77188400	-1.87727900	-0.55633100
C	-0.35107700	-0.87441800	-0.21237700
C	0.11612100	0.59753900	-0.29182900
N	1.93149500	-1.52012800	0.22653200
O	3.47326700	0.03034100	0.89412400
O	-0.62973100	1.49586600	-0.61642800
N	1.44842400	0.77901900	0.04764900
F	-1.37904200	-1.03233100	-1.08474400
Cl	-0.95881100	-1.16125800	1.45433400
O	1.00987400	-1.95821100	-1.94047300
H	1.40294700	-1.13469700	-2.27771900
H	0.44120100	-2.87490000	-0.26444700
Cl	2.02428100	2.39799400	0.13456100
H	2.62123200	-2.23606100	0.42374100
O	-3.53986600	1.67814600	-0.93421100
H	-3.69736800	2.61265200	-0.73257400
H	-2.57145200	1.56246100	-0.89567800
O	-4.73830800	-0.00479300	1.02631200
H	-4.34672900	0.56410400	0.32997100
H	-5.37580500	-0.56946400	0.56626800

TS₉

C	-0.79859100	-0.05892200	-1.24490700
C	-2.06409500	0.18259400	-0.35562500
C	-1.73482700	0.87800600	0.97562100
C	0.40893800	-0.40450600	1.05753900
N	0.15118600	-0.90472000	-0.15358500
N	-0.56142700	0.43242200	1.57947100
H	-0.31599100	0.88143600	2.45627400
O	1.41989800	-0.62649100	1.79322900
O	-2.42358700	1.73263800	1.48272100
O	-0.22232400	1.00124700	-1.66842600

H	0.81422300	1.95153400	-0.90303900
H	-1.00616200	-0.86645600	-1.96774000
O	3.71212900	-0.60221600	1.01638800
H	2.61026200	-0.68799900	1.33684800
H	4.23862800	-0.27134900	1.76437400
O	3.78612900	1.11342700	-0.82230800
H	3.77741600	0.10004300	0.22735100
H	3.76289800	0.73789700	-1.71673600
O	1.56607200	2.44124700	-0.43469000
H	1.46856600	3.37993800	-0.65269600
H	2.96266300	1.69797300	-0.73502200
Cl	-2.91264200	-1.37670300	0.03569900
F	-2.93048400	0.96295900	-1.04993900
Cl	1.34549300	-1.93773200	-0.85172600

9_{keto}

C	1.88601900	0.23588400	0.65846800
C	0.77704400	1.05709700	1.36972400
H	0.21774300	0.53074400	2.16147900
Cl	1.76715300	-1.51801200	1.08552500
O	0.65070800	2.22933100	1.11698400
F	3.06634700	0.69434600	1.17539100
C	1.99323600	0.39063800	-0.88938600
C	-0.53265200	0.59045900	-1.36175800
N	0.84586000	0.45347100	-1.66844100
H	1.05737100	0.75812400	-2.61577300
O	3.09020300	0.46233100	-1.39900700
O	-1.24746500	1.31698500	-2.01395800
N	-0.89736700	-0.18465300	-0.26287000
H	-0.64201800	-1.17899200	-0.33548500
Cl	-2.56292300	-0.06424000	0.22395400
O	-0.65326300	-3.02764100	-0.76075000
H	-1.34380800	-3.45849300	-1.28748400
H	0.15602900	-3.54500300	-0.89276200
O	-5.22682300	0.30469100	0.94711100
H	-5.24031900	0.93547600	1.68325200

H	-5.56225900	0.79552800	0.18096600
---	-------------	------------	------------

9_{enol}

C	1.90691500	-0.33453500	0.18344100
C	1.36564000	1.11795300	0.11210100
H	1.16213900	1.60854100	1.07559600
Cl	1.69310200	-1.04985200	1.82252000
O	1.35411900	1.68960900	-0.95614900
F	3.25232100	-0.22258400	-0.04180700
C	1.35629100	-1.31395000	-0.89015400
C	-1.09663900	-0.85753800	-0.41685000
N	-0.01430900	-1.48164100	-1.02803100
H	-0.26271800	-2.16618400	-1.73614600
O	2.11906100	-1.94784600	-1.58496900
O	-2.22910400	-1.42821200	-0.80405300
N	-0.85989800	0.12012400	0.39261200
Cl	-2.23847200	0.82001400	1.18500400
H	-3.06461300	-0.95989300	-0.53412700
O	0.47575000	4.46267900	-0.70155500
H	0.77747700	3.55965100	-0.91616600
H	1.03357700	5.05423700	-1.22724100
O	-4.75293100	-0.54949100	-0.51844400
H	-5.42180300	-1.25165600	-0.50959700
H	-5.03261000	0.11094600	0.13408800

TS₁₀

C	0.47696200	-1.37298900	0.38764000
C	1.21434700	-0.00002700	0.24071500
H	0.51241200	0.79699700	-0.04187400
Cl	-0.43127900	-1.45260500	1.96148100
O	2.09267200	0.24139600	1.14761700
O	1.88586200	-0.22961200	-1.22430500
H	2.51792900	0.87306000	-1.51894200
O	3.00627600	1.90052700	-1.63666600
H	3.20493600	2.25316300	-0.59611000
O	3.16030500	2.45870200	0.73065800

H	2.69891000	1.54937200	1.04294200
H	3.81903300	1.85379500	-2.16520300
H	4.00931000	2.54263100	1.19126900
H	2.52802700	-0.95381100	-1.09733700
F	1.43649500	-2.34021300	0.45804200
C	-0.46992800	-1.77918600	-0.77635600
C	-2.18712100	0.24435700	-0.91694700
N	-1.56706300	-1.00911700	-1.16501200
H	-1.97092800	-1.40658200	-2.01053200
O	-0.23608000	-2.80224500	-1.38681100
O	-2.90267200	0.72509200	-1.77179500
N	-1.89671600	0.83436200	0.29767500
H	-1.73388600	0.23965000	1.10712700
Cl	-2.77602600	2.25455300	0.71838700

10

C	-1.85651900	0.17328400	0.34629500
C	-2.37380900	-0.78608600	-0.75703400
H	-1.59725400	-1.50754200	-1.00412400
Cl	-1.44255500	-0.66632700	1.88073600
O	-3.53900900	-1.38477400	-0.26201200
F	-2.87433600	1.05101400	0.62151700
C	-0.65123300	1.05195900	-0.09912100
C	1.10482300	-0.80222400	-0.36287600
N	0.57996500	0.52043300	-0.40739700
H	1.24737100	1.25369900	-0.64542900
O	-0.80998900	2.26689200	-0.15012200
O	0.44022100	-1.81561900	-0.43377000
N	2.47533100	-0.73565900	-0.30328300
H	2.95719500	0.07627900	0.11233400
Cl	3.36309500	-2.19773500	-0.19849100
H	-3.73513700	-2.16586900	-0.80267300
O	-2.60545300	-0.03463000	-1.92664500
H	-3.33119800	0.58915300	-1.74441600
O	1.68737300	3.38402700	-0.49756400
H	0.71470100	3.28292900	-0.37371900

H	1.82610800	4.06613800	-1.17115300
O	3.53922500	1.70817100	0.71852600
H	2.99849300	2.46496500	0.40271700
H	3.71399800	1.86261800	1.65851800

TS₁₁

C	-1.48689800	0.64916300	0.05868500
C	-0.63738900	-0.68753100	0.29644200
C	1.75485000	0.15300600	1.06640900
C	-0.92428200	1.77127400	-0.87132300
H	-0.17162300	-4.39096300	1.26833400
N	0.54324500	-0.52477000	1.14831400
N	2.05912800	0.64767800	-0.21085700
O	-1.73883500	2.91125300	-0.89162700
O	0.04179900	-0.97753200	-1.15467600
O	-0.73919100	-4.07959400	0.54616700
H	-1.02909700	-3.10618000	0.75600400
H	-0.13656900	-3.83978600	-0.63834200
H	-0.41854500	-0.44246000	-1.84196700
O	0.23029400	-3.39058700	-1.58479400
H	0.13092600	-2.29218100	-1.43540300
H	1.16366600	-3.61851600	-1.73095100
F	-2.69014400	0.26956500	-0.48160500
Cl	-1.82315800	1.36530000	1.69380200
O	-1.38916800	-1.63995800	0.68016100
H	0.33532800	-0.77644600	2.10805400
Cl	3.70930500	1.09950200	-0.48369600
O	2.46435500	0.30642200	2.04554100
H	0.10803300	2.00112400	-0.59505300
O	-0.89603400	1.28622900	-2.20040300
H	-1.79599900	1.40268200	-2.55662400
H	-1.98543800	3.15628300	0.01692200
H	1.70606800	0.07300900	-0.97473900

11

C	0.04348700	0.63960300	0.30015300
---	------------	------------	------------

C	1.43856100	0.00925500	0.10665700
C	-1.09039300	-0.40241000	0.13346300
O	-2.30022100	0.22393800	0.39031700
F	-0.01568200	1.14866400	1.56952900
Cl	-0.13052700	2.00161700	-0.86693200
O	2.32434700	0.11120200	0.93305600
H	-1.03372000	-0.83191300	-0.87035000
O	-0.83262800	-1.47747800	1.02026000
H	-0.96571100	-1.14185800	1.92475600
H	-3.02229200	-0.31715800	0.00502100
O	1.52820700	-0.64012600	-1.04947000
H	2.44261200	-1.03584700	-1.11782700
O	4.08800700	-1.40112000	-0.64478700
H	3.94619300	-0.92671300	0.19988400
H	4.36712300	-2.30126400	-0.41861600
O	-4.30847900	-1.35076500	-0.77570200
H	-5.11003200	-0.89811100	-1.08054200
H	-4.60787200	-2.11648800	-0.26127200