

Priprava i karakterizacija intermedijera C u sintezi lijeka eltrombopaga

Zahirović, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:158852>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Ema Zahirović

669/BPI

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA
INTERMEDIJERA C U SINTEZI
LIJEKA ELTROMBOPAGA**

Rad je izrađen u PLIVI Hrvatska d.o.o. na odjelu za Unaprjeđenje tehnoloških procesa i podrška proizvodnji i u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom *prof.dr.sc.* Jagode Šušković, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć neposrednog voditelja *dr.sc.* Kreše Mihaljevića.

ZAHVALA

Zahvaljujem dr.sc. Kreši Mihaljeviću na ukazanom povjerenju, dopuštenju za izradu diplomskog rada na odjelu Unaprjeđenje tehnoloških procesa i podrška proizvodnji, PLIVA Hrvatska, d.o.o. te vodstvu i savjetima tijekom izrade rada.

Zahvaljujem Ljubomiru Torbici, dipl.ing. i Petri Dabić, mag.chem. na stručnom vodstvu, pruženom znanju, susretljivosti, trudu i uloženom vremenu.

Hvala mentorici prof.dr.sc. Jagodi Šušković i prof.dr.sc. Blaženki Kos na izrazitoj ljubaznosti i susretljivosti te na korisnim savjetima prilikom konačne obrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljima i kolegama.

Veliko hvala mojoj obitelji, na svemu pruženom tokom odrastanja i školovanja, bezuvjetnoj ljubavi i potpori. Bez vas ne bih bila tu gdje jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA INTERMEDIJERA C U SINTEZI LIJEKA ELTROMBOPAGA

Ema Zahirović, 669/BPI

Sažetak:

Eltrombopag je lijek koji pripada skupini trombopoetin receptor agonista i koristi se za liječenje kronične imunološke trombocitopenije. Cilj ovog rada bio je razviti proces za sintezu i izolaciju intermedijera C koje će se koristiti kao standard za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC), pri određivanju kromatografske čistoće intermedijera C u sintezi lijeka eltrombopaga. Istražena je učinkovitost Raney nikal i natrijeva ditionita kao katalizatora na hidriranje spoja BPCA-4 (5'-kloro-2'-hidroksi-3'-nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina) u svrhu odabira katalizatora kojim će se dobiti viši prinos i odgovarajuća kromatografska čistoća. Sinteza intermedijera C primjenom natrijevog ditionita kao katalizatora pokazala se kao neučinkovita metoda zbog nezadovoljavajuće kromatografske čistoće produkta (59,99 %) i malog prinosa (26,74 %). Raney nikal se pokazao učinkovitijim katalizatorom za sintezu intermedijera C pa su sva naredna istraživanja provedena s ovim katalizatorom.

Uzorak ELTC-1612 može poslužiti kao standard za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) pri određivanju kromatografske čistoće tijekom industrijske sinteze lijeka eltrombopaga.

Ključne riječi: *eltrombopag, intermedijer C, standard, HPLC, hidriranje*

Rad sadrži: 42 stranice, 7 slika, 13 shema, 7 tablica, 24 literaturnih navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Jagoda Šušković*

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Krešo Mihaljević*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. Prof.dr.sc. Jagoda Šušković
3. Izv. prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo (zamjena)

Datum obrane: 22. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF INTERMEDIATE C IN THE SYNTHESIS OF DRUG ELTROMBOPAG

Ema Zahirović, 669/BPI

Abstract:

Drug eltrombopag is a thrombopoietin agonist receptor for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. It is necessary to develop a process for the synthesis and isolation of intermediate C to be used as a standard for high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the chromatographic purity of intermediate C in the synthesis of the drug eltrombopag. Efficiency of Raney nickel and sodium dithionite catalyst is tested on the hydrogenation compound BPCA-4 and the optimal catalyst is selected that produces a high yield of the corresponding chromatographic purity. Synthesis of intermediate C by using sodium dithionite as a catalyst proved to be an ineffective method due to unsatisfactory chromatographic product purity (59.99 %) and low yield (26.74 %). Raney nickel proved to be more efficient catalyst for the synthesis of intermediate C so all subsequent studies conducted with this catalyst. Sample ELTC-1612 can serve as a standard for high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of chromatographic purity for the industrial synthesis of the drug eltrombopag.

Keywords: eltrombopag, intermediate C, standard, HPLC, hydrogenation

Thesis contains: 42 pages, 7 figures, 13 schemes, 7 tables, 24 references, 3 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Jagoda Šušković, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Krešo Mihaljević*

Reviewers:

1. PhD. Blaženka Kos, Full professor
2. PhD. Jagoda Šušković, Full professor
3. PhD. Višnja Gaurina Srček, Associate professor
4. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor/Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 22 September 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SINTETSKI PUT ELTROMBOPAG OLAMINA.....	2
2.2. SINTETSKI PUT BPCA	4
2.3. ONEČIŠĆENJA U SINTEZI 3'-AMINO-2'-HIDROKSI-[1,1'-BIFENIL]-3- KARBOKSILNE KISELINE (BPCA).....	6
2.3.1. Onečišćenja iz polaznih sirovina	6
2.3.2. Procesna onečišćenja prve faze sinteze.....	7
2.3.3. Procesna onečišćenja druge faze.....	7
2.3.4. Procesna onečišćenja treće faze	8
2.4. SINTEZA INTERMEĐIJERA C	11
2.5. KATALIZATORI KORIŠTENI U SINTEZI INTERMEĐIJERA C	12
2.5.1. Natrijev ditionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)	12
2.5.2. Raney nikal	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.2. OPREMA I APARATURA.....	17
3.3. METODE PRIPRAVE I IZOLACIJE INTERMEĐIJERA C- REPREZENTATIVNE ŠARŽE.....	18
3.3.1. Hidriranje BPCA-4 Raney nikal katalizatorom	18
3.3.2. Bazno-kisela prekrizacija uzorka ELTC-1607/9 na povišenoj temperaturi	21
3.3.3. Prekrizacija uzorka ELTC-1611 u vodi na sobnoj temperaturi.....	22
3.4. METODE PRIPRAVE I IZOLACIJE INTERMEĐIJERA C- NEREPREZENTATIVNE ŠARŽE.....	23
3.4.1. Sintaza intermedijera C natrijevim ditionitom ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) – ELTC-1601	23
3.4.2. Hidriranje BPCA-4 sa Raney nikal katalizatorom - ELTC-1603	24

3.4.3. Kiselo-bazna prekrizacija uzorka ELTC-1603 u uzorak ELTC-1604	25
3.4.4. Kiselo-bazna prekrizacija uzorka ELTC-1604 u uzorak ELTC-1605	26
3.4.5. Bazno-kisela prekrizacija uzorka ELTC-1604 u uzorak ELTC-1606.....	26
3.5. ANALITIČKE METODE	27
3.5.1. Određivanje koncentracije intermedijera C pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. REPREZENTATIVNE ŠARŽE	28
4.1.1. Sintaza reprezentativnih laboratorijskih šarži (ELTC-1607 i ELTC-1609).....	29
4.2. NEREPREZENTATIVNE ŠARŽE.....	37
5. ZAKLJUČCI:	40
6. LITERATURA.....	41
7. PRILOZI.....	

1. UVOD

Eltrombopag je lijek koji pripada skupini trombopoetin receptor agonista. Koristi se za liječenje kronične imunološke trombocitopenije (ITP), bolesti u kojoj smanjeni broj trombocita u krvi može predispozirati krvarenje. Koristi se i za povećanje broja trombocita kod pacijenata koji boluju od hepatitisa C te za liječenje aplastične anemije. Eltrombopag djeluje kao hormon rasta stanica trombocita u koštanoj srži (Kuter i sur. 2009).

Tijekom procesa proizvodnje lijeka eltrombopaga potrebno je razviti proces za sintezu i izolaciju intermedijera C hidriranjem spoja 5'-kloro-2'-hidroksi-3'-nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilne kiseline (BPCA-4). U ovom radu istražena je učinkovitost dva različita katalizatora (natrijev ditionit i Raney nikal) i odabran je katalizator kojim se dobiva visoki prinos i odgovarajuća kromatografska čistoća. Natrijev ditionit se koristi za redukciju mnogih skupina poput nitro, nitrozo spojeva, ketona i mnogih drugih (Khurana i sur., 1996, Hughes 1996), dok se Raney nikal koristi za selektivnu redukciju nitro spojeva, *O*- i *N*- benzil nitro spojeva, za pretvorbu nitro olefina u karbonilne derivate i za sintezu halo-amina iz halo-nitro spojeva (Monti i sur., 1983).

Nakon hidriranja, uzorak intermedijera C izolira se kristalizacijom, a zatim mu se odredi kromatografska čistoća pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

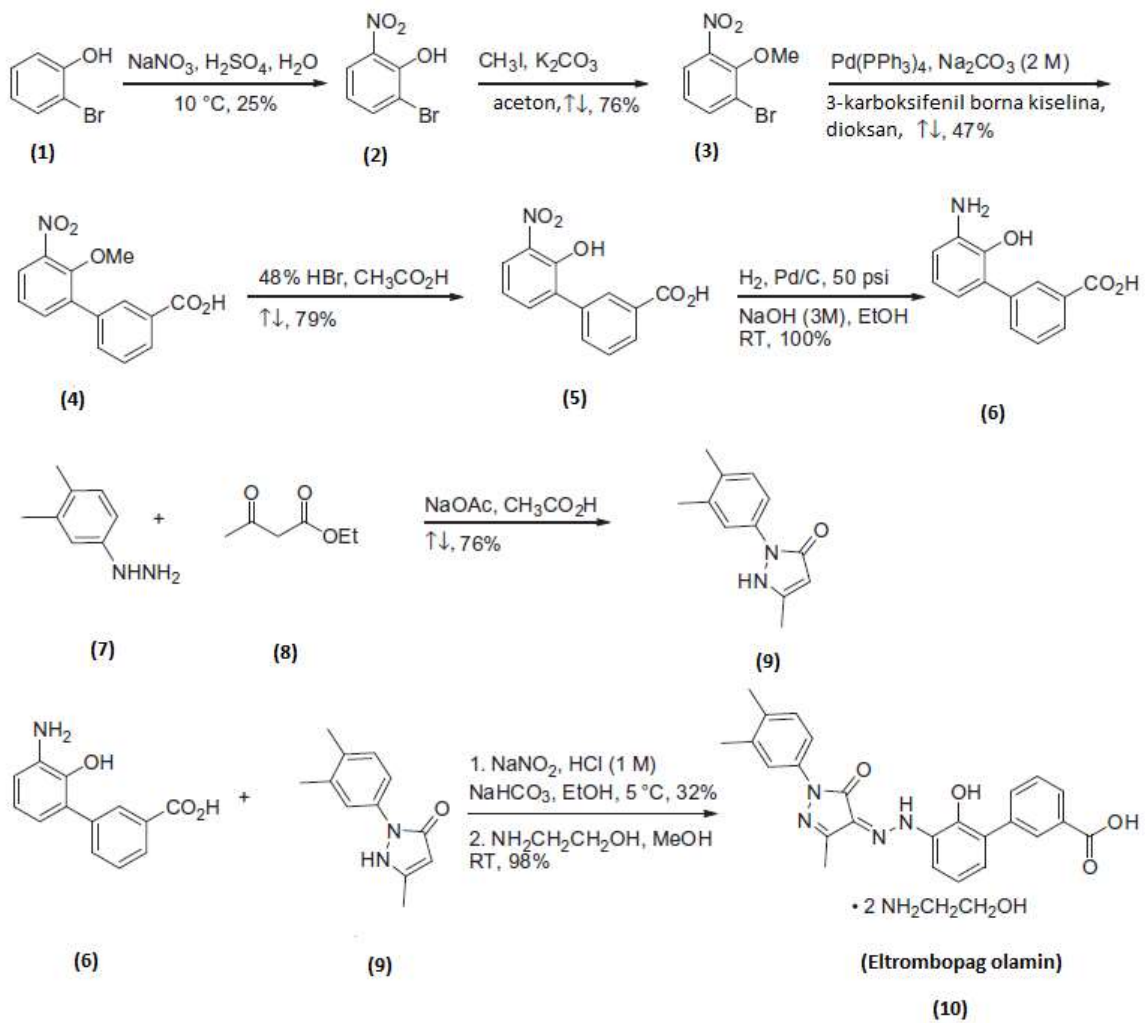
Stoga je cilj ovog rada bio priprava i karakterizacija 3'-amino-5'-kloro-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilne kiseline, koja će se koristiti kao standard za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC), pri određivanju kromatografske čistoće intermedijera tijekom sinteze eltrombopaga. Ovaj spoj predstavlja jedno od glavnih onečišćenja koja se javljaju prilikom sinteze ovog lijeka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SINTETSKI PUT ELTROMBOPAG OLAMINA

Trombopoetin receptor agonist, eltrombopag olamin, odobren je 2008. godine u SAD-u pod nazivom Promacta, a 2010. godine u EU pod nazivom Revonade, za kratkotrajnu i dugotrajnu oralnu upotrebu kod odraslih pacijenata prethodno liječenih od kronične idiopatske trombocitopenične purpore. Lijek je registriran u oralnom obliku *bis*-monoetanolamin (Olatin) soli. Aktivna molekula je mala i ima smanjeni potencijal izazivanja reakcije imunološkog sustava u usporedbi sa alternativnim terapijama baziranim na proteinima. Put sinteze prikazan je na Shemi 1 (Liu i sur., 2011, Corman i sur. 2010).

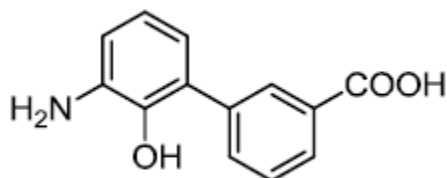
Sinteza počinje nitriranjem 2-bromofenola (1) s natrijevim nitratom i sumpornom kiselinom u vodi na 10 °C, čime se dobije 2-bromo-6-nitrofenol (2) s iskorištenjem od 25 %. Spoj 2 se metilira metil jodidom uz kalijev karbonat u refluksirajućem acetonu. Produkt reakcije je 2-bromo-6-nitroanisol (3) s iskorištenjem od 76 %. Suzuki reakcija spoja (1) s 3-karboksifenil bornom kiselinom sa Pd(PPh₃)₄ i 2 M natrijevim karbonatom nastaje 2'-metoksi-3'-nitrobifenil-3-karboksilna kiselina (4) s iskorištenjem od 47% u obliku žuto-smeđeg praha. Demetiliranje u refluksirajućoj octenoj kiselini s 48%-tnim HBr-om (aq.) rezultiralo je 2'-hidroksi-3'-nitrobifenil-3-karboksilnom kiselinom (5) u prinosu od 79%. Nitro skupina spoja (5) reducira se katalitičkim hidriranjem, pri tlaku od 50 psi na sobnoj temperaturi uz Pd/C u smjesi etanola i 3 M vodene otopine NaOH. Produkt reakcije je 3'-amino-2'-hidroksibifenil-3-karboksilna kiselina (6) u kvantitativnom iskorištenju. Međuprodukt (9) 1-(3,4 -dimetilfenil)-3-metil-2,5-dihidro-(1*H*)-pirazol-5-on, dobije se kondenzacijom (3,4-dimetilfenil)hidrazina (7) s natrijevim acetatom (8) u refluksu octene kiseline u 76%-tnom prinosu. Dodatkom natrijeva nitrita spoju 6 u 1 M HCl-a pri 5 °C, slijedi kondenzacija s 1-(3,4-dimetilfenil)-3-metil-2,5-dihidro-(1*H*)-pirazol-5-on-om (9), pri pH=7-8. Dodavanjem natrijevog bikarbonata i etanola u reakcijsku smjesu dobiva se eltrombopag u 32%-tnom prinosu. U konačnici, eltrombopag se tretira sa hidroksil-etil aminom kako bi se dobio eltrombopag olamin (10) (Liu i sur., 2011, Delorme i sur., 2002).



Shema 1. Sintetski put eltrombopag olamina (Liu i sur., 2011).

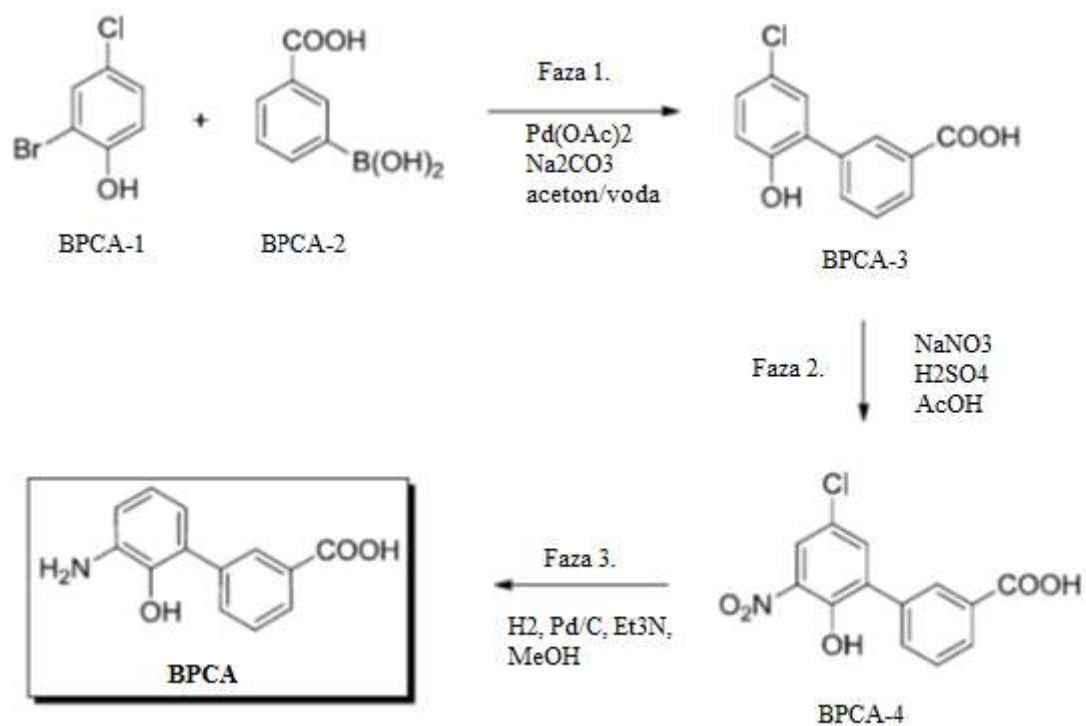
2.2. SINTETSKI PUT BPCA

Ključni međuprodukt u sintezi eltrombopaga (EBP) je 3'-amino-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina (BPCA). Kemijska struktura prikazana je na Slici 1 (Avdagic i sur., 2013).



Slika 1. Kemijska struktura BPCA (Avdagic i sur., 2013).

Sinteza BPCA odvija se u tri faze, kako je prikazano na Shemi 2. U prvoj fazi odvija se Suzuki reakcija 2-bromo-4-klorofenola (BPCA-1) i 3-boronobenzojeve kiseline (BPCA-2), a produkt je 5'-kloro-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina (BPCA-3). U fazi 2 BPCA-3 se nitrira u 5'-kloro-2'-hidroksi-3' nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilnu kiselinu (BPCA-4). U posljednjoj fazi BPCA-4 se dehalohidrira u 3'-amino-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilnu kiselinu (BPCA) (Avdagic i sur., 2013).



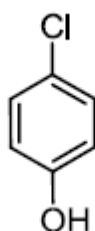
Shema 2. Sinteza 3'-amino-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karbokisilne kiseline (BPCA)
(Avdagic i sur., 2013).

2.3. ONEČIŠĆENJA U SINTEZI 3'-AMINO-2'-HIDROKSI-[1,1'-BIFENIL]-3-KARBOKSILNE KISELINE (BPCA)

2.3.1. Onečišćenja iz polaznih sirovina

2.3.1.1. 4-klorofenol

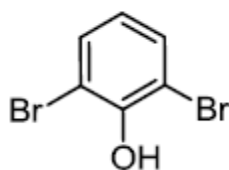
4-klorofenol je onečišćenje koje se javlja u polaznoj sirovini BPCA-1, struktura je prikazana na Slici 2 (Avdagic i sur., 2013).



Slika 2. Kemijska struktura 4-klorofenola (Avdagic i sur., 2013).

2.3.1.2. 2,6-dibromofenol

2,6-dibromofenol je onečišćenje koje se javlja u polaznoj sirovini BPCA-1, struktura je prikazana na Slici 3 (Avdagic i sur., 2013).

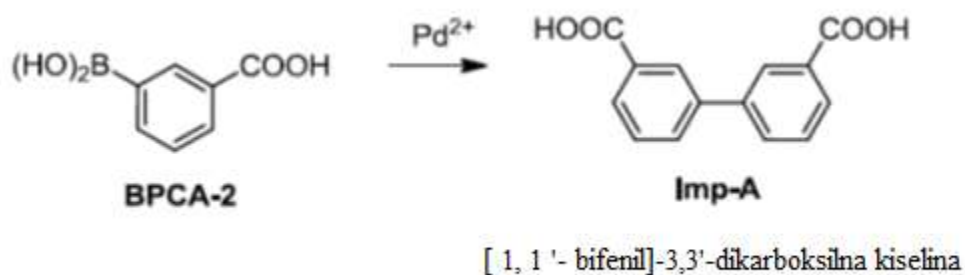


Slika 3. Kemijska struktura 2,6-dibromofenola (Avdagic i sur., 2013).

2.3.2. Procesna onečišćenja prve faze sinteze

2.3.2.1. [1,1'-bifenil]-3,3'-dikarboksilna kiselina (Imp-A)

Onečišćenje A nastaje u sintezi BPCA-3 kao rezultat homokopulacijske reakcije BPCA-2 katalizirane paladijem (Avdagic i sur., 2013). Reakcija je prikazana na Shemi 3.

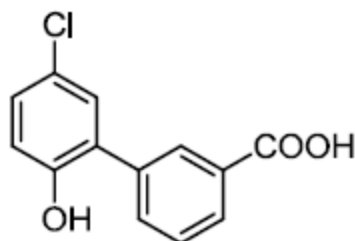


Shema 3. Shematski prikaz homokopulacijske reakcije BPCA-2 katalizirane paladijem (Avdagic i sur., 2013).

2.3.3. Procesna onečišćenja druge faze

2.3.3.1. 5'-kloro-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina (BPCA-3)

BPCA-3 je polazni materijal druge faze, struktura je prikazana na Slici 4 (Avdagic i sur., 2013).

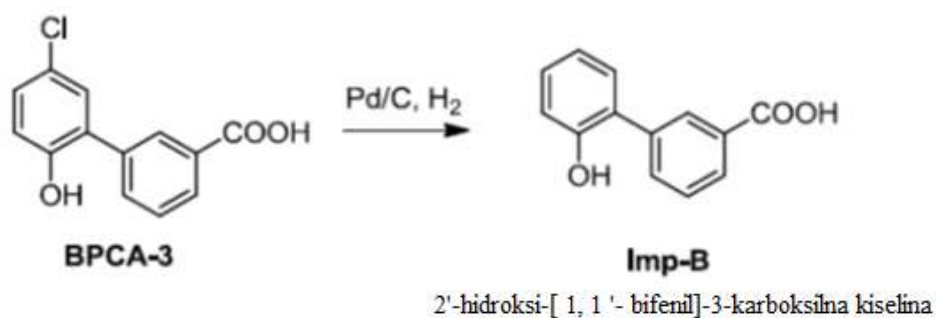


Slici 4. Kemijska struktura BPCA-3 (Avdagic i sur., 2013).

2.3.4. Procesna onečišćenja treće faze

2.3.4.1. 2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina (Imp-B)

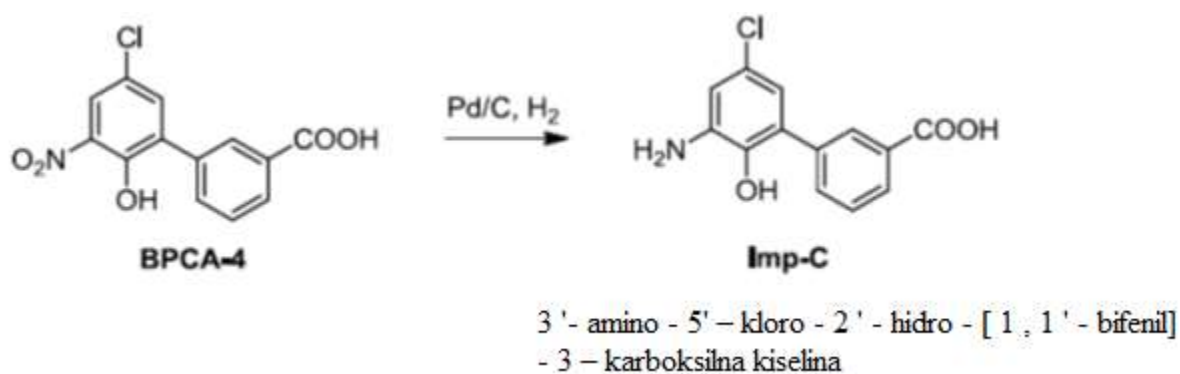
Onečišćenje B nastaje hidriranjem BPCA-3, reakcija je prikazana na Shemi 4 (Avdagic i sur., 2013).



Shema 4. Onečišćenje B nastaje hidriranjem BPCA-3 (Avdagic i sur., 2013).

2.3.4.2. 3'-amino-5'-kloro-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina (ImpC)

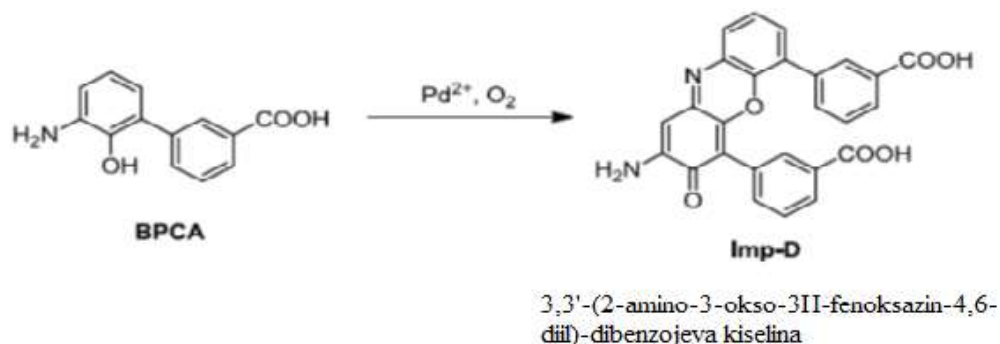
Onečišćenje C je intermedijer u trećoj fazi, a nastaje redukcijom nitro skupine spoja BPCA-4 u amino skupinu. Reakcija je prikazana na Shemi 5 (Avdagic i sur., 2013).



Shema 5. Nastajanje intermedijera C redukcijom nitro skupine spoja BPCA-4 u amino skupinu
(Avdagic i sur., 2013).

2.3.4.3. 3,3'-(2-amino-3-okso-3H-fenoksazin-4,6-diil)-dibenzojeva kiselina (Imp-D)

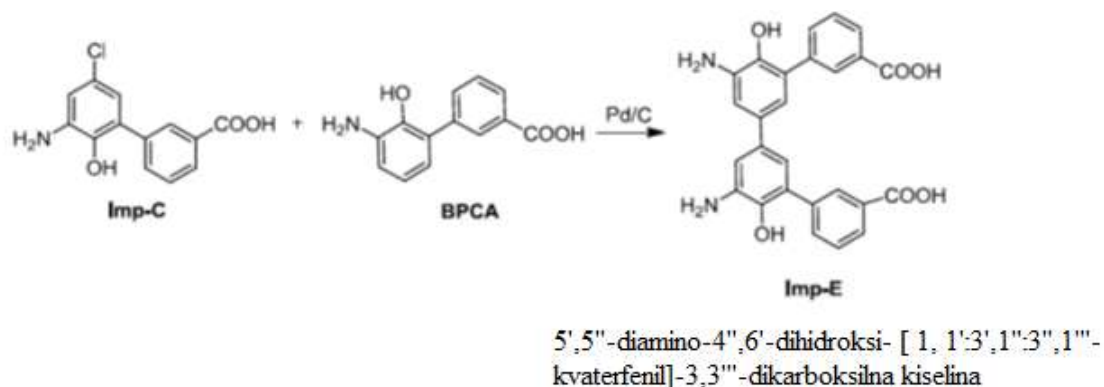
Onečišćenje D nastaje oksidativnom dehidrogenacijom kataliziranom paladijem, kako je prikazano na Shemi 6 (Avdagic i sur., 2013). Ovo onečišćenje ne nastaje u inertnoj atmosferi (H_2 , N_2 ili vakuum), niti bez prisustva katalizatora.



Shema 6. Oksidativna dehidrogenacija BPCA katalizirana paladijem (Avdagic i sur., 2013).

2.3.4.4. 5',5''-diamino-4'',6'-dihidroksi-[1,1':3',1''':3'',1''''-kvaterfenil]-3,3'''-dikarboksilna kiselina (Imp-E)

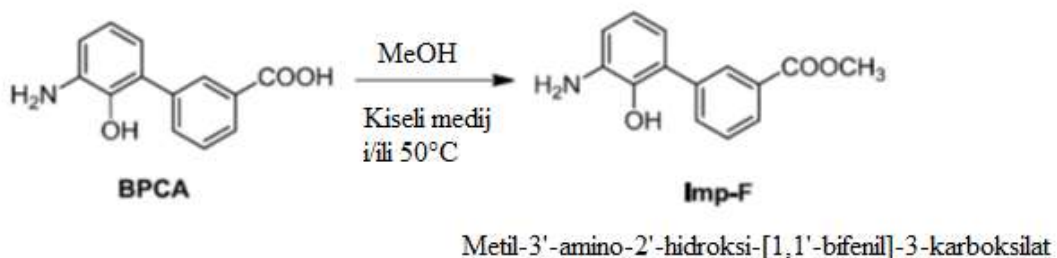
Onečišćenje E (BPCA-dimer) nastaje u reakciji BPCA i intermedijera katalizirano paladijem, kako je prikazano na Shemi 7 (Avdagic i sur., 2013).



Shema 7. Onečišćenje E nastaje u reakciji BPCA i intermedijera C, katalizirano paladijem (Avdagic i sur., 2013).

2.3.4.5. Metil-3'-amino-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilat (*Imp-F*)

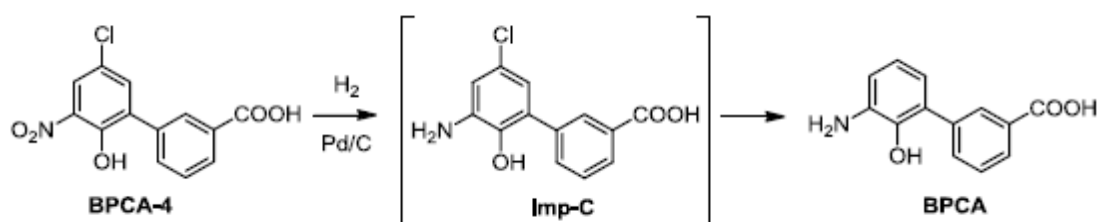
Onečišćenje F je metilni ester BPCA koji nastaje hidriranjem u metanolu, u kiselim uvjetima i pri visokoj temperaturi (50 °C), kako je prikazano na Shemi 8 (Avdagic i sur., 2013).



Shema 8. Onečišćenje F nastaje hidriranjem u metanolu, u kiselim uvjetima i pri visokoj temperaturi (50 °C), (Avdagic i sur., 2013).

2.4. SINTEZA INTERMEDIJERA C

BPCA se sintetizira hidriranjem BPCA-4 uz paladij katalizator. Reakcija se odvija u dva stupnja, prvi i brzi stupanj je redukcija nitro u amino skupinu i formiranje intermedijera C (Imp-C). U drugom, sporijem stupanju dolazi do uklanjanja skupine klora sa intermedijera C u BPCA. To je prikazano na Shemi 9 (Avdagic i sur., 2013). U ovom radu, cilj je provesti samo prvu reakciju redukcije nitro skupine sa Raney nikal i natrijevim ditionitom kao katalizatorom. Reakcija se provodi u svrhu sinteze intermedijera C što veće kromatografske čistoće, u što većem prinosu.



Shema 9. Nastajanje intermedijera C u sintezi BPCA iz BPCA-4 (Avdagic i sur., 2013).

2.5. KATALIZATORI KORIŠTENI U SINTEZI INTERMEDIJERA C

2.5.1. Natrijev ditionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

U potrazi za odgovarajućim katalizatorom, koji bi bio pouzdan, jeftin, netoksičan, neutralan, ne-nukleofilan i specifičan za redukciju nitro-spojeva u prisutnosti dugih funkcionalnih grupa, provedeno je istraživanje sa natrijevim ditionitom, molekulske formule $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. To je svestran reagens za redukciju mnogih skupina poput nitro, nitrozo spojeva, ketona i mnogih drugih (Khurana i sur., 1996, Park i sur., 1993).

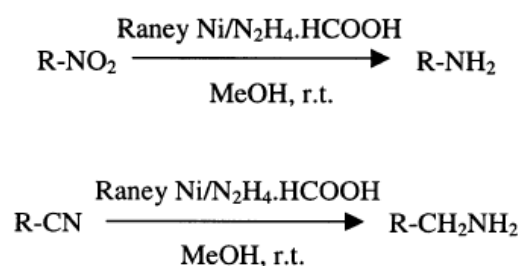
Najveća učinkovitost natrijeva ditionita je na temperaturama nižim od $50\text{ }^\circ\text{C}$, zbog raspada na višim temperaturama i u vodi zbog netopivosti u organskim otapalima (Scheuerman i sur., 2000).

2.5.2. Raney nikal

Brza i selektivna redukcija nitro skupina od velike je važnosti u pripravi amino derivata u organskoj sintezi, posebice u prisutnosti drugih skupina koje se mogu reducirati (Ehernkauffer i sur., 1984, Lyle i sur., 1974). Razvijen je velik broj reagensa za redukciju aromatskih nitro spojeva, međutim, malo pažnje je posvećeno redukciji alifatskih nitro spojeva, koji se obično reduciraju pri visokom tlaku (Larock, 1989, Akita i sur., 1977, Borah i sur., 1994). Mnoge od tih metoda imaju znatne nedostatke, a najveći je problem prisutnost drugih skupina u molekuli koje se mogu reducirati. Povrh toga, primjećena je loša selektivnost redukcije aromatskih nitro spojeva koji imaju karbonilnu ili halogensku skupinu. Stoga su ispitane različite metode kako bi se poboljšala redukcija, uz očuvanje karbonilne, halogenske ili druge osjetljive funkcionalne skupine (Gowda i sur., 2002, Romas i sur., 1984).

Klasične metode redukcije imaju mnoge nedostatke: (I) zahtijevaju vrlo kiseli/lužnati medij, (II) zahtijevaju visoko difuzivni i zapaljivi vodik i skupu visokotlačnu opremu, (III) prinosi su relativno mali, a mogućnost primjene u laboratorijskom mjerilu je vrlo slaba, (IV) homogeno katalitičko hidriranje zahtijeva skupe katalizatore, (V) obrada i izolacija produkta je složena, (VI) heterogeno katalitičko hidriranje zahtijeva skupe kemikalije ili metale poput paladija, platine i drugih koji zahtijevaju posebno rukovanje zbog zapaljivosti u prisutnosti zraka (Gowda i sur., 2002).

Raney nikal rutinski se koristi kao katalizator u katalitičkim hidriranjima (Rylander, 1985, House, 1997), posebice u heterogenim katalitičkim hidriranjima (Yuste i sur., 1982). Koristi se za selektivnu redukciju nitro spojeva, *O*- i *N*- benzil nitro spojeva, za pretvorbu nitro olefina u karbonilne derivate i za sintezu halo-amina iz halo-nitro spojeva (Monti i sur., 1983, Osuka i sur., 1983). U svakom od slučaja donori vodika je hidrazin hidrat, amonijev formijat, mravlja kiselina i cikloheksan. Gowda i suradnici razvili su metodu za brzu i jednostavnu redukciju alifatskih i aromatskih nitro spojeva te nitrila u odgovarajuće amino derivate koristeći Raney nikal i hidrazinij monoformijat, pri sobnoj temperaturi, kako je prikazano na Shemi 10. Ova metoda selektivno reducira nitro i nitril spojeve u odgovarajuće amine (Gowda i sur., 2002).



Shema 10: R=alkil i aril ostatak supstituiran sa -OH, OR, -CO₂H, -CO₂R, -CONH₂, -NHCOCH₃; alifatski i aromatski nitro spojevi i nitrili mogu se reducirati u odgovarajuće amino derivate koristeći Raney nikal i hidrazinij monoformijat kao katalizator (Gowda i sur., 2002).

Alifatski i aromatski nitro spojevi selektivno se mogu reducirati u pripadajuće amino derivate s velikim prinosom uz Raney nikal katalizator u mravljoj kiselini kao otapalo, pri sobnoj temperaturi. Ovakav sustav je prikladan za očuvanje sljedećih skupina: halogeni, -OH, -OCH₃, -CHO, -COCH₃, -COC₆H₅, -COOH, -COOEt, -CONH₂, -CN, -CH=CH-COOH i -NHCOCH₃. Reakcija se može odvijati u mravljoj kiselini (HCOOH), ali i amonijevom formijatu (HCOONH₄), uz gotovo isti prinos (Gowda i sur., 1999). Rezultati ovog istraživanja prikazana su u Tablici 1 (Gowda i sur., 2002).

Tablica 1. Rezultati istraživanja, kojeg su proveli Gowda i suradnici (2002), prikazuju selektivnu redukciju alifatskih i aromatskih nitro spojeva u pripadajuće amino derivate uz veliki prinos.

Br.	Nitro spoj	Reakcijsko vrijeme (minute)		Produkt	Prinos
		HCOOH	HCOONH ₄		
01	Nitrometan	5	10	Metilamin HCl	45%
02	Nitroetan	10	15	Etilamin HCl	50%
03	1-nitropropan	10	15	<i>n</i> -propilamin HCl	55%
04	1-nitrobutan	8	10	<i>n</i> -butilamin HCl	60%
05	2-nitroetil etanoat	8	10	2-aminoetil etanoat	65%
06	1-nitrometil butanoat	10	10	1-aminometil butanoat	80%
07	Nitrobenzen	20	30	Anilin	90%
08	<i>o,m,p</i> -nitrofenol	10-15	15-20	<i>o,m,p</i> -aminofenol	85-90%
09	2,4-dinitrofenol	15	20	2,4-diaminofenol	90%
10	<i>o,m,p</i> -nitrotoluen	15-20	20-25	<i>o,m,p</i> -aminotoluen	89-91%
11	1,4-dinitrobenzen	10	15	2,4-diaminotoluen	90%
12	<i>o,m</i> -dinitrobenzen	10-15	15-20	<i>o,m</i> -fenilenediamin	86-90%
13	1,2-nitronaftalen	5-10	10-15	1,2-naftilamin	88-90%
14	<i>o,p</i> -nitroanisol	8-10	5-10	<i>o,p</i> -aminoanisol	89-90%
15	<i>o,m,p</i> -nitroanilin	5-10	5-10	<i>o,m,p</i> -fenilenediamin	91-92%
16	<i>o,p</i> -nitrobenzaldehyd	10-15	10-20	<i>o,p</i> -aminobenzaldehyd	89-90%
17	<i>o,p</i> -nitroacetofenon	10-15	10-20	<i>o,p</i> -aminoacetofenon	90-92%
18	<i>p</i> -nitrobenzofenon	20	25	<i>p</i> -aminobenzofenon	90%
19	<i>p</i> -nitrobenzamid	20	20	<i>p</i> -aminobenzamid	90%
20	<i>p</i> -nitrofenilacetat	10	15	<i>p</i> -aminofeniacetat	91%
21	<i>o,m,p</i> -nitrobenzojeva kiselina	15-20	20-25	<i>o,m,p</i> -aminobenzojeva kiselina	90-92%
22	<i>o,m,p</i> -nitroklorobenzen	15-20	20-25	<i>o,m,p</i> -kloroanilin	90-92%
23	<i>o,m,p</i> -nitrobromobenzen	15-20	20-25	<i>o,m,p</i> -bromoanilin	91-92%
24	<i>m</i> -nitroiodobenzen	10	10	<i>m</i> -jodoanilin	89%
25	<i>p</i> -nitrocinamična kiselina	10	15	<i>p</i> -aminocinamična kiselina	90%
26	<i>p</i> -nitrobenzonitril	20	25	<i>p</i> -aminobenzonitril	92%
27	<i>p</i> -Nitrofenilacetonitril	20	25	<i>p</i> -aminofenilacetonitril	91%
28	<i>p</i> -nitrofenetilalkohol	20	25	<i>p</i> -aminofenetilalkohol	90%
29	3,5-dinitrosalicilna kiselina	15	20	3,5-diaminosalicilna kiselina	89%
30	<i>p</i> -nitroacetanilid	10	15	<i>p</i> -aminoacetanilid	90%

Glavne prednosti ove metode su: (I) selektivna redukcija nitro skupine u prisutnosti drugih skupina, (II) velika dostupnost i laka operativnost, (III) brza redukcija, (IV) veliki prinosi, (V) izbjegavanje jako kiselih medija, (VI) nepotrebna aparatura za visoki tlak, (VII) niska cijena. Prema tome ova metoda se može koristiti u procesima koji zahtijevaju brzu, blagu i selektivnu redukciju (Gowda i sur., 1999).

Kada se hidriranje želi provesti u laboratorijskim uvjetima u staklenoj aparaturi i pri sobnoj temperaturi, obično se koristi platina ili paladij katalizator. Međutim, razvojem metode za sintezu Raney nikal katalizatora moguće je provesti hidriranje na višim temperaturama i pri višim tlakovima, uz istu ili bolju efikasnost od platine ili paladij katalizatora. To ne znači da bilo kojem od ta tri katalizatora nedostaje karakteristika koja ga čini posebno korisnim. Tako na primjer inaktivnost paladija prema benzenskim prstenima, nitrilima i aldehidima čini ovaj katalizator posebno korisnim u selektivnim hidriranjima (Homera, 1948). Aktivnost Raney nikla pod blagim uvjetima prepoznata je u istraživanjima provedenim sa stirenom, acetonom, mesitil oksidom te acetoacetat esterom, pri niskom tlaku i sobnoj temperaturi (Homera, 1948).

Provedena su istraživanja o učinkovitosti Raney nikla sa i bez platinskog promotora, posebice za hidriranje nitro spojeva. Međutim, pokazalo se da dostupni Raney nikal katalizator nije pokazao veliku učinkovitost pri sobnoj temperaturi, osim pri hidriranju alkenkih veza. Posebno pripremljeni W-6 Raney nikal katalizator pokazao je dobru učinkovitost i pri blagim uvjetima. Unatoč tome, pokazalo se da je obični Raney nikal katalizator učinkovitiji pri visokim tlakovima i temperaturama. Dodatak male količine trietilamina u reakcijsku smjesu pokazalo je da se značajno povećava učinkovitost hidriranja sa običnim Raney nikal katalizatorom (Homera, 1948).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kemikalije korištene u ovom radu prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Popis kemikalija korištenih u istraživanju.

KEMIKALIJE	KONTROLNI BROJ	PROIZVOĐAČ
5'-kloro-2'-hidroksi-3'-nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina (BPCA-4)	R&D NBP-21/04/12-13	Royal Pharma, India
Trietilamin	6838045	Pliva
10%-tna HCl	45021213	Pliva
10%-tna NaOH	36391113	Pliva
Deionizirana voda	-	Merck Millipore, Pliva
Vodik	52846900	Messer
Dušik	UN1066	Messer
Raney nikal vlažni katalizator	DM00609	BASF Actimel M
Natrijev ditionit	6844085	Pliva
Acticarbon S	6832030	Pliva
Acetonitril Ultra gradient HPLC Grade	1601308004	J.T. Baker
0.1% fosforna kiselina za HPLC	CIBFJ157V	J.T. Baker

3.2. OPREMA I APARATURA

U ovom radu, uz laboratorijsko posuđe, korištena je oprema i aparatura prikazana u Tablici 3.

Tablica 3. Oprema i aparatura korištena u istraživanju.

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ
Büchiglasuster reaktor s pripadajućom kontrolnom jedinicom (V=1,1 L)	Büchi AG, Switzerland
Inlabo Cryo termostat	Inlabo
Acquity UPLC class Quaternary Solvent Manager	Waters
Ultrazvučna kupka Sonorex	Bandelin
Vakuum sušnica	Kambič
Uređaj za filtraciju vode Millipore Elix SDS 200 Tank+Pump	Merck Millipore
Prijenosni pH-metar	Mettler Toledo
Magnetska miješalica	IKA RCT
Tehnička vaga	Sartorius
Elektromotor Eurostar 40 digital	IKA

3.3. METODE PRIPRAVE I IZOLACIJE INTERMEDIJERA C-REPREZENTATIVNE ŠARŽE

3.3.1. Hidriranje BPCA-4 Raney nikal katalizatorom

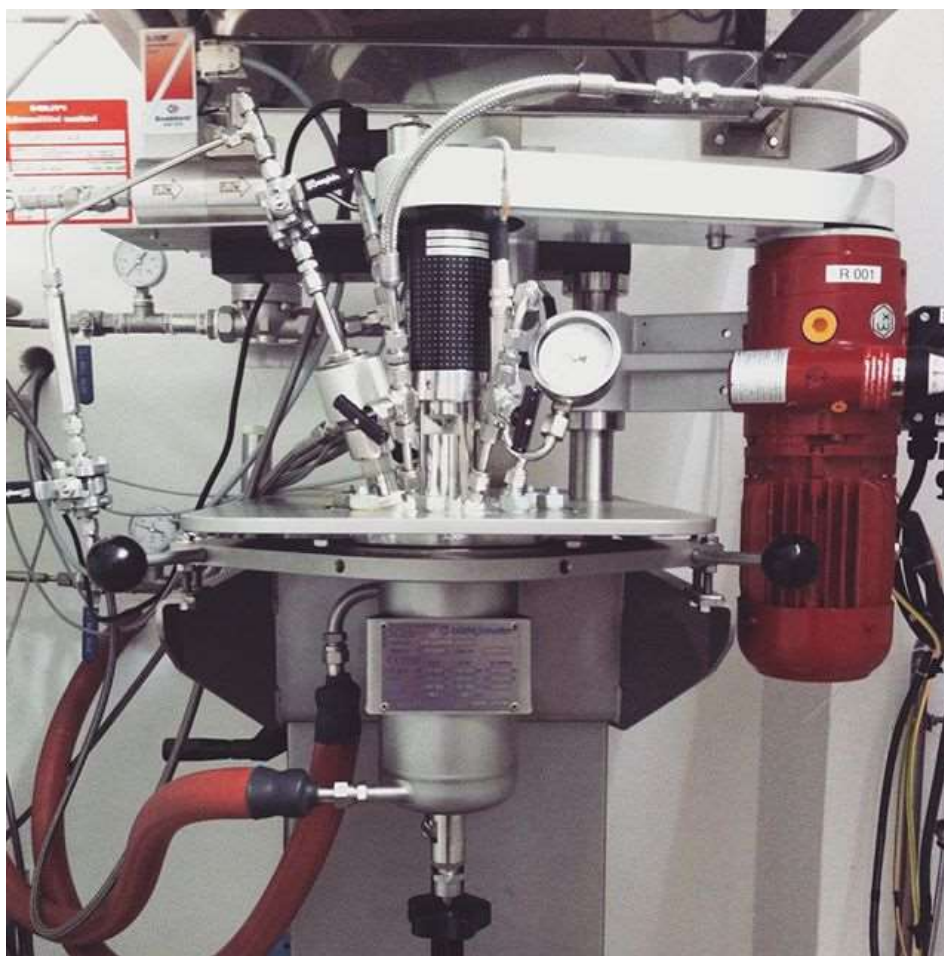
U hidrogenator Büchi (Slika 5) volumena 1,1 L (opremljenim mehaničkom miješalicom, plaštem za grijanje i hlađenje, dovodom i odvodom vodika i dušika, kontrolom tlaka, temperature i protoka, plinova) šaržirani su BPCA-4 (40,0 g, KB. NBP-21/04/12-13), RaNi katalizator (8,0 g vlažnog katalizatora, BASF Actimel M, KB. DM00609), trietilamin (20,0 mL, KB. 6838045) i deionizirana voda (300,0 mL) te homogenizirani pri 400 okretaja po minuti uz održavanje temperature <25 °C. Miješanje je zatim isključeno, a reaktor inertiziran tri puta sa dušikom, a zatim je atmosfera u reaktoru izmijenjena vodikom tri puta. Miješanje je ponovno podešeno na 400 okretaja po minuti. U reaktor je šaržiran vodik do tlaka od 10 bara i zabilježena je potrošnja. U slučaju porasta temperature u reaktoru iznad 25 °C, dotok vodika potrebno je zaustaviti dok se ne postigne željena niža temperatura. Nakon potrošnje vodika uspori, termostat je namješten na 20 °C (13–25 °C, max. 33 °C), a miješanje na 800 okretaja po minuti. Reakcija redukcije nitro skupine trajala je do 2 sata pri nepromijenjenim procesnim parametrima (T,p).

Nakon 2-4 h provođenja reakcije, miješanje je smanjeno na 400 okretaja po minuti i isključena je miješalica. Reaktor je postepeno odzračen i tri puta inertiziran dušikom. Reakcijska smjesa je zatim ispuštena u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 500 mL. Reaktor je ispran deioniziranom vodom (40,0 mL), a pranje je pripojeno reakcijskoj smjesi.

Reakcijska smjesa je profiltrirana preko Büchner lijevka (90 mm, plava vrpca, preslojen sa 2 g aktivnog ugljena KB. 6832030) pod inertnom atmosferom. RaNi katalizator je ispran deioniziranom vodom (10 mL), a pranje je pripojeno filtratu. Filtrat je prebačen u trogrlu tikvicu (500 mL) propuhanom dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1607/9-R i dan na HPLC analizu. Kristalizacija je provedena uz inertnu atmosferu i pri 250 okretaja po minuti, a temperatura je održavana pomoću vodene kupelji na 30 °C (27-33 °C). Zatim je 10 %-tna HCl (KB. 45021213) sporo dokapavana do postizanja pH = 5,5 uz miješanje pri 250 okretaja po minuti. Nakon postizanja željenog pH = 5,5 suspenzija je miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Po potrebi je dokapano još 10 %-tne HCl u svrhu korekcije pH do vrijednosti 5,5 te je smjesa zatim ohlađena ledenom kupelji na temperaturu

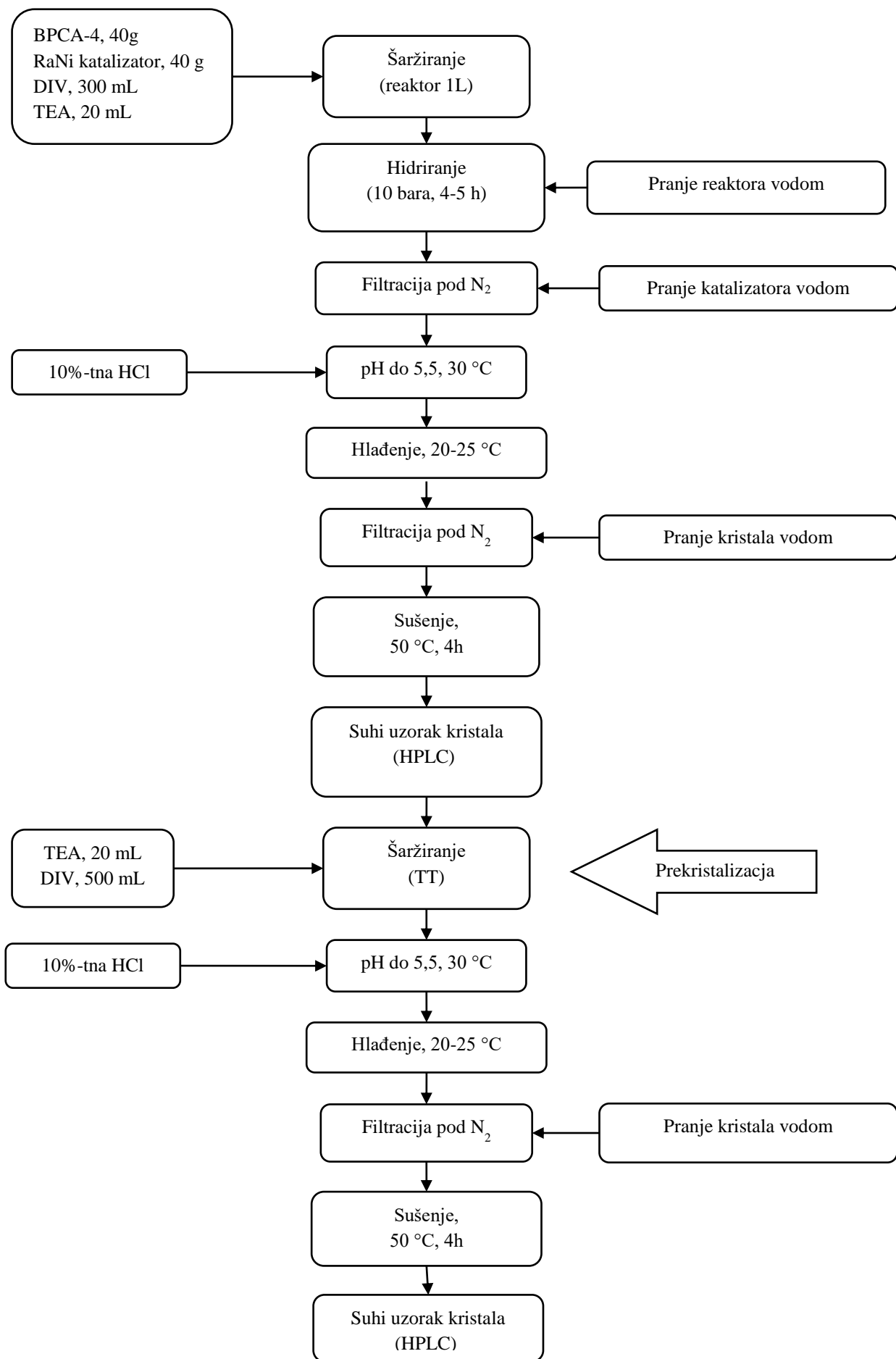
22 °C (20-25 °C) i miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno).

Suspenzija je zatim filtrirana preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1607/9-M te poslan na HPLC analizu. Kristali su oprani s tri puta po 50,0 mL deionizirane vode, a zatim prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici pri 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1607/9. Teoretski prinos iznosio je 35,9 g.



Slika 5. Hidrogenator Büchi volumena 1,1 L (opremljen mehaničkom miješalicom, plaštem za grijanje i hlađenje, dovodom i odvodom vodika i dušika te kontrolom tlaka, temperature i protoka plinova) spojen na pripadajuću kontrolnu jedinicu (vlastita fotografija, 2016).

Blok shema sinteze intermedijera C prikazana je na Shemi 11.



Shema 11. Blok shema sinteze intermedijera C

3.3.2. Bazno-kisela prekrystalizacija uzorka ELTC-1607/9 na povišenoj temperaturi

U trogrlu tikvicu (1 L) propuhanu dušikom te opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom, dodani su: uzorak ELTC-1607/9 (34,29/34,20 g), deionizirana voda (500 mL) i trietilamin (20,57/38,80 mL) te je sadržaj zagrijan na 30–33 °C i miješan pri 250 okretaja po minuti do potpunog otapanja uzorka¹.

U trogrlu tikvicu (1 L) propuhanom dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom sporo je dokapavana 10 %-tna HCl (KB. 45021213) do postizanja pH = 5,5 uz miješanje pri 250 okretaja po minuti. Nakon postizanja željenog pH = 5,5 suspenzija je miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Po potrebi je dokapano još 10 %-tne HCl u svrhu korekcije pH do vrijednosti 5,5 te je smjesa zatim ohlađena ledenom kupelji na temperaturu 22 °C (20-25 °C) i miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno).

Suspenzija je zatim filtrirana preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1608/10-M te poslan na HPLC analizu. Kristali su oprani s tri puta po 50,0 mL deionizirane vode, a zatim prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici pri 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1608 i ELTC-1610.

Uzorci ELTC-1608 i ELTC-1610 spojeni su u uzorak ELTC-1611 i zatim prekrystalizirani kako bi se dobio homogen uzorak standarda.

¹ Suspenzija se može filtrirati preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Krystalizacija se može nastaviti i u istoj trogrloj tikvici ukoliko je došlo do potpunog otapanja uzorka.

3.3.3. Prekristalizacija uzorka ELTC-1611 u vodi na sobnoj temperaturi

U troglu tikvicu (1 000 mL) propuhanu dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom, dodan je uzorak ELTC-1611 (62,01 g) i deionizirana voda (800 mL) te je sadržaj miješan pri 25 °C i 300 okretaja po minuti. Nakon toga je suspenzija filtrirana preko Büchnerovog lijevka (100 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Kristali su isprani sa tri puta po 100,0 mL deionizirane vode. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1612-M. Kristali su prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu te sušeni u vakuum sušnici na 50 °C kroz 4 sata do postizanja udjela vode u uzorku < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1612.

3.4. METODE PRIPRAVE I IZOLACIJE INTERMEDIJERA C- NEREPREZENTATIVNE ŠARŽE

3.4.1. Sinteza intermedijera C natrijevim ditionitom ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) – ELTC-1601

U trogrlu tikvicu (1000 mL) propuhanom dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom, šaržirani su BPCA-4 (20,0 g, KB. NBP-21/04/12-13) i deionizirana voda (350 mL) i homegenizirani pri 250 okretaja po minuti uz održavanje temperature vodene kupelji u rasponu 30–35 °C. U smjesu je dodan trietilamin (18,0 mL, KB. 6838045). Dobivena suspenzija je homogenizirana pri 250 okretaja po minuti kroz 15 minuta. Natrijev ditionit (KB. 6844085) je dodavan u obrocima (ukupno dodano 22,2 mL) kao katalizator (teoretski treba 17,8 g 100%-tnog anhidrida), a reakcijska smjesa je miješana pola sata.

Nakon 3 h reakcije, u istoj je tikvici potaknuta kristalizacija sporim dokapavanjem 10 %-tne HCl (KB. 45021213) do postizanja pH=5,5 uz miješanje pri 250 okretaja po minuti. Nakon postizanja željenog pH=5,5, suspenzija je miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Po potrebi je dokapano još 10 %-tne HCl u svrhu korekcije pH do vrijednosti 5,5 te je smjesa zatim ohlađena ledenom kupelji na temperaturu 22 °C (20-25 °C) i miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno).

Suspenzija je zatim filtrirana preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1601-M te poslan na HPLC analizu. Kristali su oprani s dva puta po 50,0 mL deionizirane vode, a zatim prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici pri 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1601.

3.4.2. Hidriranje BPCA-4 sa Raney nikal katalizatorom - ELTC-1603

U hidrogenator Büchi (Slika 5) volumena 1,1 L (opremljenim mehaničkom miješalicom, plaštem za grijanje i hlađenje, dovodom i odvodom vodika i dušika, kontrolom tlaka, temperature i protoka plinova) šaržirani su BPCA-4 (40,0 g, KB. NBP-21/04/12-13), RaNi katalizator (8,0 g vlažnog katalizatora, BASF Actimel M, KB. DM00609), trietilamin (20,0 mL, KB. 6838045) i deionizirana voda (300,0 mL) te homogenizirani pri 400 okretaja po minuti uz održavanje temperature $<25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Miješanje je zatim isključeno, a reaktor inertiziran tri puta sa dušikom, a zatim je atmosfera u reaktoru izmijenjena vodikom tri puta. Miješanje je ponovno podešeno na 400 okretaja po minuti. U reaktor je šaržiran vodik do tlaka od 10 bara i zabilježena je potrošnja. U slučaju porasta temperature u reaktoru iznad $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, dotok vodika potrebno je zaustaviti dok se ne postigne željena niža temperatura. Nakon potrošnje vodika uspori, termostat je namješten na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($13\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, max. $33\text{ }^{\circ}\text{C}$), a miješanje na 800 okretaja po minuti. Reakcija redukcije nitro skupine trajala je do 2 sata pri nepromijenjenim procesnim parametrima (T,p).

Nakon 4 h provođenja reakcije, miješanje je smanjeno na 400 okretaja po minuti i isključena je miješalica. Reaktor je postepeno odzračen i tri puta inertiziran dušikom. Reakcijska smjesa je zatim ispuštena u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 500 mL. Reaktor je ispran deioniziranom vodom (40,0 mL), a pranje je pripojeno reakcijskoj smjesi.

Reakcijska smjesa je profiltrirana preko Büchner lijevka (90 mm, plava vrpca, preslojen sa 2 g aktivnog ugljena KB. 6832030) pod inertnom atmosferom. RaNi katalizator je ispran deioniziranom vodom (10 mL), a pranje je pripojeno filtratu. Filtrat je prebačen u troglu tikvicu (500 mL) propuhanom dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1603-R i dan na HPLC analizu. Kristalizacija je provedena uz inertnu atmosferu i pri 250 okretaja po minuti, a temperatura je održavana pomoću vodene kupelji na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($27\text{--}33\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zatim je 10 %-tna HCl (KB. 45021213) sporo dokapavana do postizanja $\text{pH} = 5,5$ uz miješanje pri 250 okretaja po minuti. Nakon postizanja željenog $\text{pH} = 5,5$ suspenzija je miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Po potrebi je dokapano još 10 %-tne HCl u svrhu korekcije pH do vrijednosti 5,5 te je smjesa zatim ohlađena ledenom kupelji na temperaturu $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno).

Suspenzija je zatim filtrirana preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1603-M te poslan na HPLC analizu. Kristali su oprani s tri puta po 50,0 mL deionizirane vode, a zatim prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici pri 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1603. Teoretski prinos iznosio je 35,9 g.

3.4.3. Kiselo-bazna prekrizalizacija uzorka ELTC-1603 u uzorak ELTC-1604

U trogrlu tikvicu (1 L) propuhanu dušikom te opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom, zagrijanu na 20–25 °C, dodani su: uzorak ELTC-1603 (33,0 g), deionizirana voda (300 mL) i te 10 %-tna HCl (50,0 mL, KB. 45021213). Sadržaj tikvice je miješan pri 250 okretaja po minuti do potpunog otapanja uzorka².

U trogrlu tikvicu (1 L) propuhanom dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom sporo je dokapavana 10 %-tna NaOH (KB. 36391113) do postizanja pH = 5,5 uz miješanje pri 250 okretaja po minuti. Nakon postizanja željenog pH = 5,5 suspenzija je miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Po potrebi je dokapano još 10 %-tne NaOH u svrhu korekcije pH do vrijednosti 5,5 te je smjesa zatim ohlađena ledenom kupelji na temperaturu 22 °C (20-25 °C) i miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno).

Suspenzija je zatim filtrirana preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1604-M te poslan na HPLC analizu. Kristali su oprani s tri puta po 50,0 mL deionizirane vode, a zatim prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici pri 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1604.

² Suspenzija se može filtrirati preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Kristalizacija se može nastaviti i u istoj trogrloj tikvicu ukoliko je došlo do potpunog otapanja uzorka.

3.4.4. Kiselo-bazna prekrystalizacija uzorka ELTC-1604 u uzorak ELTC-1605

Metoda je slična prethodno opisanom postupku za kiselo-baznu prekrystalizacija uzorka ELTC-1603 u uzorak ELTC-1604. Razlikuje se po tome što je otapanje manje količine uzorka (10 g uzorka ELTC-1604) provođeno na povišenoj temperaturi od 45-50 °C. Kristali dobiveni na taj način prebačeni su u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici na 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1605.

3.4.5. Bazno-kisela prekrystalizacija uzorka ELTC-1604 u uzorak ELTC-1606

U trogrlu tikvicu (1 L) propuhanu dušikom te opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom, dodani su: uzorak ELTC-1604 (10 g), deionizirana voda (300 mL) i trietilamin (6,0 mL) te je sadržaj zagrijan na 30–35 °C i miješan pri 250 okretaja po minuti do potpunog otapanja uzorka³.

U trogrlu tikvicu (1 L) propuhanom dušikom, opremljenu miješalicom, dovodom dušika i pH-metrom sporo je dokapavana 10 %-tna HCl (KB. 45021213) do postizanja pH = 5,5 uz miješanje pri 250 okretaja po minuti. Nakon postizanja željenog pH = 5,5 suspenzija je miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Po potrebi je dokapano još 10 %-tne HCl u svrhu korekcije pH do vrijednosti 5,5 te je smjesa zatim ohlađena ledenom kupelji na temperaturu 22 °C (20-25 °C) i miješana minimalno 30 minuta pri istoj temperaturi (vrijeme miješanja nije točno ograničeno). Suspenzija je zatim filtrirana preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Uzet je uzorak matičnice ELTC-1606-M te poslan na HPLC analizu. Kristali su oprani s tri puta po 50,0 mL deionizirane vode, a zatim prebačeni u tariranu Petrijevu zdjelicu i sušeni u vakuum sušnici pri 50 °C kroz 4 sata dok udio vode nije iznosio < 2,0 %. Uzet je uzorak suhog kristala ELTC-1606.

³ Suspenzija se može filtrirati preko Büchnerovog lijevka (90 mm, crna vrpca) pod inertnom atmosferom. Krystalizacija se može nastaviti i u istoj trogrloj tikvici ukoliko je došlo do potpunog otapanja uzorka.

3.5. ANALITIČKE METODE

3.5.1. Određivanje koncentracije intermedijera C pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Koncentracija intermedijera C određivana je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti proizvođača UPLC Waters H Class. Uređaj se sastoji od crpke, otplinjača, injektora, uređaja za grijanje kolone, analitičke kolone (Waters XBridge C18 150 × 4.6 mm, 3.5 μm, p.n. 186003034), detektora indeksa loma, modula za kontrolu sustava i računalnog programa za kromatografiju. Kao mobilna faza korištena je otopina acetonitrila u vodi (acetonitril:H₂O = 80:20). Volumen analiziranog uzorka iznosio je 1,0 μL, a protok mobilne faze 1,0 mL min⁻¹. Razdvajanje komponenata u uzorku odvijalo se pri temperaturi od 30 °C, detekcija pri 224 nm. Analiza je trajala 2 sata, a retencijsko vrijeme iznosilo je dvije minute.

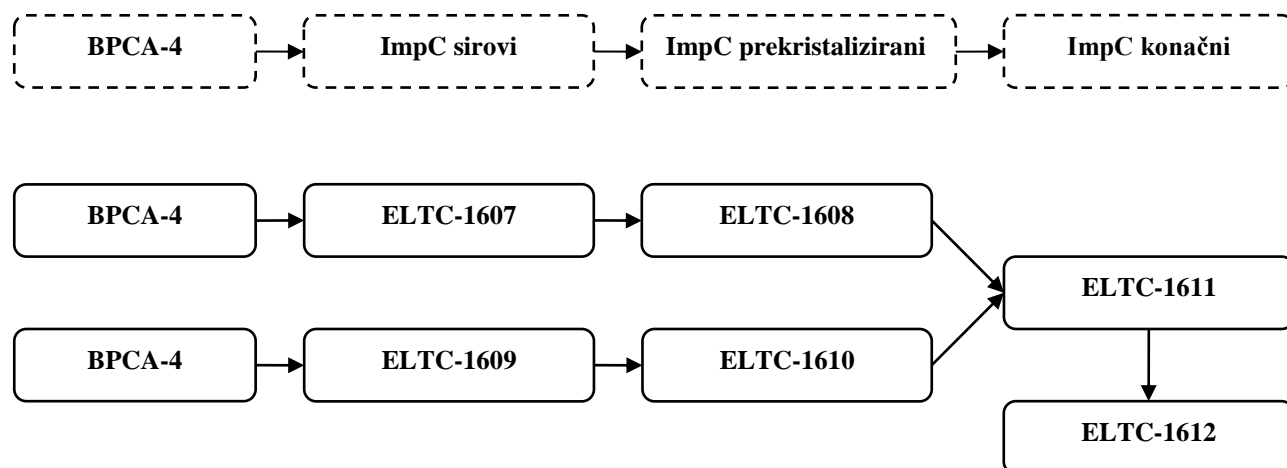
Uzorci kristala intermedijera C pripremljeni su tako da je odvagano 20 mg uzorka u odmjernu tikvicu od 20 mL (kako bi se dobila koncentracija uzorka od 1,0 mg mL⁻¹), koja je zatim nadopunjena do pola diluentom i stavljena u ultrazvučnu kupku na 15 minuta. Nakon otapanja, odmjerna tikvica je napunjena diluentom do oznake. 1,5 mL dobivene otopine prebačeno je u vijal i analizirano je. Uzorci matičnica pripremljeni su tako da je koncentracija uzorka pomoću diluenta podešena na 1,0 mL min⁻¹. Tako pripremljen uzorak analiziran je u vijalu.

Dobiveni kromatogrami analizirani pomoću računalnog programa Empower 2, priloženi su u Prilogu 3.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REPREZENTATIVNE ŠARŽE

Istražen je učinak Raney nikal katalizatora u sintezi intermedijera C iz BPCA-4. Svrha ovog poglavlja je sažeti reprezentativne laboratorijske šarže. Svaka šarža je sadržavala 40,0 g BPCA-4. Dobiveni uzorci intermedijera C ELTC-1607 i ELTC-1609 su prekrizalizirani, a zatim objedinjeni u jedan uzorak ELTC-1611, radi homogenizacije uzorka. U svrhu pročišćavanja, uzorak ELTC-1611 je prekrizaliziran u uzorak ELTC-1612. Svi eksperimenti su opisani u poglavlju 3.3., a tijekom eksperimenta je prikazan na Shemi 12.



Shema 12. Prikaz tijeka reprezentativnih šarži.

4.1.1. Sinteza reprezentativnih laboratorijskih šarži (ELTC-1607 i ELTC-1609)

Procesni parametri sinteze pokusa ELTC-1607 i ELTC-1609 sinteze intermedijera C prikazani su u Tablici 4 i Tablici 5.

Tablica 4. Procesni parametri sinteze uzorka ELTC-1607.

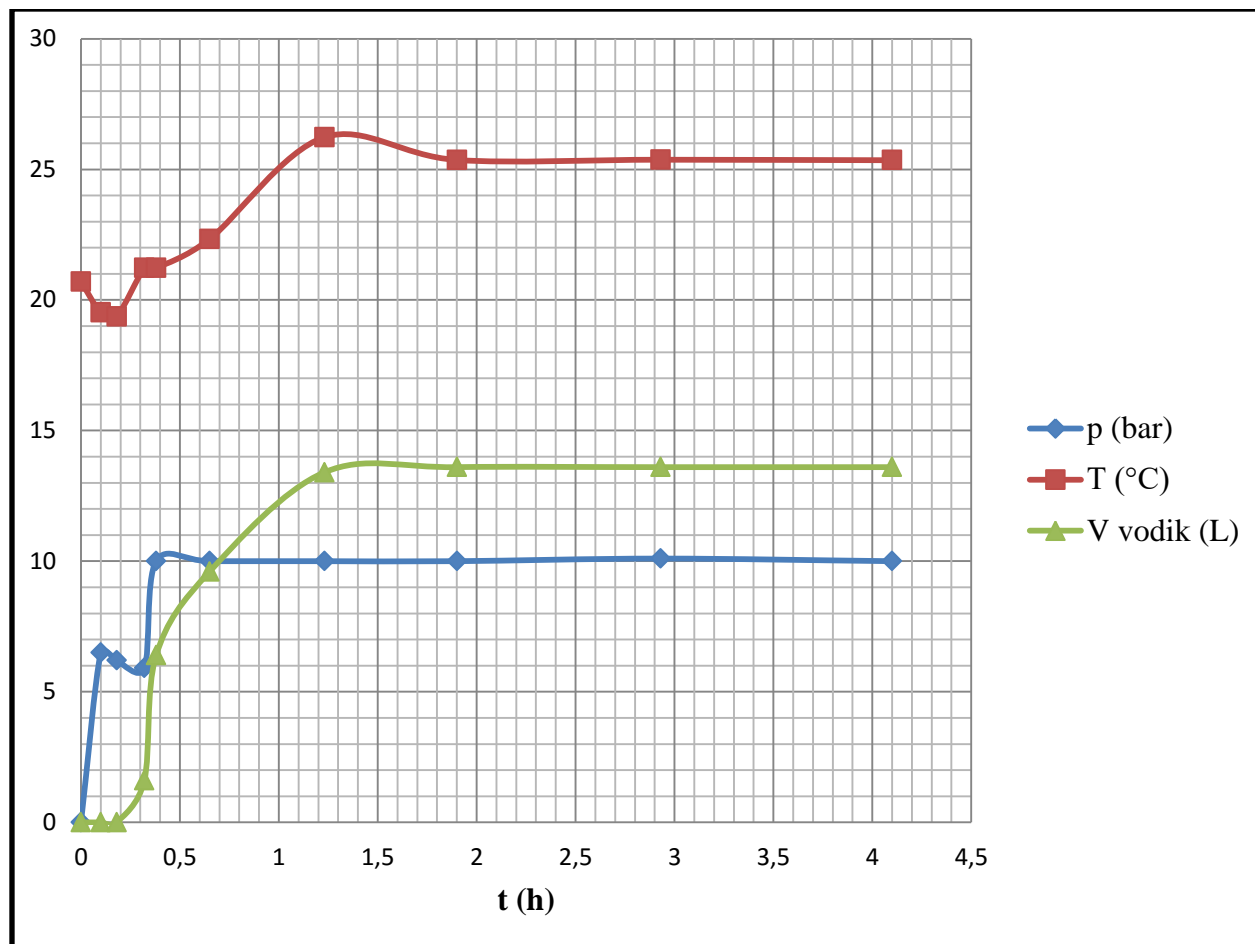
Vrijeme (h)	Procesni parametar			
	Tlak (bar)	T (°C)	V (H ₂) (L)	Broj okretaja min ⁻¹
0	0	20,7	0	400
0,1	6,5	19,52	0	400
0,18	6,2	19,36	0	500
0,32	5,9	21,22	1,6	800
0,38	10	21,23	6,4	800
0,65	10	22,33	9,6	800
1,23	10	26,23	13,4	800
1,9	10	25,36	13,6	800
2,93	10,1	25,37	13,6	800
4,1	10	25,35	13,6	800

Tablica 5. Procesni parametri sinteze uzorka ELTC-1609.

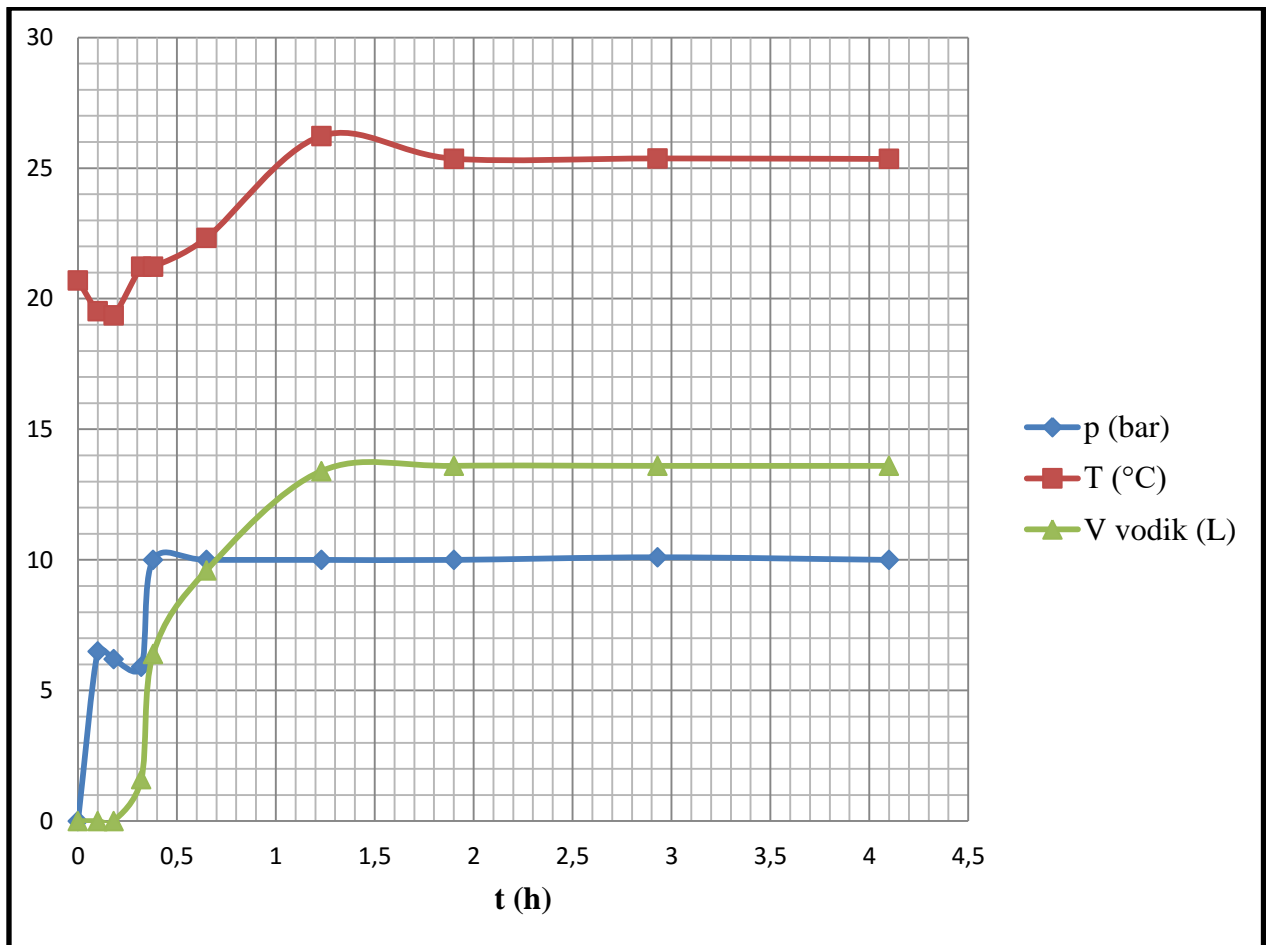
Procesni parametar				
Vrijeme (h)	Tlak (bar)	T (°C)	V (H ₂) (L)	Broj okretaja min ⁻¹
0	0	24,15	0	0
0,03	0	21,91	0	400
0,06	5,4	20,68	0	450
0,25	5	20,67	1	500
0,38	10,1	21,14	7,8	600
0,43	10	21,32	8,5	800
0,52	10	21,83	9,7	800
1,05	10	26,45	13,9	800
1,33	10	25,54	14,5	800
2,05	10	25,39	14,5	800

Iz Tablice 4 i 5 vidljivo je da maksimalna temperatura u reaktoru pri sintezi intermedijera C, uzorka ELTC-1607 iznosi 26,23 °C. Ukupna potrošnja vodika je iznosila 13,6 L. Maksimalna temperatura u reaktoru pri sintezi intermedijera C, uzorka ELTC-1609 iznosi 26,45 °C. Ukupna potrošnja vodika iznosila je 14,5 L. Maksimalni tlak vodika u oba slučaja bio je 10 bara. Broj okretaja miješalice u oba slučaja bio je podešen na 800 okretaja u minuti.

Na Slikama 6 i 7 je grafički prikaz procesnih parametara ($T/ ^\circ\text{C}$, $V(\text{H}_2)/ \text{L}$, broj okretaja u minuti i tlak/ bar) sinteze uzorka ELTC-1607 i ELTC-1609 u ovisnosti o vremenu (t/h).



Slika 6. Grafički prikaz procesnih parametara ($T/ ^\circ\text{C}$, $V(\text{H}_2)/ \text{L}$ i p/ bar) sinteze uzorka ELTC-1607 u ovisnosti o vremenu (t/h).



Slika 7. Grafički prikaz procesnih parametara ($T/ ^\circ\text{C}$, $V(\text{H}_2)/ \text{L}$ i p/ bar) sinteze uzorka ELTC-1609 u ovisnosti o vremenu (t/h).

Rezultati kromatografske čistoće uzoraka reprezentativnih šarži prikazani su u Tablici 6. Kromatografska čistoća analizirana je po Plivinoj metodi MPC016667/1.

Tablica 6. Kromatografska čistoća reprezentativnih laboratorijskih šarži.

Uzorak	Masa uzorka (g)			Kromatografska čistoća (%)										
	BPCA-4	Imp-C	Prinos (%)	ImpC	BPCA-4	BPCA	ImpE	ImpF	ImpA	ImpD	ImpB	Bifenil	Nepoznata onečišćenja	Suma onečišćenja
ELTC-1607	40,00	34,74	96,76	96,76	0,08	0,69	-	-	1,07	-	-	0,82	0,58	3,24
ELTC-1607-M	-	-	-	69,75	-	5,81	-	-	19,37	-	-	1,66	3,42	30,26
ELTC-1608	34,29	30,78	89,76	97,00	0,08	0,62	-	-	0,84	-	0,02	0,89	0,54	2,99
ELTC-1608-M	-	-	-	69,62	-	6,98	-	-	18,20	-	-	1,56	3,65	30,39
ELTC-1609	40,00	34,23	95,34	96,88	0,12	0,43	-	-	1,12	-	0,02	0,80	0,65	3,14
ELTC-1609-M	-	-	-	73,47	-	2,99	-	-	18,86	-	-	1,61	3,07	26,53
ELTC-1610	34,20	34,20	100,00	96,13	-	0,02	0,41	-	1,58	0,07	0,07	0,24	1,47	2,39
ELTC-1610-M	-	-	-	70,46	-	-	3,59	-	19,81	0,81	1,18	-	4,15	29,54
ELTC-1611	64,62	62,93	97,38	96,24	-	0,03	0,46	-	1,33	0,06	0,05	0,37	1,48	3,78
ELTC-1611-M	-	-	-	73,28	-	-	4,63	-	14,77	1,20	1,96	-	4,17	26,73
ELTC-1612	62,01	60,03	96,81	96,90	-	-	-	-	0,84	0,1	0,08	-	1,48	3,78

Laboratorijska šarža ELTC-1607 sadržavala je 96,76 % intermedijera C, s prinosom od 96,76%. Nakon prekrystalizacije iste šarže, u uzorku ELTC-1608 dobiveno je 97,00 % intermedijera C, s prinosom od 89,76%. Prekrystalizacijom na ovaj način uzorak intermedijera C pročistio se za 0,24 %.

U oba uzorka zaostala je mala količina reaktanta BPCA-4 (0,08 %), a prisutna je i mala količina BPCA (0,62-0,69 %), što znači da je reakcija vođena predugo. Hidriranje BPCA-4 za uzorak ELTC-1607, trajalo je 4,1 h, kako je prikazano u Tablici 4.

U uzorku ELTC-1607 pristuno je 1,07 % onečišćenja A, koje se smanjilo prekrystalizacijom za 0,23 %. Onečišćenje A nastaje u sintezi BPCA-3, kao rezultat homokopulacijske reakcije BPCA-2 katalizirane paladijem (Avdagic i sur., 2013). Reakcija je prikazana na Shemi 3. Ovo onečišćenje je vjerojatno došlo iz ishodišne sirovine 5'-kloro-2'-hidroksi-3'nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilne kiseline (BPCA-4).

U uzorku ELTC-1608 detektirana je mala količina onečišćenja B, koje nastaje hidriranjem BPCA-3, reakcija je prikazana na Shemi 4 (Avdagic i sur., 2013). Ovo onečišćenje također je došlo iz ishodišne sirovine 5'-kloro-2'-hidroksi-3'nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilne kiseline (BPCA-4).

Onečišćenja D, E i F nisu prisutna u uzorku ELTC-1607 i ELTC-1608.

Iz Tablice 6 je vidljivo da laboratorijska šarža ELTC-1609 sadržava 96,88 % intermedijera C, s prinosom od 95,34 %. Nakon prekrystalizacije iste šarže, u uzorku ELTC-1610 dobiveno je 96,13 % intermedijera C, s prinosom od 100 %. Prekrystalizacijom na ovaj način čistoća uzorka intermedijera C smanjila se za 0,75%.

U uzorku ELTC-1609 zaostala je mala količina reaktanta BPCA-4 (0,12 %), a prisutna je i mala količina BPCA (0,02-0,43 %). Hidriranje BPCA-4 za uzorak ELTC-1609, trajalo je 2,05 h. Skraćeno vrijeme reakcije rezultiralo je znatno manjom količinom BPCA, iako je još uvijek zaostala manja količina BPCA-4, kako je prikazano u Tablici 5.

U uzorku ELTC-1609 i ELTC-1610 detektirana je mala količina onečišćenja B, 0,02-0,07 %, koje nastaje hidriranjem BPCA-3, reakcija je prikazana na Shemi 4 (Avdagic i sur., 2013).

U uzorku ELTC-1610 detektirana je mala količina onečišćenja D, 0,07 % i mala količina onečišćenja E, 0,41 %. Ovo onečišćenje (BPCA-dimer) nastaje u reakciji BPCA i intermedijera C, katalizirano sa paladijem, kako je prikazano na (Avdagic i sur., 2013). Onečišćenje D nastaje homokopulacijskom reakcijom BPCA, oksidativnom dehidrogenacijom kataliziranom paladijem, kako je prikazano na Shemi 6 (Avdagic i sur., 2013). Ovo onečišćenje ne nastaje u inertnoj atmosferi (N₂ ili vakuum), niti bez prisustva katalizatora, što ukazuje da je to onečišćenje došlo iz sirovine 5'-kloro-2'-hidroksi-3'nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilne kiseline (BPCA-4).

Uzorci ELTC-1608 i ELTC-1610 objedinjeni su u jedan, prekristalizirani uzorak ELTC-1611, s prinosom od 97,38 % i udjelom intermedijera C od 96,24 %.

U uzorku ELTC-1611 nije bilo prisutno BPCA-4, dok je bila prisutna mala količina BPCA od 0,03 % koja dolazi iz uzoraka ELTC-1608 i ELTC-1610. Prekristalizacijom se udio BPCA smanjio za 0,29 %. Prisutna je neznatno veća količina onečišćenja E (0,46 %), koja se prenijela iz uzorka ELTC-1610. Prekristalizacijom se uzorak neznatno pročistio od onečišćenja A, B i D kao što je vidljivo u Tablici 6.

U ovim eksperimentima pokazalo se da je Raney nikal učinkovit i selektivan katalizator za sintezu intermedijera C iz BPCA-4. Molekula BPCA-4 uspješno se hidrirala pri visokom tlaku od 10 bara uz očuvanje halogenske skupine, rezultirajući velikim prinosima. Trietilamin se također pokazao kao prikladno otapalo za ovu vrstu reakcije pri sobnoj temperaturi, jer značajno povećava učinkovitost hidriranja sa Raney nikal katalizatorom kako su u svom istraživanju pokazali Homera i sur. (1948).

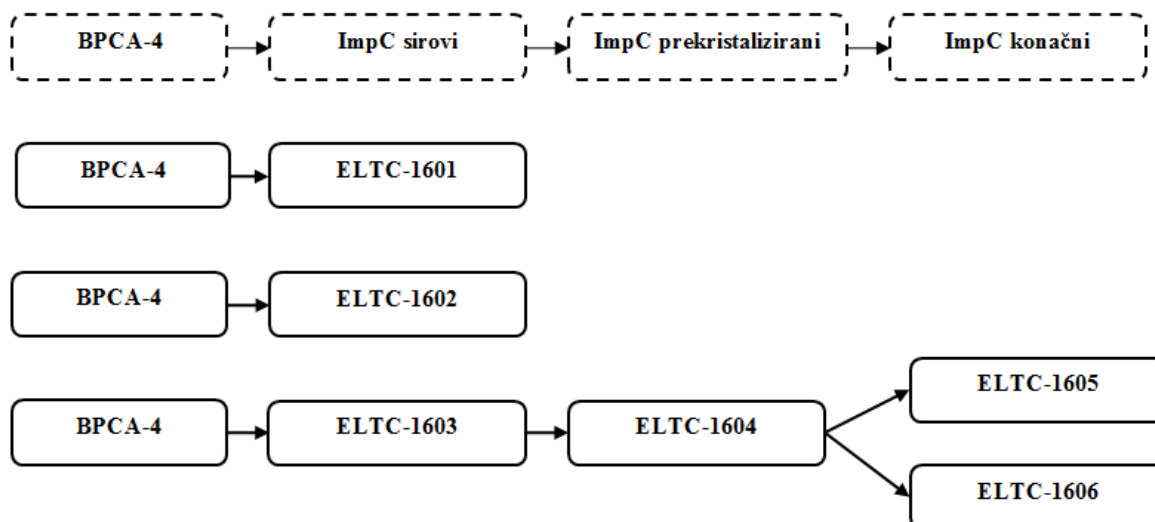
Obrada i izolacija produkta je jednostavna i brza. Bazno kisela prekristalizacija pri temperaturi od 30–33 ° opisana u poglavlju 3.3.2. pokazala se kao najučinkovitijom metodom za izolaciju intermedijera C.

Uz brojne prednosti ovog postupka pripreme intermedijera C, prisutni su i neki nedostaci. Ona zahtijeva lužnati medij, upotrebu vodika pri visokom tlaku i skupu visokotlačnu opremu. Raney nikal katalizator zahtijeva posebno rukovanje zbog zapaljivosti u prisutnosti zraka. Za primjenu u laboratorijskom i industrijskom mjerilu potrebna je adekvatna oprema i posebna pozornost prilikom provedbe pokusa.

4.2. NEREPREZENTATIVNE ŠARŽE

Svrha ovog poglavlja je sažeti nereprezentativne laboratorijske šarže. Uzorak ELTC-1601 dobiven je sintezom BPCA-4 (20,0 g) sa natrij hidrosulfitom ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Eksperiment je detaljno opisan u poglavlju 3.4.1.

Ostali pokusi (ELTC-1602 i ELTC-1603) provedeni su hidriranjem 40,0 g BPCA-4, na način kako je opisano u poglavlju 3.3. i 3.4.2. Uzorak ELTC-1604 je prekrizalizirani oblik uzorka ELTC-1603, dok su uzorci ELTC-1605 i ELTC-1606 prekrizalizirani oblici uzorka ELTC-1604. Tijek eksperimenta je prikazan na Shemi 13.



Shema 13. Prikaz tijeka nereprezentativnih šarži.

Rezultati kromatografske čistoće uzoraka nereprezentativnih šarži prikazani su u Tablici 7. Kromatografska čistoća analizirana je po Plivinoj metodi MPC016667/1.

Tablica 7. Kromatografska čistoća nereprezentativnih laboratorijskih šarži.

Uzorak	Masa uzorka (g)			Kromatografska čistoća (%)										
	BPCA-4	Imp-C	Prinos (%)	ImpC	BPCA-4	BPCA	ImpE	ImpF	ImpA	ImpD	ImpB	Bifenil	Nepoznata onečišćenja	Suma onečišćenja
ELTC-1601	20,00	4,80	26,74	59,99	32,80	-	0,25	0,06	0,83	-	0,07	2,34	3,66	39,21
ELTC-1602	40,00	29,88	83,23	94,50	0,63	-	-	0,04	1,77	-	0,06	1,38	3,48	6,86
ELTC-1603	40,00	34,25	96,85	96,51	0,51	0,10	-	0,06	1,23	0,03	-	0,79	0,78	3,50
ELTC-1604	33,09	30,77	92,98	96,09	0,02	-	0,03	-	0,32	0,09	-	0,02	3,44	3,92
ELTC-1605	10,00	8,86	88,60	96,61	0,58	0,09	-	-	0,97	0,03	0,02	0,82	0,89	3,40
ELTC-1606	10,00	9,85	98,50	96,95	0,53	0,09	-	-	0,72	0,08	0,03	0,75	1,00	3,17

Laboratorijska šarža ELTC-1601 sadržavala je 59,99 % intermedijera C, s prinosom od 26,74 %. U uzorku je zaostala značajna količina BPCA-4, što upućuje na nedovršenu reakciju. Također, prisutna su onečišćenja E, F, A i B koja su se u reprezentativnim šaržama pojavljivala u puno manjim postocima.

Istraživanje sa natrijevim hidrosulfitom nije pokazalo zadovoljavajuće rezultate, iako je on svestran reagens za redukciju nitro i nitrozo spojeva, ketona i mnogih drugih spojeva (Khurana i sur., 1996). Unatoč tome što je jeftin, netoksičan, neutralan, ne-nukleofilan i specifičan za redukciju nitro-spojeva u prisutnosti dugih funkcionalnih grupa, zbog nezadovoljavajućeg prinosa i premale kromatografske čistoće intermedijera C, daljnje istraživanje sa tim katalizatorom nije nastavljeno.

Uzorak intermedijera C ELTC-1602 s prinosom od 83,23 %, sintetiziran na isti način kako je opisano u poglavlju 3.3., nezadovoljavajuće je kromatografske čistoće od 94,50 %. Zato je proveden još jedan pokus hidriranja BPCA-4, kako je opisano u poglavlju 3.4.2. a dobiven je uzorak ELTC-1603, koji je prekrizaliziran u uzorak ELTC-1604. Razlika u ovom pokusu je što se uzorak prvo otopio u vodi i 10%-tnoj HCl, a zatim se uzorak taložio sa 10%-tnom NaOH. Uzet je dio uzorka (10 g) ELTC-1604 i pretaložen u uzorak ELTC-1605 na način kako je opisano u poglavlju 3.4.4., s prinosom od 96,61 % i zadovoljavajućom kromatografskom čistoćom od 96,61 %. Drugi dio uzorka ELTC-1604 pretaložen je na način opisan u poglavlju 3.4.5., dobiven je uzorak ELTC-1606 s prinosom od 96,95 % i kromatografske čistoće 96,95 %.

Iako su prinosi i kromatografska čistoća zadovoljavajući, prisutna je značajna količina nereagiranog BPCA-4 te ostalih onečišćenja, kao što je vidljivo u Tablici 7. Zato su napravljena dodatna istraživanja u kojima je korišten Raney nikal katalizator i tako su po postupku opisanom u poglavlju 3.3. dobiveni reprezentativni uzorci ELTC-1607 – ELTC-1612.

5. ZAKLJUČCI:

Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Sinteza intermedijera C primjenom natrijevog ditionita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) kao katalizatora pokazala se kao neučinkovita metoda zbog nezadovoljavajuće kromatografske čistoće produkta (59,99 %) i malog prinosa (26,74 %).
2. Raney nikal se pokazao učinkovitijim katalizatorom za sintezu intermedijera C koje se javlja prilikom sinteze eltrombopaga pa su sva naredna istraživanja provedena s ovim katalizatorom.
3. Pri optimalnim uvjetima hidriranja kroz 2 do 4h, pri 800 okretaja po minuti i temperaturnom rasponu od 13 do 25 °C (max. 33 °C), dobivaju se uzorci intermedijera C zadovoljavajuće kromatografske čistoće i visokog prinosa.
4. Hidriranjem BPCA-4 uz Raney nikal katalizator dobiven je uzorak intermedijera C ELTC-1607 kromatografske čistoće 96,76 % i uzorak ELTC-1609 kromatografske čistoće 96,88 %.
5. Kromatografska čistoća konačnog produkta intermedijera C ELTC-1612 iznosila je 96,90 %.
6. Uzorak ELTC-1612 može poslužiti kao standard za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) pri određivanju kromatografske čistoće tijekom industrijske sinteze lijeka eltrombopaga.

6. LITERATURA

Borah, H., N., Prajapati, D., Sandhu, J., S., Ghosh, A., C. (1994) Bismuth(III) chloride-zinc promoted selective reduction of aromatic nitro compounds to azoxy compounds, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3163.

Akita, Y., Inaba, M., Uchida, H., Ohta, A. (1977) Reduction of Some Nitro Compounds and Sulfoxides with Chromium(II) Chloride, *Synthesis*, 792.

Avdagic, A., Baran, P.S. (2013) Processes for the preparation of an intermediate in the synthesis of eltrombopag, USA, WO 2013049605 A1. Dostupno na <https://www.google.ch/patents/WO2013049605A1?cl=en> (31.07.2016.)

Corman, S. L., Mohammad, R. A. (2010) Eltrombopag: A Novel Oral Thrombopoietin Receptor Agonist, *Ann. Pharmacother.*, **44**, 1072.

Delorme, E. O., Duffy, K. J., Lamb, P. I., Luengo, J. I., Tian, S.-S. C. (2002) Synthetic Approaches to the 2002 New Drugs, WO 2002057300 A1.

Ehernkauf, R., Ram, S. (1984) Selective Reduction of Nitro Compounds Using Formic Acid, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3415.

George, J., Chandrasekaran., S. (1983) Selective Reduction of Nitro Compounds With Titanium(II) Reagents, *Synthetic Commun.*, **13**, 495.

Gowda, D., C., Mahesh, B. (1999) Selective reduction of nitro compounds using formic acid and Raney nickel, *Synth. Commun.*, **30**, 2889-2895.

Gowda, S., Gowda, D.,C., (2002) Application of hydrazinium monoformate as new hydrogen donor with Raney nickel: a facile reduction of nitro and nitrile moieties, *Tetrahedron Lett.*, **58**, 2211-2213.

Homera, D., Harryr, B., (1948) The preparation of Raney nickel catalysts and their use under conditions comparable with those for platinum and palladium catalysts, preparation of Raney nickel catalysts, **70**, 695-699.

House, H., O. (1977) *Modern synthetic reactions*, Benjamin: New York, **2**, 1-44.

- Hughes, I. (1996) Application of polymer-bound phosphonium salts as traceless supports for solid phase synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 7595-7598.
- Khurana, J. M., Singh, S. J. (1996) Reduction of nitroarenes with sodium dithionite, *Indian Chem. Soc.*, **73**, 487-488.
- Kuter, D., J., Gernsheimer, T., B. (2009) Thrombopoietin and Platelet Production in Chronic Immune Thrombocytopenia, **23**, 1193–1211.
- Larock, R.C. (1989) *Comprehensive organic Transformations-A Guide to Functional Groups preparations*", VCH publishers. Inc., New York, 412
- Liu, K. K.-C., Sakya, S. M., O'Donnell, C. J., Flick, A.C., Li, J. (2011) Synthetic approaches to the 2009 new drugs, *Bioor. & Med. Chem.*, **19**, 1136-1154.
- Lyle, R., E., LaMattina, J., L. (1974) A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent, *Synthesis*, 726.
- Monti, D., Grammatica, P., Speranza, G., Mannito, P. (1983) A general synthesis of isotwist-8-en-2-ones from o-(3-butenyl)phenols, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 147.
- Otsuka, A., Shimizu, H., Suzuki, H. (1983) Enantioface-Differentiating (Asymmetric) Addition of Alkylolithium and Dialkylmagnesium to Aldehydes by Using (2S, 2'S)-2-Hydroxymethyl-1-[(1-alkylpyrrolidin-2-yl)methyl]pyrrolidines as Chiral Ligands, *Chem. Lett.*, 1973.
- Park, K., K., Oh, C. H., Joung, W. K. (1993) Sodium dithionite reduction of nitroarenes using viologen as an electron phase-transfer catalyst, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 7445-7446.
- Romas, M., N., Srivastava, R., M., Brito, M., B. (1984) *De Sa. G. F. J. Chem. Res. (S)*, 228.
- Rylander, P., N., (1985) *Hydrogenation Methods*, Academic: New York, 365.
- Scheuerman, R. A., Tumelty, D. (2000) The reduction of aromatic nitro groups on solid supports using sodium hydrosulfite, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 6531-6535.

Yuste, F., Saldana, M., Walls, F. (1982) Selective reduction of aromatic nitro compounds containing O- and N-benzyl groups with hydrazine and raney nickel, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 147.

7. PRILOZI

Prilog 1. Popis mjernih jedinica.

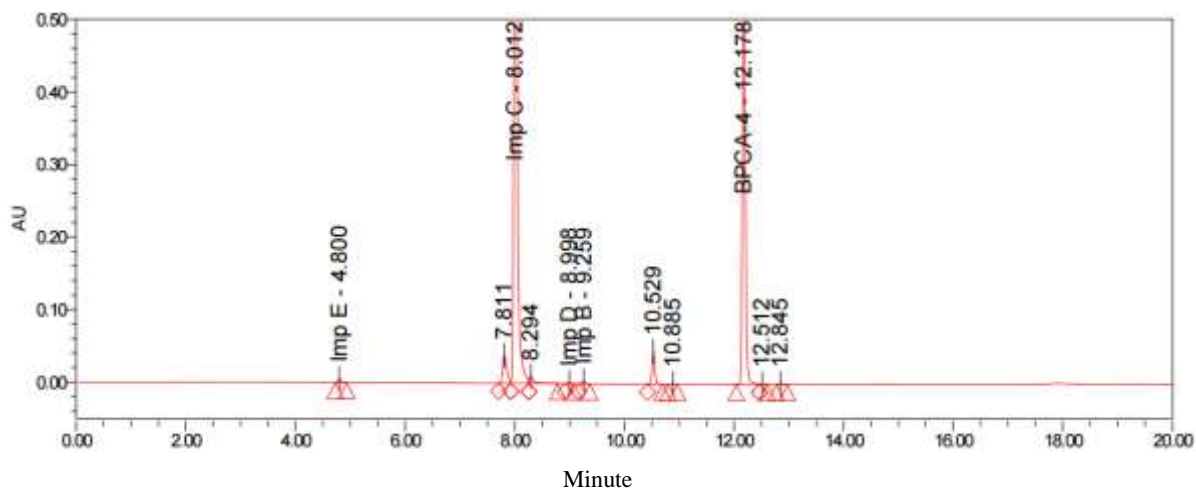
Naziv	Znak	Veličina
litra	L	volumen
mililitar	mL	volumen
mikrolitar	μ L	volumen
gram	g	masa
miligram	mg	masa
stupanj Celzijus	$^{\circ}$ C	temperatura
sat	h	vrijeme
minuta	min	vrijeme
milimetar	mm	duljina
nanometar	nm	duljina
postotak	%	udio
bar	bar	tlak
funta po kvadratnom palcu	psi	tlak
Broj okretaja po minuti	Broj okretaja min^{-1}	broj okretaja

Prilog 2. Popis kratica.

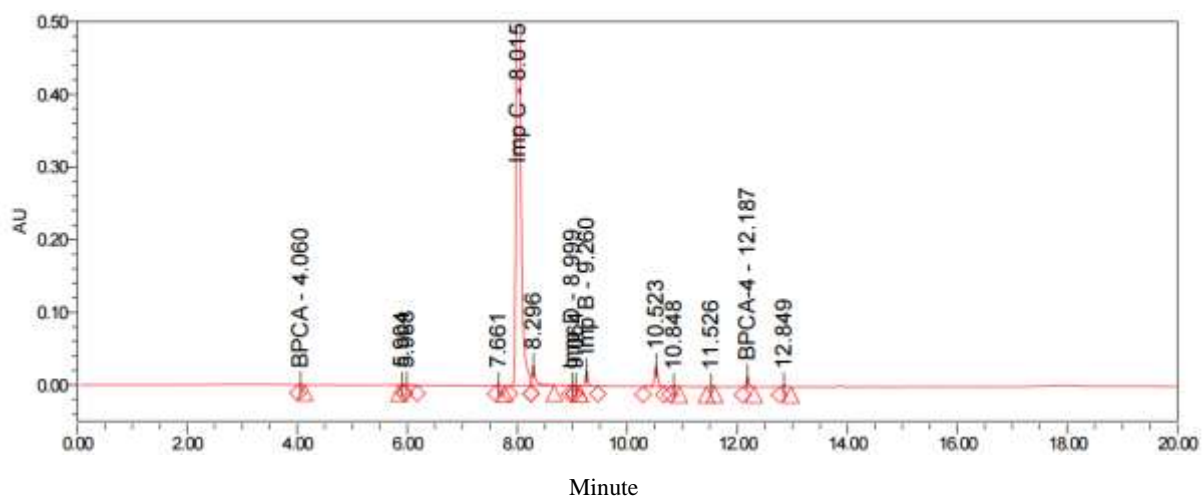
Znak	Značenje
ITP	imunološka trombocitopenija
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
NMR	nuklearna magnetska rezonanca
BPCA	3'-amino-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina
BPCA-1	2-bromo-4-klorofenola
BPCA-2	3-boronobenzojeva kiselina
BPCA-3	5'-kloro-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina
BPCA-4	5'-kloro-2'-hidroksi-3'-nitro-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina
Imp-A	[1,1'-bifenil]-3,3'-dikarboksilna kiselina
Imp-B	2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina
Imp-C	3'-amino-5'-kloro-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilna kiselina
Imp-D	3,3'-(2-amino-3-okso-3H-fenoksazin-4,6-diil)-dibenzojeva kiselina
Imp-E	5',5''-diamino-4'',6'-dihidroksi-[1,1':3',1'':3'',1'''-kvaterfenil]-3,3'''-dikarboksilna kiselina
Imp-F	Metil-3'-amino-2'-hidroksi-[1,1'-bifenil]-3-karboksilat
RaNi	Raney nikal
KB	kontrolni broj
NaOH	natrijev hidroksid
HCl	klorovodična kiselina
M	mol
HBr	bromovodična kiselina
Pd/C	Paladij na ugljiku
NaNO ₃	natrijevim nitratom
H ₂ O	voda
H ₂ SO ₄	sumporna kiselina
CH ₃ I	metil jodid
K ₂ CO ₃	kalijev karbonat
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenilfosfin)paladij
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat

CH ₃ CO ₂ H / AcOH	octena kiselina
H ₂	vodik
EtOH	etanol
MeOH	metanol
NaOAc	natrijev acetat
NaNO ₂	natrijev nitrit
NaHCO ₃	natrijev bikarbonat
NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	hidrosil-etil amin
Pd(OAc) ₂	paladij acetat
Et ₃ N	trietyl amin
NaNO ₃	Natrijev nitrat
AU	jedinica apsorbancije (<i>eng.</i> absorption unit)
SAD	Sjedinjene Američke Države
EU	Europska unija

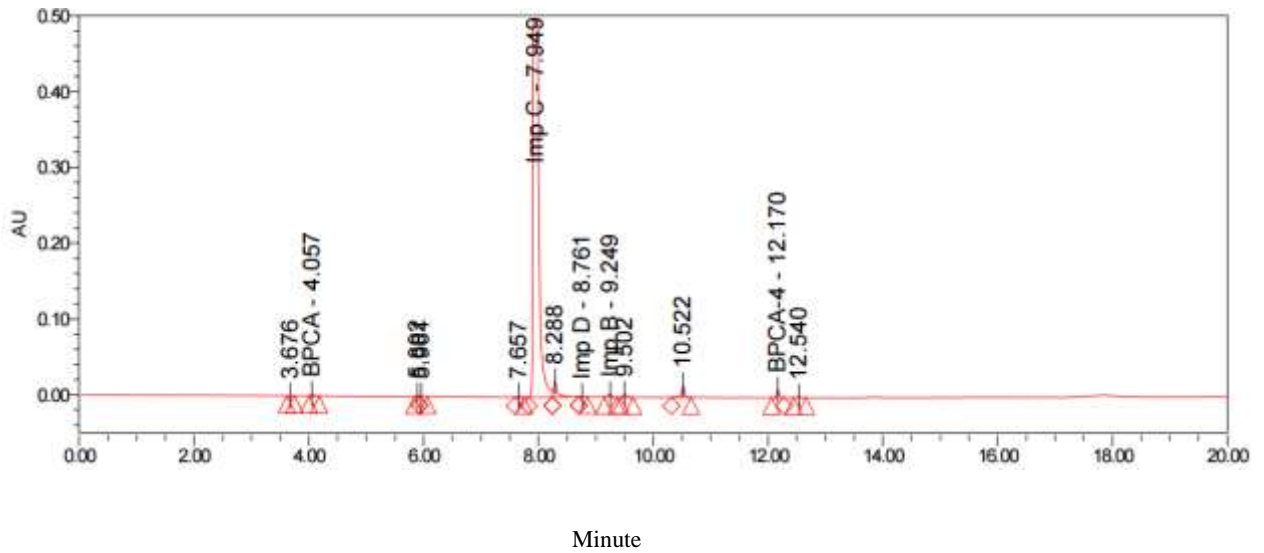
Prilog 3. Kromatogrami produkta intermedijera C.



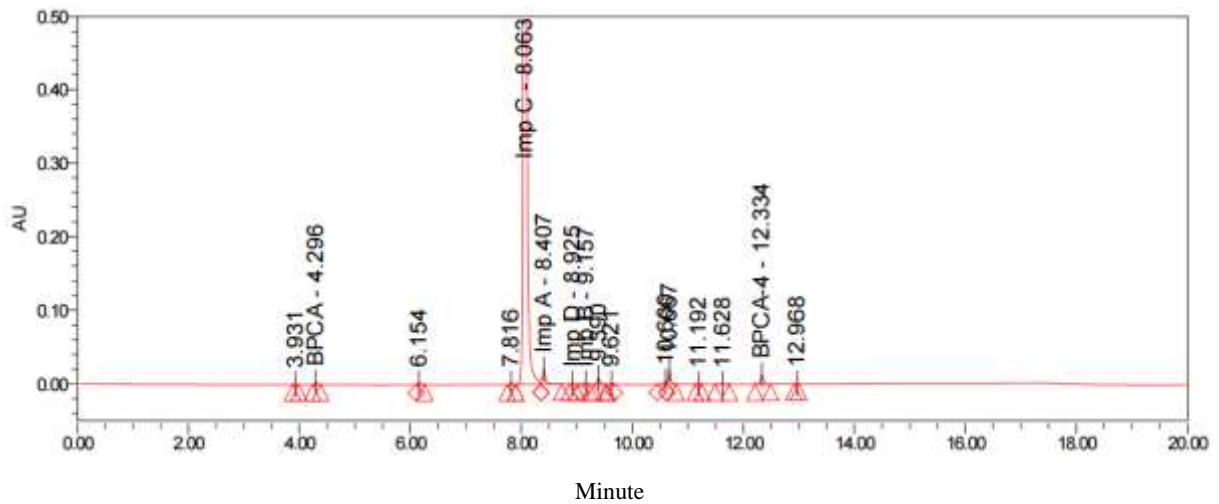
Kromatogram uzorka ELTC-1601.



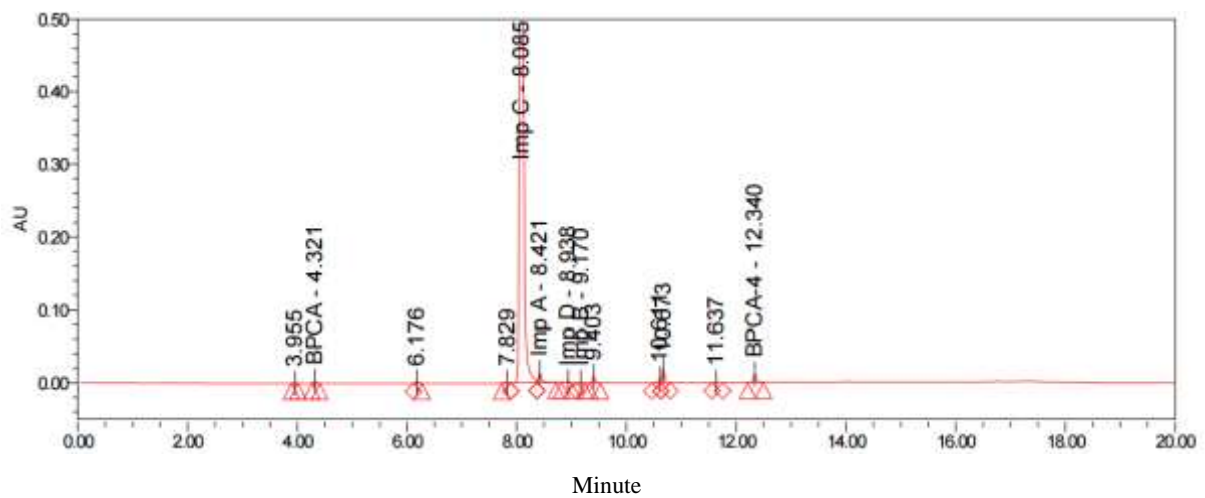
Kromatogram uzorka ELTC-1602.



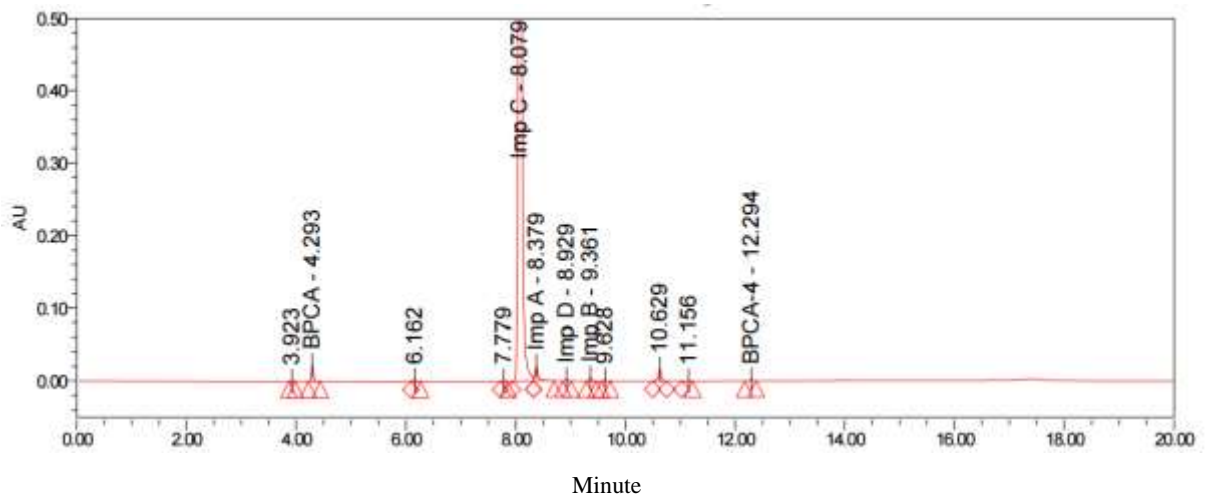
Kromatogram uzorka ELTC-1603.



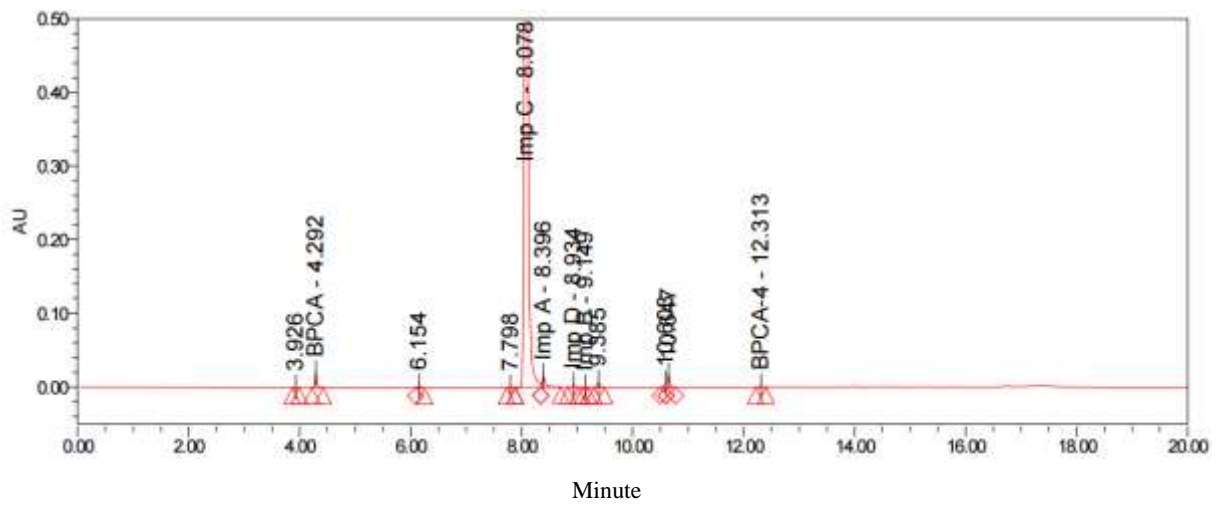
Kromatogram uzorka ELTC-1605.



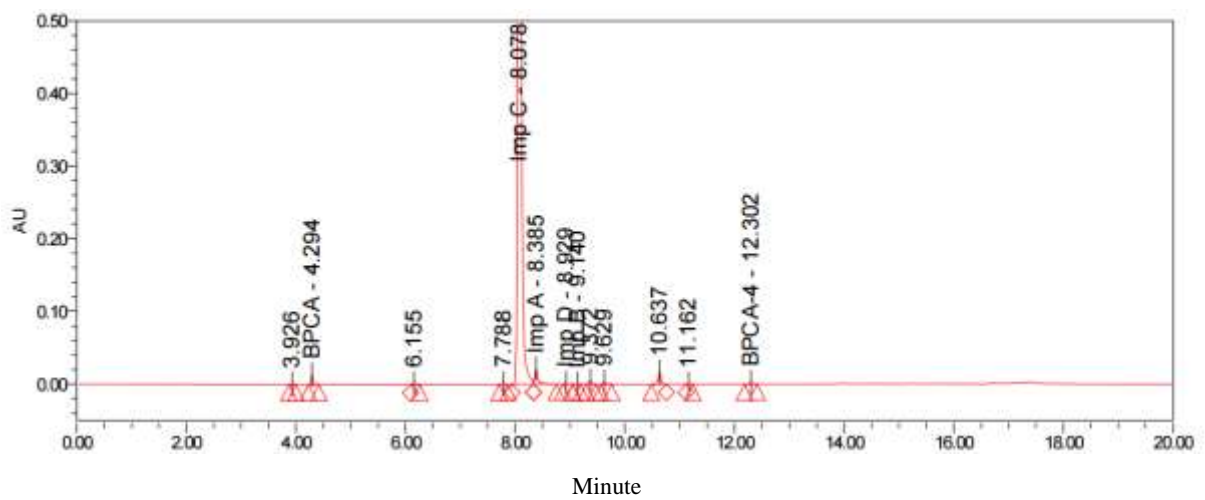
Kromatogram uzorka ELTC-1606.



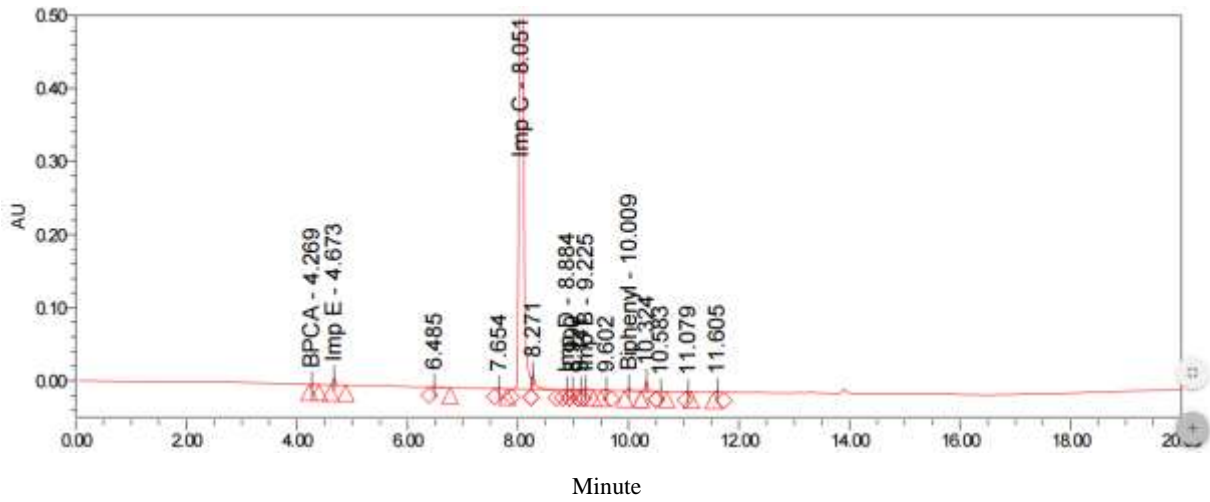
Kromatogram uzorka ELTC-1607.



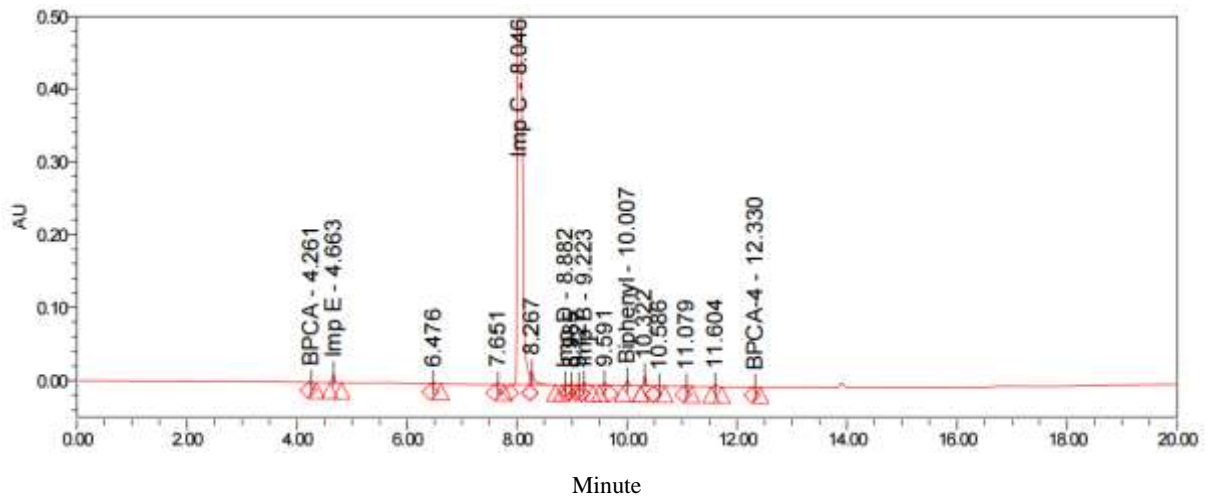
Kromatogram uzorka ELTC-1608.



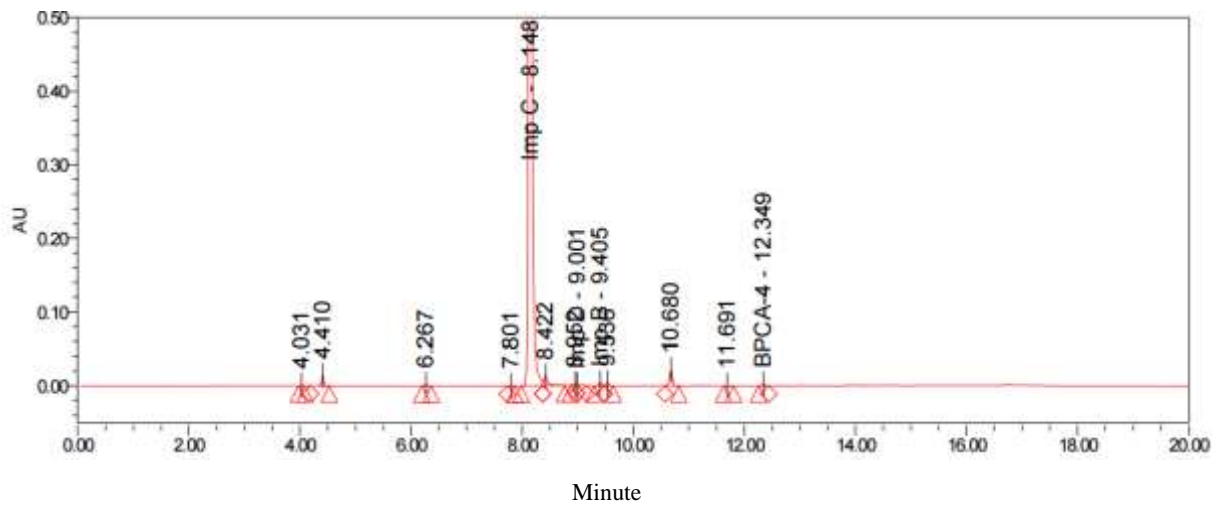
Kromatogram uzorka ELTC-1609.



Kromatogram uzorka ELTC-1610.



Kromatogram uzorka ELTC-1611.



Kromatogram uzorka ELTC-1612.