

Karakterizacija onečišćenja i optimizacija procesa proizvodnje Etil 5-(piperazin-1-il) benzofovan-2-karboksilata (PBCE)

Tomšić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:244646>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Filip Tomšić

**KARAKTERIZACIJA
ONEČIŠĆENJA I OPTIMIZACIJA
PROCESA PROIZVODNJE ETIL 5-
(PIPERAZIN-1-IL) BENZOFURAN-
2-KARBOKSILATA (PBCE)**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Pliva Hrvatska d.o.o., podružnici Savski Marof, odjelu za unaprjeđenje tehnoloških procesa i potporu proizvodnji pod voditeljstvom Alena Požgajčića, mag. ing. bioproc.

Zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Božidaru Šanteku i mag. ing. bioproc. Alenu Požgajčiću na neprocjenjivo vrijednoj pomoći, savjetima, strpljenju i dostupnosti prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Hvala svim djelatnicima Teva api MS&T tima na susretljivosti, vremenu i znanju koje su nesebično podijelili, Jasni Dogan iz Teva api R&D za pomoć pri izolaciji spoja te prof. dr. sc. Predragu Novaku na ustupljenom NMR uređaju. Veliko hvala prijateljima i curi Rebeci na pruženoj podršci i strpljenju, a najveće zahvale idu mojoj obitelji, roditeljima i braći na beskrajnoj ljubavi, podršci i svakom ohrabrenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

KARAKTERIZACIJA ONEČIŠĆENJA I OPTIMIZACIJA PROCESA PROIZVODNJE ETIL 5-(PIPERAZIN-1-IL) BENZOFORAN-2-KARBOKSILATA (PBCE)

Filip Tomšić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213889

Sažetak: Vilazodone je farmaceutski pripravak s primjenom u liječenju kliničke depresije. Prilikom sinteze Etil 5-(piperazin-1-il) benzofuran-2-karboksilata (PBCE), jednog od ishodišnih spojeva u sintezi Vilazodona zamijećena je prisutnost nepoznatog onečišćenja RRT 1,37. U sklopu ovog diplomskog rada provedena je sinteza, izolacija i karakterizacija prije spomenutog onečišćenja, kao i ispitivanje procesnih parametara na tijek i konačne produkte reakcije. Natrijev karbonat korišten je u reakcijama pripreme PBCE kao baza, dok je u reakcijama sinteze onečišćenja kao baza korišten trietilamin. Čistoća izoliranih spojeva određena je HPLC analizom, a na temelju LC-MS analize i NMR spektroskopije potvrđena je struktura onečišćenja.

Ključne riječi: Vilazodone, PBCE-HCl, sinteza i karakterizacija onečišćenja, spektralna analiza, optimizacija procesnih parametara

Rad sadrži: 58 stranica, 30 slika, 10 tablica, 4 sheme, 22 literaturna navoda

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. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: Alen Požgajčić, mag. ing. bioproc. (Pliva Hrvatska d.o.o., Savski Marof)

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Božidar Šantek (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Mario Novak (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (zamjenski član)

Datum obrane: 22. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical engineering

Laboratory for Biochemical engineering, Industrial microbiology and the Technology of beer and malt

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

IMPURITY CHARACTERIZATION AND PROCESS OPTIMISATION OF THE PRODUCTION OF ETHYL 5-(PIPERAZIN-1-YL)BENZOFURAN-2-CARBOXYLATE (PBCE)

Filip Tomšić, univ. bacc. ing. biotechn 0058213889

Abstract: Vilazodone is a pharmaceutical drug used in the treatment of clinical depression. During the synthesis of ethyl 5-(piperazin-1-yl)benzofuran-2-carboxylate (PBCE), a precursor in the synthesis of Vilazodone, an unknown impurity with a relative retention time of 1,37 was detected. In this graduate thesis, synthesis, isolation and characterization of the impurity RRT 1,37 was performed. Furthermore, the assaying of the influence of the reaction process parameters on the course of the reaction and final reaction products was carried out. Sodium carbonate was used as a deprotonating base in the PBCE synthesis reactions, while the triethylamine was used as a deprotonating base for the synthesis of the impurity RRT 1,37. The purity of the isolated products was confirmed using HPLC method. Spectral analysis of the impurity was carried out using LC-MS and NMR spectroscopy.

Keywords: Vilazodone, PBCE-HCl, impurity synthesis, spectral analysis, optimisation of process parameters

Thesis contains: 58 pages, 30 figures, 10 tables, 4 schemes, 22 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the

Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Božidar Šantek; PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Alen Požgajčić; Senior chemist, Pliva Croatia Ltd.*

Reviewers:

1. Blaženka, Kos, PhD, Full professor (president)
2. Božidar, Šantek, PhD, Full professor (mentor)
3. Mario, Novak, PhD, Associate professor (member)
4. Antonija, Trontel, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 22nd 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Onečišćenja u lijekovima	2
2.2. Sintetski put nastanka Vilazodona	3
2.3. Sintetski put nastanka PBCE HCl	3
2.4. Sinteza onečišćenja RRT 1,37	4
2.5. Metode karakterizacije	5
2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti.....	5
2.5.1.1. Pregled HPLC metoda	5
2.5.1.2. Komponente HPLC uređaja	7
2.5.1.3. Osnovni kromatografski deskriptori	8
2.5.2. Flash kromatografija	8
2.5.3. Tekućinska kromatografija – Masena spektrometrija (LC-MS).....	9
2.5.3.1. Masena spektrometrija	10
2.5.4. NMR	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije i otopine.....	14
3.1.2. Aparatura i pribor	15
3.2. Metode rada	16
3.2.1. Sinteza i izolacija PBCE HCl.....	16
3.2.2. Sinteza onečišćenja RRT 1,37.....	19
3.2.4. Analitičke metode	22
3.2.4.1. LC-MS analiza	22
3.2.4.2. HPLC analiza	23
3.2.4.3. Tankoslojna kromatografija	24
3.2.4.4. Flash kromatografija	24
3.2.4.5. Nuklearna magnetska rezonancija.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Rezultati sinteze i izolacije onečišćenja RRT 1,37	26
4.1.1. LC-MS karakterizacija onečišćenja RRT 1,37	26
4.1.2. HPLC analiza sinteze i izolacije onečišćenja RRT 1,37	30

4.1.3. Tankoslojna kromatografija	33
4.1.4. HPLC analiza uzorka pročišćenog flash kromatografijom	35
4.2. NMR analiza.....	36
4.3. Ispitivanje parametara koji utječu na sintezu onečišćenja RRT 1,37	40
4.3.1. Dodavanje natrijevog karbonata u reaktor pri različitim temperaturama	40
4.3.2. Brzina rotacije miješala u reaktoru	40
4.3.3. Količina dodane baze i način dodavanja baze.....	41
4.4. Mehanizam sinteze onečišćenja RRT 1,37	44
5. ZAKLJUČAK	46
6. POPIS LITERATURE.....	47

1. UVOD

Vilazodone je farmaceutski pripravak korišten u liječenju kliničke depresije kojeg je razvila kompanija Forest Laboratories Inc. (licenciran od strane Merck-a) pod službenim nazivom proizvoda VIIBRYD™. Klinička depresija očituje se kroz niz psihofizičkih simptoma koji se izraženije manifestiraju tijekom depresivnih epizoda karakteriziranih depresivnim i disfornim raspoloženjem koje se vidljivo odražava na svakodnevicu pojedinca (Otte i sur., 2016). Prema mehanizmu djelovanja, Vilazodone spada u skupinu selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina, a djeluje i kao djelomičan antagonist 5-HT_{1A} receptora serotonina (Savitz i sur., 2009). Proces sinteze istraživanog lijeka odvija se kroz pet glavnih koraka. U početnom koraku sinteze, u reakciji sinteze Etil 5-(piperazin-1-il)benzofuran-2-karboksilata (PBCE) zamijećena je prisutnost onečišćenja relativnog vremena zadržavanja molekule na kromatografskoj koloni u odnosu na referentnu molekulu (RRT) u iznosu od RRT 1,37. Osim što je jedan od prekursora u sintezi Vilazodona, PBCE i sam pokazuje izraženu inhibicijsku aktivnost prema DNA girazi B u bakterijama *Mycobacterium smegmatis* (Reddy i sur., 2014).

U sklopu ovog rada provedeni su eksperimenti s ciljem sinteze i izolacije onečišćenja RRT 1,37 i njegove karakterizacije kako bi se mogao koristiti kao standard za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC). Također su napravljena mjerenja procesnih parametara u svrhu razumijevanja mehanizma nastanka onečišćenja i smanjenja istog u finalnom proizvodu.

2. TEORIJSKI DIO

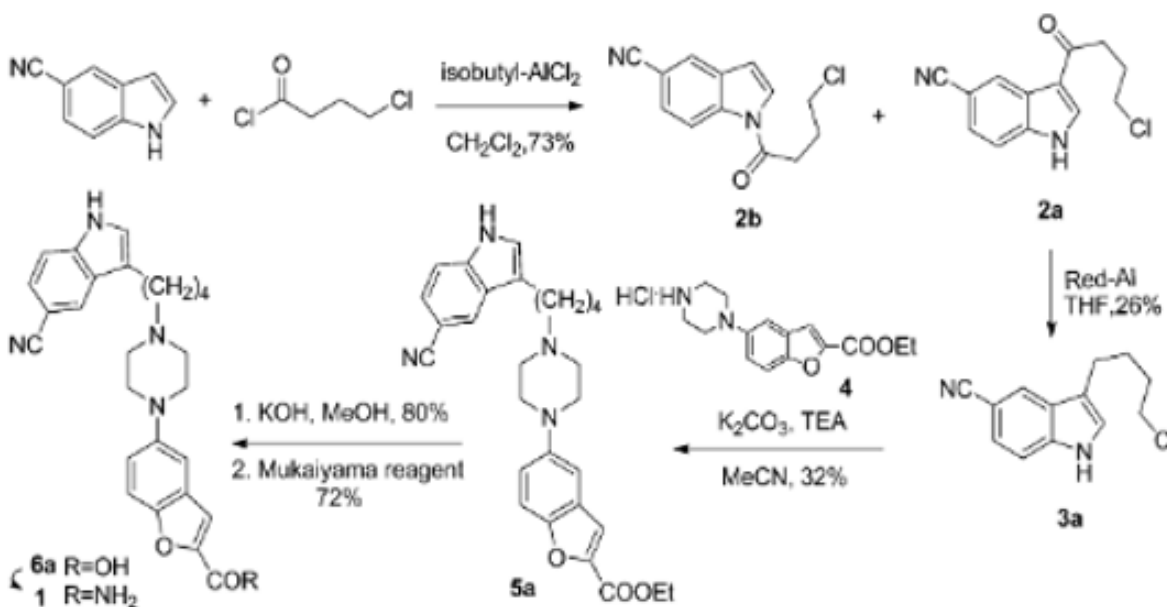
2.1. Onečišćenja u lijekovima

Prisutnost onečišćenja u farmaceutskim proizvodima potrebno je u potpunosti izbjeći ili svesti na koncentraciju unutar zadanih dopuštenih parametara diktiranih od strane farmakopeje i nacionalne agencije. S obzirom da su različite nacionalne farmakopeje i nacionalne agencije imale različite definicije, standarde i pravilnike o onečišćenjima u lijekovima, organizirana je Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH), zajednička inicijativa regulatornih tijela i proizvođača lijekova s područja Europske unije, Sjedinjenih Američkih Država i Japana radi usklađivanja standarda i zakonske regulative zbog bržeg stavljanja lijekova u promet uz očuvanje dobrobiti pacijenata (Nigović i Sertić, 2012).

Prema ICH smjernicama, onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili pri skladištenju ljekovite tvari ili gotovog lijeka. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju početne sirovine, nusprodukte, međuprodukte i razgradne produkte. Anorganska onečišćenja uglavnom zaostaju iz proizvodnog procesa, najčešće su poznata i identificirana, a obuhvaćaju anorganske katalizatore, reagense i ligande, anorganske soli i ostale tvorevine poput drvenog ugljena i tvari koje se rabe za filtraciju poput dijatomejske zemlje, silika gela, celuloze te teške metale i druge zaostale metale. Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske kemijske tvari koje se rabe ili nastaju u postupku proizvodnje lijeka. ICH smjernice propisuju granice za otapala koja mogu zaostati u ljekovitim i pomoćnim tvarima nakon proizvodnje, a one ovise o toksičnosti otapala, načinu primjene i dozama lijeka. Ovisno o potencijalnom riziku za ljudsko zdravlje, ostatna otapala su podijeljena u tri skupine. Prva skupina ostatnih otapala obuhvaća otapala koja se moraju izbjegavati zbog dokazane kancerogenosti ili snažne sumnje na kancerogenost u ljudi te otapala opasna za okoliš. Druga skupina su otapala čija upotreba treba biti ograničena zbog moguće neurotoksičnosti, teratogenosti i drugih tipova toksičnosti. Treća skupina ostatnih otapala su otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi (Nigović i Sertić, 2012).

2.2. Sintetski put nastanka Vilazodona

Sinteza Vilazodona (slika 1) odvija se u 5 glavnih koraka, a započinje Friedel-Craftsovom acilacijom 1-tosil-1H-indol-5-karbonitrila s 4-klorobutiril kloridom, uz prisustvo izobutil- AlCl_2 i 73 % diklormetana (CH_2Cl_2). Slijedi selektivna deoksigenacija u $\text{NaBH}_4/\text{CF}_3\text{COOH}$ sustavu te kondenzacija s etil 5-(piperazin-1-il)benzofuran-2-karboksilat hidrokloridom. Nadalje, provodi se jednostupanjska reakcija deprotekcije i esterolize, nakon kojih slijedi konačna amonoliza koja tvori finalni produkt (Hu i sur., 2012).

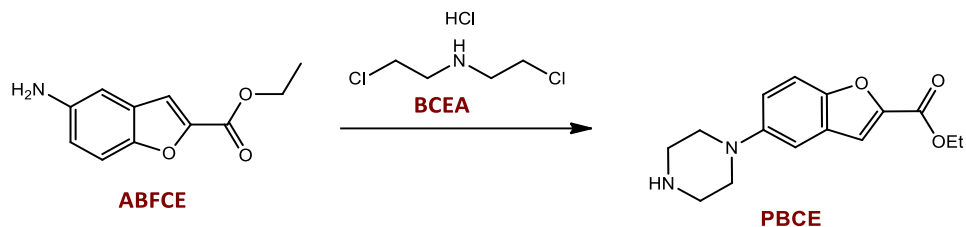


Slika 1. Sintetski put sinteze Vilazodona (Hu i sur., 2012)

2.3. Sintetski put nastanka PBCE HCl

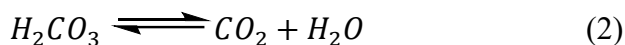
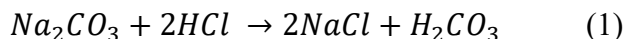
Reakcija sinteze soli etil 5-(piperazin-1-il)benzofuran-2-karboksilat hidroklorida (PBCE HCl), jedne od ishodišnih molekula za pripremu APIja (aktivna farmaceutska supstanca) Vilazodona odvija se mehanizmom nukleofilne alifatske supstitucije (Böttcher i sur., 1996).

Reakcija se provodi u jednom koraku, a odvija se u n-butanolu kao otapalu. Na slici 2. je prikazana reakcijska shema. Etil 5-amino-1-benzofuran-2-karboksilat (ABFCE) reagira s bis (2-kloroetil)amin hidrokloridom (BCEA HCl) uz prisustvo baze koja neutralizira oslobođenu klorovodičnu kiselinu. Kao baze za neutralizaciju klorovodične kiseline mogu se koristiti organske baze kao što su trietilamin (TEA) ili anorganske baze poput natrijevog hidroksida ili karbonatnih soli.



Slika 2. Reakcijska shema sinteze PBCE (vlastita fotografija, 2023)

BCEA HCl drugi je reaktant reakcije te se dodaje u suvišku, pri čemu je na temelju provedenih eksperimenata tijekom razvoja procesa utvrđena optimalna količina od 2,3 ekvivalenta (eq), budući da u tom slučaju dolazi do sinteze najmanje količine neželjenih onečišćenja. U prvotnom obliku, BCEA HCl je sol topiva u vodi, a slabije topiva u organskim otapalima. Budući da se reakcija provodi u n-butanolu, BCEA-HCl potrebno je prebaciti u bazni oblik molekule, koji je topiv u reakcijskom sustavu, što se postiže dodatkom natrijevog karbonata u reakciju. Neutralizacijom klorovodične kiseline, nastaje ugljična kiselina koja potom u kiselim uvjetima izomerizira u CO₂ i vodu te izlazi iz reakcijske smjese kao plin (kemijska reakcija 1 i 2).



2.4. Sinteza onečišćenja RRT 1,37

Tijekom razvoja procesa sinteze PBCE HCl, u reakcijskoj smjesi osim reaktanata i produkata uočeno je onečišćenje RRT 1,37 (relativno vrijeme zadržavanja uzorka na koloni) koje se pojavljuje tijekom reakcije. Prilikom izolacije kristala PBCE baze, ono odlazi u matičnom lugu reakcije. Radi boljeg razumijevanja procesa i nastanka samog onečišćenja te bolje kvalitete intermedijera, krenulo se u sintezu istog. Korištenjem podataka dobivenih u eksperimentima optimizacije procesnih parametara reakcije dobivanja PBCE, pretpostavljeni su uvjeti reakcije optimalni za sintezu što veće količine onečišćenja RRT 1,37. U ulozi baze, umjesto natrijevog karbonata korišten je trietilamin. Pretpostavlja se da je detektirano onečišćenje dimer dvije molekule ABFCE-a, stoga je ABFCE dodan u suvišku. Provedena su dva eksperimenta u kojima je varirana koncentracija korištenog BCEA.

2.5. Metode karakterizacije

2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*-HPLC) je oblik kromatografije na stupcu koja omogućava razdvajanje smjesa dviju ili više tvari dispergiranih u otapalu. Jedna je od najčešće korištenih kromatografskih metoda koja se primjenjuje u brojnim laboratorijskim analizama budući da omogućuje razdvajanje i izolaciju tvari vrlo sličnih struktura i kemijskih karakteristika. Proces razdvajanja komponenata u smjesi temelji se na međusobnoj interakciji između tvari otopljenih u mobilnoj fazi i stacionarne faze. Tvari otopljene u mobilnoj fazi u različitoj mjeri stupaju u interakciju sa stacionarnom fazom što rezultira različitom raspodjelom tvari između mobilne i stacionarne faze. Razlog različitom zadržavanju analita na stacionarnoj fazi kolone ovisi o izvedbi same kolone. Obzirom na dominantni tip molekularnih interakcija na kojima se temelji mehanizam separacije analita na HPLC koloni, najpoznatije izvedbe uređaja uključuju kromatografiju normalnih i obrnutih faza, kromatografiju isključenjem po veličini i ionsko-izmjenjivačku kromatografiju (Andrews, 2000). Osnovne molekulske interakcije čijim djelovanjem dolazi do različite raspodjele komponenata razdvajanih smjesa su Van der Waalove sile, dipol-dipol i ion-dipol privlačenja, sile elektrostatskog privlačenja i odbijanja, Coulombove sile i vodikove veze (Zotou, 2012).

2.5.1.1. Pregled HPLC metoda

Kromatografija normalnih faza sastoji se od polarne stacionarne faze i nepolarne mobilne faze u kojoj je otopljen analit. Proces separacije odvija se zbog razlike u jakosti polarnih interakcija između analita u uzorku i mjesta za vezanje analita na stacionarnoj fazi sustava. Što je veza između analita i stacionarne faze jača, duža je retencija analita tijekom ispiranja kolone. Elucija se provodi korištenjem polarnih otapala prema kojima ciljani analit ima veći afinitet vezanja u odnosu na stacionarnu fazu. Kolona normalnih faza najčešće je punjena inertnom stacionarnom fazom u obliku kuglica promjera 5 μm , građenom od poroznih oksida poput aluminijevog (Al_2O_3) ili silicijevog dioksida (SiO_2). Površina stacionarne faze prekrivena je gustom koncentracijom OH⁻ grupa koje daju površini stacionarne faze izrazito polarni karakter (Kazakevich i LoBrutto, 2007).

Separacija na koloni obrnutih faza temelji se poglavito na djelovanju intermolekularnih interakcija, hidrofobnih interakcija i Van der Waalovih sila. Uspoređujući s kromatografijom normalnih faza, polarlost mobilne i stacionarne faze je obrnuta. Površina stacionarne faze

hidrofobnog je karaktera, najčešće na bazi silika gela modificiranog vezanjem liganda alkilne, arilne, amino, cijano, nitro ili diolne skupine. Polarna mobilna faza najčešće je smjesa vode i polarnih organskih otapala poput metanola ili acetonitrila. Analit otopljen u mobilnoj fazi nanosi se na kolonu te dolazi do hidrofobnih interakcija između analita u mobilnoj fazi i liganada vezanih na stacionarnu fazu. Eluacija analita provodi se dodatkom organskog otapala, a primjenom gradijentne elucije, molekule analita sa stacionarne faze eluiraju se prema stupnju izraženosti hidrofobnog karaktera (Kazakevich i LoBrutto, 2007). Kromatografija obrnutih faza omogućava razdvajanje homolognih i izomernih spojeva slične polarnosti koje nije moguće razdvojiti primjenom kromatografskog sustava normalnih faza, kao i razdvajanje velikog broja biokemijskih spojeva. Metoda je lako prilagodljiva mobilnim fazama različitih karakteristika te omogućava vrlo visoku razinu produktivnosti a dugotrajna stabilnost korištenih materijala pri širokom spektru procesnih uvjeta osigurava visoku reproducibilnost metode (Aguilar i Hearn, 1996).

Dok se kod ostalih kromatografskih metoda separacija temelji na različitim međumolekulskim interakcijama između analita i stacionarne faze, kod kromatografije isključenjem po veličini (*size-exclusion chromatography*) separacija se odvija isključivo na temelju hidrodinamičke veličine čestica. Ova kromatografska metoda primjenjuje se za izdvajanje nečistoća relativno velike molekulske mase. Kolone se najčešće formiraju od čestica silika gela veličine oko 5 mm koje se dodatno premazuju hidrofilnim polimerima. Proces je vremenski neefikasan, a korištene kolone su skupe (Broeckhoven i Desmet, 2021).

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija omogućava separaciju iona i polarnih molekula na temelju njihovog afiniteta prema ionskim izmjenjivačima. Prema vrsti naboja postoje dvije vrste ionsko izmjenjivačkih kolona, anionski i kationski izmjenjivači. Anionski izmjenjivači na sebi imaju pozitivno nabijene skupine koje privlače negativno nabijene anione. Kationski izmjenjivači imaju negativno nabijene skupine stoga privlače pozitivno nabijene katione. Četiri najčešće korištene ionske skupine na ionsko-izmjenjivačkim kolonama su sulfatni ion (jaki kationski izmjenjivač), karbonatni ion (slabi kationski izmjenjivač), kvarterni amini (jaki anionski izmjenjivač) i tercijarni amini (slabi anionski izmjenjivač). Mobilnu fazu čini vodeni puferski sustav u kojem je otopljen analit. Inertna stacionarna faza najčešće je građena od unakrsno povezanog stiren-divinilbenzena, a ionske skupine vezane su na stacionarnu fazu preko fenilnih prstenova. Intenzivno se primjenjuje za izdvajanje nabijenih molekula poput proteina, peptida i

nukleinskih kiselina na temelju stvaranja ionskih veza između nabijenih skupina molekula analita i stacionarne faze (Kazakevich i LoBrutto, 2007). Veliki kapacitet, vrlo široka mogućnost primjene, mogućnost postizanja vrlo visokog stupnja razdvajanja, jednostavnost provođenja i prevođenja u veće mjerilo kao i niski troškovi samo su neki od razloga koji čine ovu metodu jednu od najraznovrsnijih i najšire korištenih metoda tekućinske kromatografije (Cummins i sur., 2017).

2.5.1.2. Komponente HPLC uređaja

Osnovne komponente uređaja za provođenje HPLC kromatografije čine pumpa, injektor, kolona u kojoj dolazi do izdvajanja ciljanog analita iz početne suspenzije i detektor koji signalizira prisutnost traženog analita u eluatu. HPLC kromatografija provodi se pri uvjetima visokog tlaka koji ovisno o izvedbi uređaja i zahtjevima metode može varirati između 30 i 350 bara. Spomenuti uvjeti tlaka ne mogu se postići djelovanjem kapilarnosti i sile gravitacije, stoga se koriste pumpe koje pod tlakom uvode mobilnu fazu kako bi joj omogućili prolaz kroz gusto zbijenu kolonu. Najčešće se koriste klipna i pneumatska pumpa. Osnovni zahtjevi koje pumpe moraju zadovoljiti uključuju prilagodljivost širokom spektru procesnih uvjeta i vrstama mobilnih faza, stvaranje jednolikog pritiska kroz cijeli sustav bez nepoželjnih fluktuacija, održavanje konstantnog protoka, lako rukovanje i kompaktnost kao i prihvatljivu cijenu (Broeckhoven i Desmet, 2021).

Injektor je zadužen za ubrizgavanje uzorka u HPLC kolonu pod zadanim pritiskom koji je uvijek konstantan. Injektor mora zadovoljavati niz zahtjeva, od kojih je najvažniji vrlo mali injekcijski volumen, najčešće od 20 do 200 μL . Također, injektirani uzorak mora biti prethodno obrađen i bez ikakvih stranih čvrstih čestica. Injektiranje uzorka moguće je samo kada je protok mobilne faze kroz kolonu konstantan, a prisutnost mjehurića zraka prilikom injektiranja nije dopuštena. Injektorski sustav kontrolira se preko programa HPLC uređaja. Kromatografska kolona najvažniji je dio cijelog HPLC uređaja. Glavna uloga kolone je separacija ciljanih analita na temelju različitih fizikalnih i kemijskih svojstava. Vanjsko metalno kućište u obliku cijevi sadržava stacionarnu fazu (često u obliku kuglica) na koju su, ovisno o vrsti kromatografije, vezane različite kemijske skupine ili ligandi sa zadaćom privremenog zadržavanja analita iz mobilne faze formiranjem reverzibilnih veza. Na izlazu iz kolone nalazi se filter koji omogućava prolaz mobilnoj fazi i u njoj otopljenim tvarima, a sprječava izlaz dijelova stacionarne faze iz kolone (Majors, 2004).

2.5.1.3. Osnovni kromatografski deskriptori

Najvažniji parametri za procjenu kvalitete raspodjele analiziranog uzorka kroz kromatografsku kolonu uključuju vrijeme zadržavanja, efikasnost, selektivnost i rezoluciju kolone. Vrijeme zadržavanja ili faktor retencije je bezdimenzijska veličina koja služi kao indikator vremena zadržavanja neke čestice u kromatografskoj koloni. Ne ovisi o dimenzijama kolone i protoku mobilne faze stoga je vrlo koristan podatak koji se može primijeniti kroz čitav niz različitih HPLC sustava i uvjeta provođenja. Efikasnost je mjera disperzije zabilježenog pika promatranog analita na izlazu iz kolone. Izražava se preko broja teoretskih stupnjeva. U slučaju idealne kolone, detektirani pikovi na izlazu iz kolone slijede raspodjelu Gaussove krivulje. Varijanca pikova je u tom slučaju proporcionalna koeficijentu difuzije. U realnim uvjetima, krivulja koja opisuje signal analita na izlazu iz kolone odstupa od idealne raspodjele Gaussove krivulje. Razlog odstupanja i posljedičnog širenja signala može se objasniti trima procesima koji se odvijaju unutar same kolone, Eddijevom difuzijom, molekularnom difuzijom i prijenosom mase. Eddijeva difuzija objašnjava pojavu kada se različite molekule gibaju putevima različitih duljina kroz porozni medij. Molekularna difuzija je slučajno spontano mikroskopsko gibanje pojedinačnih molekula u plinu, kapljevini ili čvrstoj tvari, a javlja se kao rezultat toplinskog gibanja. Obrnuto je proporcionalna brzini protoka. Prijenos mase kroz kolonu proporcionalan je brzini protoka, stoga što je protok kroz kolonu brži, utjecaj prijenosa mase na širenje pika je izraženiji. Selektivnost je sposobnost kromatografskog sistema da razlikuje dva različita analita. Definira se kao omjer korespondirajućih retencijskih faktora. Rezolucija je sposobnost kolone da prepozna i razdvoji dva vrlo slična analita kao dva zasebna signala. To je mjera separacije na koju utječu disperzija pika i selektivnost. U slučaju postizanja nezadovoljavajuće rezolucije na koloni, povećanje rezolucije može se postići povećanjem efektivnosti ili povećanjem selektivnosti kolone (Kazakevich i LoBrutto, 2007).

2.5.2. Flash kromatografija

Flash kromatografija preparativna je kromatografska metoda koja se može izvoditi pri širem spektru tlakova koji ubrzavaju protok mobilne faze niz kolonu, uz korištenje specijaliziranih kromatografskih kolona sa sitnijom granulacijom čestica od konvencionalnih kolona. Princip razdvajanja sastavnih komponenata smjesa flash kromatografijom temelji se na uporabi smjese dvaju otapala suprotnih polarnosti u različitim omjerima (Roge i sur., 2011).

Mobilna faza korištena u flash kromatografiji najčešće je smjesa polarnog i nepolarnog otapala. Promjenom omjera otapala sastavnica mobilne faze postiže se gradijentna promjena polarnosti mobilne faze, najčešće od manje polarnog prema polarnijem, što omogućuje vrlo kvalitetno razdvajanje komponenata smjese. Prije provođenja flash kromatografije potrebno je odabrati otapala za mobilnu fazu u kojima ispitivani uzorak pokazuje najbolju pokretljivost koja se ispituje primjenom ispitivanih otapala kao mobilnih faza u procesu tankoslojne kromatografije (engl. *thin layer chromatography* – TLC). Najčešće korištena smjesa otapala sastoji se od diklormetana i metanola (Roge i sur., 2011). U ulozi stacionarne faze sustava najčešće se koriste silika gel i aluminijev oksid. Veličina čestica adsorbensa korištenih za flash kromatografiju manja je od adsorbensa korištenih za kromatografske metode u kojima je gravitacija pokretačka sila mobilne faze. Program uređaja sprema različite komponente razdvajane smjese u zasebne frakcije na temelju podataka prikupljenih detektorom na izlazu iz kolone. Nakon provedenog razdvajanja dostupan je kromatogram koji prikazuje svaku detektiranu komponentu, visine pikova svake komponente i podatke o vremenu elucije pojedinih komponenata. Flash kromatografija primjenjuje se za izdvajanje komponenata iz većih volumena uzoraka s ciljem provođenja daljnjih koraka karakterizacije pojedinih komponenata visoko sofisticiranim metodama poput HPLC i NMR analize. Prednosti ove metode su brzina izolacije, jednostavnost izvođenja i ekonomičnost procesa (Sravani, 2018).

2.5.3. Tekućinska kromatografija – Masena spektrometrija (LC-MS)

LC-MS (engl. *liquid chromatography - mass spectrometry*) analiza utjelovljuje kombinaciju dvije vrlo potentne analitičke metode, tekućinsku kromatografiju uparenu sa masenom spektrometrijom koje zajedno čine sveobuhvatnu analitičku metodu sa vrlo raširenom primjenom u istraživanju lijekova te kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi onečišćenja. HPLC komponenta s visokim stupnjem razlučivosti razdvaja i pročišćava gotovo svaku smjesu organskih spojeva, a daljnjom analizom razdvojenih komponenata masenim spektrometrom određuje se struktura i molekulska masa ispitivanih analita. Osnovni dijelovi HPLC komponente LC/MS sustava čine sustav pumpi, injektor i kolona. Najbitnija zadaća pumpe je omogućiti stabilan konstantan protok mobilne faze između 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ do 2 ml/min , budući da fluktuacije u protoku mogu rezultirati nekonzistentnim očitanjima signala masenog spektrometra. U tu svrhu najčešće se koriste razne izvedbe klipnih pumpi. U ulozi injektora u HPLC sustavu, najčešće se koristi *loop* injektor (Ardrey, 2003).

Značajan utjecaj na kvalitetu provedene LC/MS analize ima volumen eluenta s kojim na maseni analizator dolazi analizirana komponenta. U slučaju direktnog uvođenja eluiranog sadržaja sa HPLC kolone na maseni analizator, signal otapala vrlo lako preplavljuje signal analizirane komponente. Kako bi se izbjegla navedena pojava, izlazni tok HPLC kolone povezuje se sa masenim spektrometrom uz uvođenje integriranog sustava za odstranjivanje otapala. Također, prije izvođenja MS analize, potrebno je ukloniti potencijalno prisutne neisparljive komponente reagenasa za sparivanje iona kao i puferskih komponenata iz eluiranog uzorka. Direktno uvođenje anorganskih komponenata, korištenih za sparivanje iona, u uvjete visokog vakuuma uzrokuje gubitak signala sustava, dok puferi, organski i anorganski, preplavljaju analizator mase i detektor. Kako bi se spriječili navedeni problemi, neisparljive komponente mijenjaju se lako isparljivima što omogućava njihovo odstranjivanje. Spregu između HPLC komponente i masenog spektrometra čini evaporizirajuće ionizirajuće sučelje. Glavna uloga ovog sučelja je otparavanje tekućine, ionizacija neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator uređaja (Ardrey, 2003).

2.5.3.1. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija razdvaja ionizirane molekule na temelju razlike u omjeru mase i naboja. Neizostavan je alat moderne znanosti koji omogućava određivanje relativne mase atoma i molekula kao i količine iona nastalih ionizacijom atoma i molekula te raspadom ioniziranih molekula uzorka. Osnovni dijelovi masenog spektrometra su sustav za unošenje uzorka, ionizator, analizator i detektor. Prvi korak analize masenim spektrometrom je ionizacija koja podrazumijeva dovođenje energije do ispitivanog atoma ili molekule uz posljedično izbacivanje jednog ili više elektrona iz ispitivanog atoma ili molekule. Kao rezultat ionizacije često dolazi do fragmentacije molekula. Snaga ionizacije, te posljedično i stupanj fragmentacije ovisi o količini energije koja se predaje analitu. Postoji nekoliko ionizacijskih metoda od kojih su najčešće korištene elektrosprej ionizacija (engl. *Electrospray ionisation* – ESI) i matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionisation* – MALDI). Elektrosprej ionizacija ionizira analit u obliku otopine. Temelji se na formiranju sitnih kapljica analita propuštanjem tekućeg analita kroz kapilaru na čiji je vrh priključeno jako električno polje (3-4 kV). Na izlazu iz kapilare uzorak se raspršuje u aerosol jako nabijenih kapi koje se provode kroz struju vrućeg plina, primjerice dušika, pri čemu otapalo isparava što dovodi do raspršivanja kapi u još sitnije kapljice sve do formiranja pojedinačnih ioniziranih molekula. Ionizirane molekule ulaze u područje vakuuma preko elektrostatski nabijenih pločica. Ionizacija se odvija pri atmosferskom tlaku pri

100 °C, uz vrijednosti protoka od 5 do 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$. ESI se najviše primjenjuje pri ionizaciji velikih bioloških molekula. Nakon procesa ionizacije, ionizirane molekule ulaze u područje vakuuma preko elektrostatski nabijenih pločica. Analizator razdvaja ione različitog omjera mase i naboja. Postoji nekoliko različitih izvedbi analizatora, a najzastupljeniji je kvadrupol analizator. Sastoji se od 4 metalna štapića u ulozi elektroda koji su raspoređeni kao dva okomito položena para. Prvi par spojen je na konstantni napon određenog iznosa i promjenjivu radiofrekvenciju, dok je drugi par spojen na radiofrekvenciju i napon suprotnih polarnosti. Pri danim uvjetima frekvencije i napona u analizatoru samo ioni specifičnog omjera mase i naboja prolaze do detektora. Variranje različitih frekvencija u analizatoru omogućava prolaz iona različitih vrijednosti omjera mase i naboja kroz analizator u fokus detektora (Herbert i Johnstone, 2002).

U sklopu ovog istraživanja korišten je spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom (engl. triple quadrupol, QQQ) kojeg čine tri serijski vezana kvadrupola koji omogućuju uspješniju karakterizaciju uzoraka. Prvi i treći kvadrupol služe za selekciju iona, dok je drugi kvadrupol korišten za fragmentaciju iona bombardiranjem molekula uzoraka inertnim plinom (engl. *Collision Induced Dissociation* – CID) (Cindrić i sur., 2008).

2.5.4. NMR

Nuklearna magnetska rezonancija najmoćnija je metoda određivanja strukture organskih i anorganskih spojeva. Temelji se na sposobnosti jezgre atoma da u magnetnom polju apsorbira energiju elektromagnetskog impulsa i zatim je emitira sa specifičnom rezonancijskom frekvencijom (40–1000 MHz) koja je proporcionalna jakosti magnetskog polja. Za provedbu mjerenja nuklearne magnetske rezonancije mogu se na temelju njihovih magnetskih svojstava analizirati različite vrste atoma od kojih su najčešće korišteni ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P . Izlaganjem jezgre ciljanog atoma vanjskom magnetskom polju jezgra atoma može zauzeti dva različita energetska stanja. Samo stabilni izotopi s neparnim brojem protona i/ili neutrona u jezgri prilikom izlaganja djelovanju vanjskog magnetskog polja poprimaju vrijednost spina različitu od nule, dok oni sa parnim brojem protona ili neutrona nemaju spin. U slučaju zauzimanja spina orijentacije jednake vanjskom magnetskom polju (alfa-spin), jezgra ima niže energetske stanje. Izlaganje jezgre dodatnom elektromagnetskom zračenju može rezultirati pojavom rezonancije, kratkotrajnog izvrtanja jezgre i njezine reorijentacije u smjeru suprotnom od vanjskog magnetskog polja (*beta-spin*) čime jezgra zauzima više energetske stanje. Do pojave rezonancije dolazi samo

u slučaju kada primijenjena radiofrekvencija odgovara energetskej razlici između dva stanja spina u konstantnom magnetskom polju. Frekvencija zračenja potrebna za poticanje izvrtanja jezgre raste s porastom jakosti magnetskog polja, a odgovara frekvenciji radiovalova te je jedinstvena za svaku vrstu molekule. Razlika u energiji dva opisana stanja spina direktno je proporcionalna snazi vanjskog magnetskog polja u kojem se atom nalazi. Položaj jezgre orijentiran suprotno od vanjskog magnetskog polja je nestabilan što rezultira relaksacijom i ponovnim usmjeravanjem jezgre atoma u pravcu vanjskog magnetskog polja uz emisiju elektromagnetskog signala kojeg bilježi radiofrekventni prijemnik. Signal koji se emitira naziva se FID odnosno slobodni induksijski raspad. On se detektira, digitalizira i prevodi u NMR spektar Fourierovom transformacijom. Dobiveni spektar prikazuje apsorpciju radiofrekventnog zračenja u odnosu na kemijski pomak (Rhodes, 2017).

^1H NMR je jedna od najčešće korištenih jednodimenzionalnih izvedbi uređaja koja na temelju magnetskih svojstava analizira ^1H protone. Signali pikova prikazani su u jednoj dimenziji, na x – osi spektra, dok je intenzitet pikova prikazan na y – osi. Broj signala koje detektor prepoznaje odgovara broju različitih vrsta vodikovih atoma u molekuli. Površina ispod detektiranog signala proporcionalna je broju vodikovih atoma iste vrste na koje se taj signal odnosi. Na temelju kemijskog pomaka moguće je zaključiti od koje je vrste vodikovih atoma signal nastao. Cijepanje signala upućuje na broj susjednih vodikovih atoma prisutnih u molekuli ispitivanog uzorka (Balci, 2005).

Dvodimenzionalna nuklearna magnetska spektroskopija (2D NMR) obuhvaća niz NMR metoda koje prikazuju podatke zabilježenih spektara prikazane u dvije dimenzije u prostoru, na osima x i y, a intenzitet pikova 2D spektara prikazan je na z – osi. Najpoznatije izvedbe 2D NMR spektroskopije su COSY (engl. correlation spectroscopy), HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*) i NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect*) spektroskopija. COSY spektroskopija jedna je od najpopularnijih 2D NMR metoda. Koristi se za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege kroz dvije ili tri kemijske veze. Mjerenje signala provodi se djelovanjem dva radiofrekvencijska pulsa od 90° (F1 i F2) na promatrani uzorak čijim djelovanjem dolazi do pobuđivanja pojedinih atoma u molekuli što rezultira emisijom signala pobuđenih atoma prilikom vraćanja pobuđenog atoma u početno energetsko stanje. Emitirani signali pobuđenih atoma bilježe kao signali NMR spektra, pri čemu je spektar dobiven impulsom

F1 prikazan na osi y, dok je spektar impulsa F2 prikazan na x – osi. Formirani dvodimenzionalni spektar prikazuje frekvencije jednog izotopa, najčešće ^1H atoma na obje osi spektra. Pikovi smješteni na dijagonali spektra predstavljaju pikove zabilježene jednodimenzionalnom NMR analizom, dok pikovi koji se nalaze izvan centralne dijagonale predstavljaju pojavu cijepanja signala pojedinih atoma, točnije njihovu bliskost u 3D strukturi molekule. Heteronuklearna jednostruka kvantna koherentna spektroskopija (engl. *heteronuclear single quantum coherence spectroscopy* – HSQC) vrsta je dvodimenzionalne NMR spektroskopije s vrlo raširenom primjenom u identifikaciji i potvrđivanju struktura složenih molekula. HSQC spektroskopijom određuju se korelacije između dvije različite jezgre, najčešće između ^1H protona i jezgre atoma različitog od ^1H , najčešće ^{13}C atoma pri čemu su protoni vodika direktno vezani na heteroatom. Spektar dobiven HSQC spektroskopijom je dvodimenzionalan, ^1H spektar najčešće je prikazan na x – osi, dok je spektar ^{13}C atoma obično prikazan na y – osi spektra. Korelacijom zabilježenih signala u HSQC spektru s pikovima jednodimenzionalnih spektara ^1H i ^{13}C atoma smještenim na x i y – osima određuju se atomi koji su međusobno direktno povezani jednostrukom vezom. Svaki pik prikazan na HSQC spektru pripada jedinstvenom ^1H protonu, budući da svaki proton promatrane molekule može biti vezan samo na jedan ugljikov atom. S druge strane, više ^1H protona mogu biti vezani na isti ugljikov atom (Emwas i sur., 2015).

Nuklearni Overhauser efekt spektroskopija (NOESY) vrlo je moćna varijacija dvodimenzionalne NMR spektroskopije koja se temelji na pojavi prenošenja magnetizma jedne pobuđene jezgre na drugu jezgru ukoliko je njihova međusobna udaljenost manja od 5 Angstroma, neovisno o postojanju kemijske veze između promatranih jezgara. Na temelju NOESY spektra moguće je predvidjeti realnu 3D strukturu istraživane molekule. Sastavne komponente svakog uređaja za NMR-spektroskopiju uključuju magnet, odašiljač elektromagnetskog zračenja, detektor i pisac. Magnet je zadužen za stvaranje vanjskog magnetskog polja. Odašiljač elektromagnetskog zračenja emitira radiofrekvenciju potrebnu za pobuđivanje jezgri i izvrtnje spinova. Detektor detektira energiju koja nastaje kao rezultat emisije energije prilikom vraćanja pobuđene jezgre iz višeg u niže energetske stanje spina. Pisac ispisuje signal kojeg bilježi detektor (Neuhaus, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i otopine

Tablica 1. Kemikalije korištene za pripravu i analizu spojeva

Kemikalija	Batch No.	Proizvođač
ABFCE	70440722	Pliva
BCEA HCl	70730322	Pliva
n-Butanol	68271020	Pliva
Natrijev karbonat	70820522	Pliva
Diklormetan	68210722	Pliva
Acetonitril	68470122	Pliva
3.5 M HCl u n-Butanolu	47310622	Pliva
Trifluoroctena kiselina	T6508-25ML	Sigma-Aldrich
Visoko pročišćena voda	Z0844633-250	Supelco
Metanol	68510423MIX	Pliva
Etil acetat	68650723MIX	Pliva

3.1.2. Aparatura i pribor

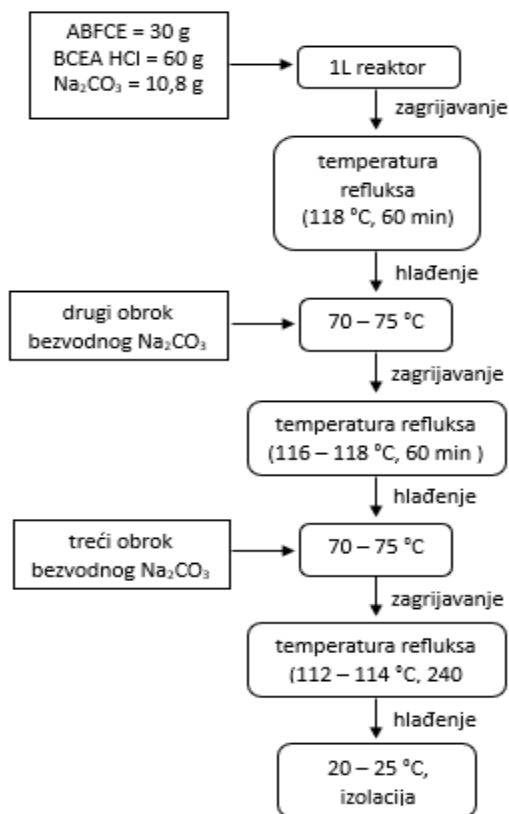
Tablica 2. Korištena laboratorijska aparatura

Laboratorijska aparatura	Proizvođač
Laboratorijska vaga	Sartorius
Lijevak za odjeljivanje	/
Špatula, lađica za vaganje, kapaljka – sitno laboratorijsko posuđe	/
Staklena pipeta	/
Električna miješalica	IKA
Lijevak za usip krutina	/
Povratno hladilo	/
Termometar /PT100 termosonda	/
Stakleni 1 L reaktor s dvostrukim plaštom i ispustom na dnu	HWS reaktor
Trogrla tikvica od 0.5 L	HWS
Vakuum sušnica	Kambič
Termostat	Julabo
Büchnerov lijevak	/
HPLC uređaj	Waters
LC-MS QQQ	Waters
NMR	Bruker
UV Lampa za gledanje TLC-ova	/
Flash Chromatography sistem	Biotage
Rotavapor	Buchi

3.2. Metode rada

3.2.1. Sinteza i izolacija PBCE HCl

U 1-litreni reaktor (slika 3) dodano je preko usipnog lijevka 30 g ABFCE te je lijevak opran s n-butanolom (210 ml). U otopinu su dodani BCEA HCl (60 g, 2,3 eq) i bezvodni natrijev karbonat (10,8 g; 0,7 eq). Suspenzija je zagrijana do temperature refleksa (118 °C) pri kojoj se odvijala reakcija 60 minuta. Pri zagrijavanju, dolazi do otapanja krutina u reaktoru. Zatim je pripremljena suspenzija ohlađena na temperaturu oko 70-75 °C te je dodan drugi obrok bezvodnog natrijevog karbonata (10,8 g). Prilikom dodavanja drugog obroka natrijevog karbonata može doći do pjenjenja. Potom je suspenzija ponovno zagrijana na temperaturu refleksa (116-118 °C) na sat vremena. Nakon 60 minuta uslijedilo je ponovno hlađenje suspenzije do temperature od 70-75 °C te je dodan treći obrok bezvodnog natrijevog karbonata (10,8 g). Nakon dodavanja trećeg obroka bezvodnog natrijevog karbonata suspenzija je ponovno zagrijana na temperaturu refleksa (112-114 °C) te je refluksirana 240 minuta. Na kraju, reakcijska smjesa je ohlađena do 20-25 °C nakon čega je proveden postupak izolacije produkta. Postupak sinteze PBCE HCl prikazan je shemom 1.

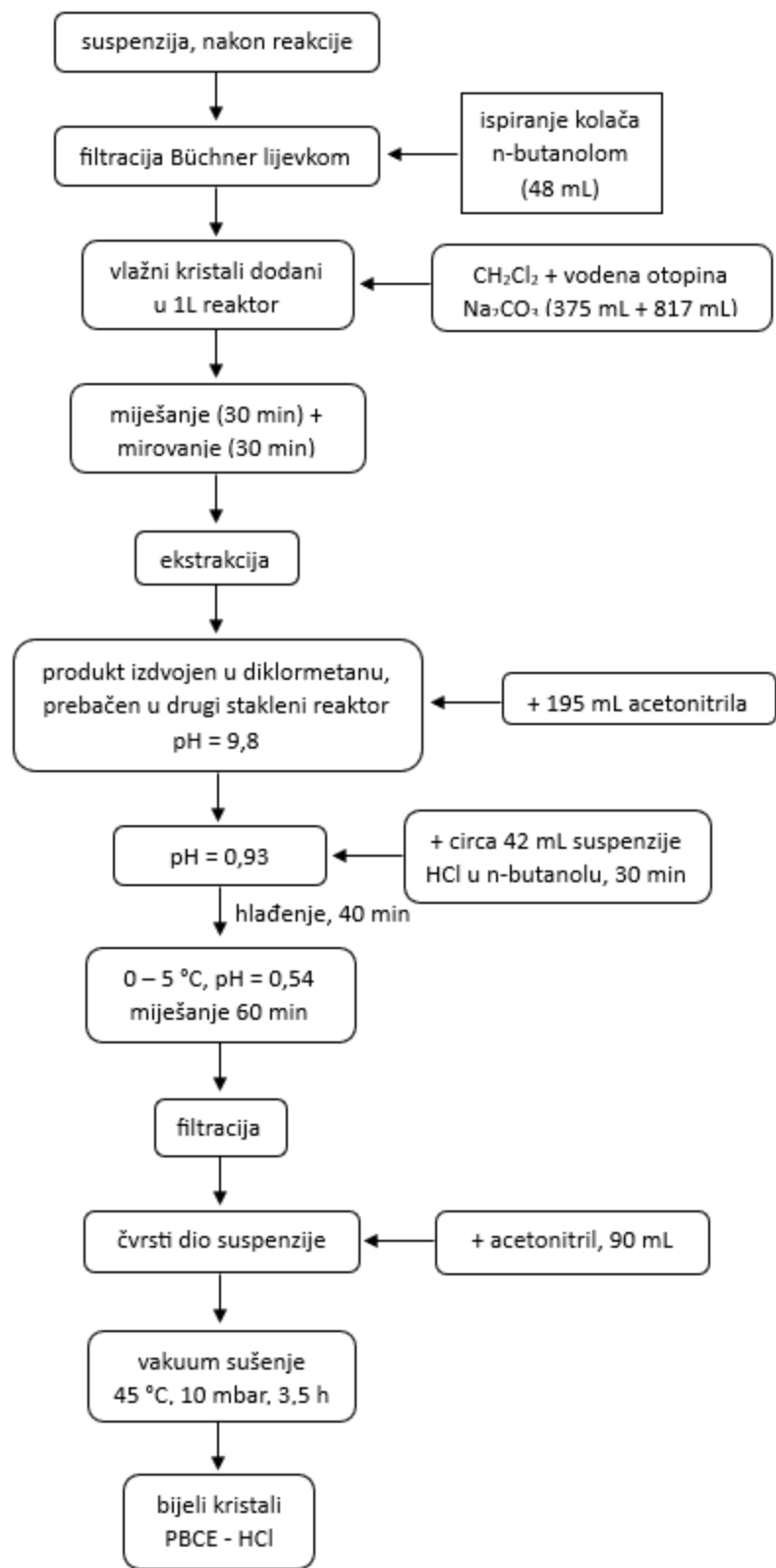


Shema 1. Blok shema sinteze PBCE HCl



Slika 3. HWS stakleni 1 L reaktor s dvostrukim plaštom i ispustom na dnu
(vlastita fotografija, 2023)

Suspenzija je profiltrirana preko Büchnerovog lijevka te je kolač ispiran n-butanolom (48 mL). Vlažni kristali PBCE baze su zatim dodani u reaktor volumena 1 L i otopljeni u smjesi diklormetana (CH_2Cl_2 , 375 mL) i vodene otopine natrijevog karbonata (10,5 g Na_2CO_3 u 817 mL vode). Smjesa je miješana 30 minuta kako bi se provela ekstrakcija nakon čega je ostavljena u reaktoru 30 minuta što je rezultiralo odjeljivanjem slojeva. Željeni produkt se izdvaja u diklormetan koji će biti donji sloj ekstrakcije zbog veće gustoće od n-butanola. Nakon izdvajanja željenog sloja, prebačen je u drugi stakleni reaktor i razrijeđen dodavanjem acetonitrila (195 mL). pH vrijednost odijeljene otopine iznosila je oko 9,8 te je zakiseljena do $\text{pH} < 1$ ($\text{pH} = 0,93$) korištenjem suspenzije HCl-a u 1-butanolu (circa 3M, 42 mL) kroz 30 minuta čime se PBCE izolira u obliku soli klorovodične kiseline. Dobivena suspenzija ohlađena je između $0\text{ }^\circ\text{C}$ i $5\text{ }^\circ\text{C}$ kroz 40 minuta te je zadržana na toj temperaturi, uz miješanje, dodatnih 60 minuta ($\text{pH} = 0,54$). Dodatnim korakom filtracije kristal je izdvojen, ispran acetonitrilom (90 mL) te sušen u vakuumu na $45\text{ }^\circ\text{C}$ pri podtlaku od 10 mbara kroz 3,5 sati nakon čega se dobiju bijeli kristali etil-5-(piperazin-1-il) benzofuran-2- karboksilat hidroklorida (PBCE- HCl). Blok shema izolacije PBCE – HCl prikazana je na shemi 2.



Shema 2. Izolacija PBCE HCl

3.2.2. Sinteza onečišćenja RRT 1,37

U trogloj tikvici (slika 4) dodani su bis (2-kloroetil)amin hidroklorid (BCEA HCl, 1 g) 5-aminobenzofuran-2-karboksilat (ABFCE, 2,87 g; 2,5 eq), trietilamin (1,7 g, 3 eq) i n-butanol (20 mL). Dodani sastojci su otopljeni i zagrijani na temperaturu od 75 °C pri kojoj se vodi reakcija. Ukupno reakcijsko vrijeme potrebno za sintezu željenog dimera iznosi 4-5 sati (tablica 3). Nakon približno sat vremena dolazi do taloženja kristala ABFCE dimera. Nakon završetka reakcije otopina je ohlađena i filtrirana. Uzorak sirovog materijala poslan je na HPLC analizu.

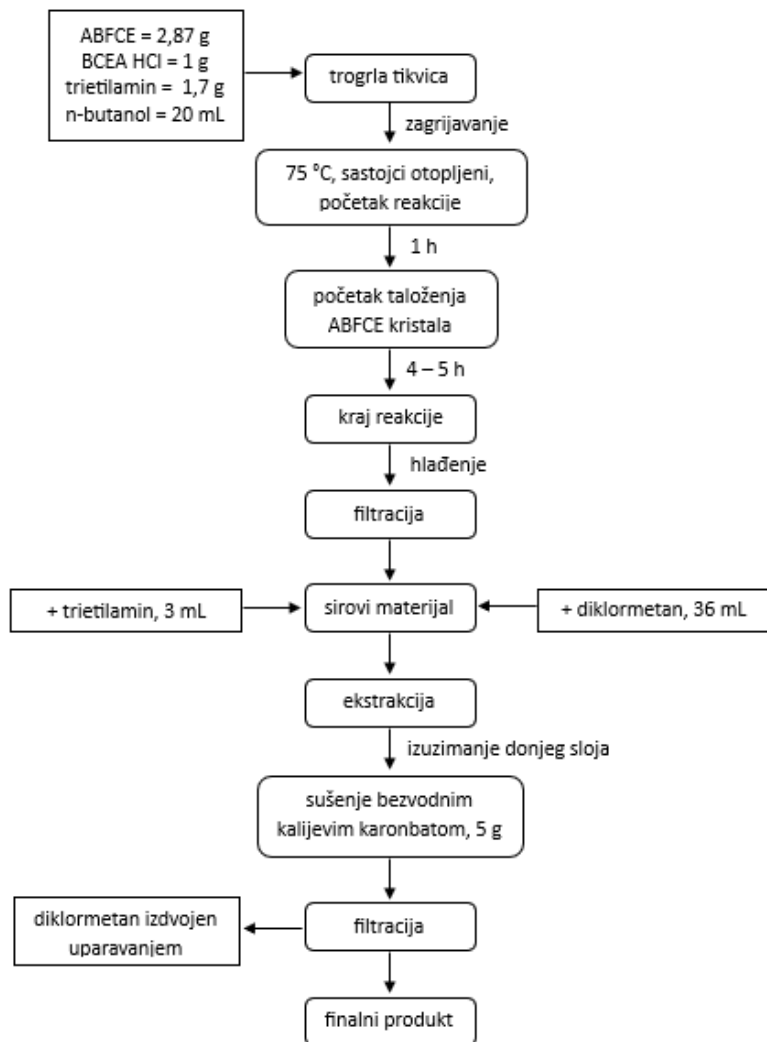
Tablica 3. Eksperimentalni uvjeti sinteze i zabilježene vrijednosti konačne količine sintetiziranog onečišćenja RRT 1,37

Eksperiment	Eksperimentalni uvjeti					RRT 1,37 u reakcijskoj smjesi, area %	RRT 1,37 u kristalu, Area%
	Volumen n-butanola [L]	ABFCE/eq	Temp./°C	Vrijeme	Baza		
KP/5071/44-1	5	2,5	75	4,5	TEA	20,74	83,60
KP/5071/44-2	20	2,5	75	4,5	TEA	24,82	92,26

Nadalje, provedena je ekstrakcija s ciljem dodatnog pročišćavanja uzorka izdvajanjem tvari topivih u vodi. U lijevku za odjeljivanje, sirovi materijal otopljen je u diklormetanu (36 mL) uz dodatak trietilamina (3 mL) koji omogućava lakšu i jasniju separaciju slojeva prilikom ekstrakcije. Nakon provedene ekstrakcije i izuzimanja donjeg odijeljenog sloja, isti je osušen bezvodnim kalijevim karbonatom (5 g). Smjesa je profiltrirana, a diklormetan odstranjen uparavanjem. Finalni produkt je uljasta supstanca (shema 3). Uzorak finalnog produkta poslan je na HPLC analizu. Izolirani uzorak onečišćenja dodatno je pročišćen pomoću preparativne flash kromatografije, nakon koje je provedena NMR analiza pročišćenog uzorka.



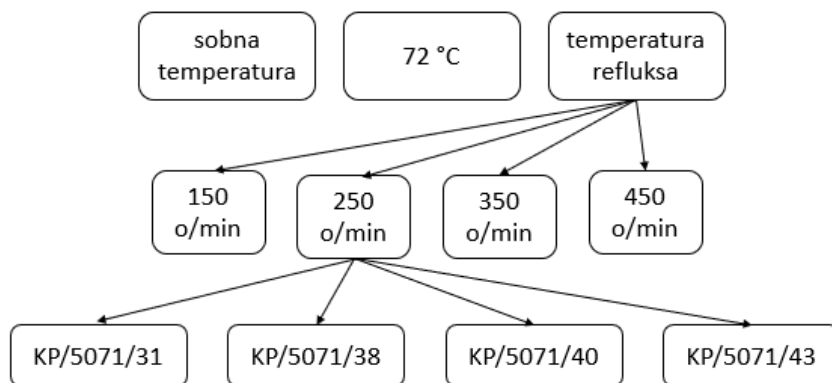
Slika 4. Sinteza onečišćenja RRT 1,37 u trogloj tikvici od 0,5 L (vlastita fotografija, 2023)



Shema 3. Sinteza i izolacija onečišćenja RRT 1,37

3.2.3. Ispitivanje parametara koji utječu na sintezu onečišćenja RRT 1,37

Proveden je niz eksperimenata s ciljem optimizacije prije opisane reakcije i proučavanja utjecaja procesnih parametara na reakciju. Najprije je ispitivan utjecaj temperature pri kojoj se u reakciju dodaje natrijev karbonat (sobna temperatura, 72 °C i temperatura refluksa). Nadalje, praćen je utjecaj brzine miješanja reakcijske smjese kroz niz eksperimenata u kojima je varirana brzina rotacije miješala (150, 250, 350, 450 o/min) pri ranije određenoj optimalnoj temperaturi reakcijske smjese. Na kraju, ispitivan je utjecaj količine i načina doziranja obroka natrijevog karbonata u reakcijsku smjesu, pri ranije određenim optimalnim uvjetima temperature reakcijske smjese i brzine rotacije miješala, uz praćenje koncentracija glavnih reaktanata i produkata reakcije, kako je prikazano prema shemi 4.



Shema 4. Prikaz niza eksperimenata provedenih s ciljem optimizacije parametara koji utječu na sintezu onečišćenja RRT 1,37

3.2.4. Analitičke metode

3.2.4.1. LC-MS analiza

HPLC-MS analiza provedena je na Agilent 1290 Infinity II instrumentu sparenim s MS QQQ C495 Agilent masenim spektrometru. Korištena je Waters XBridge C18 kolona dimenzija 150 x 4,6 mm s česticama unutar kolone promjera 3,5 μm . Brzina uzimanja uzoraka (engl. *draw speed*) iznosila je 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, a brzina izbacivanja uzoraka (engl. *eject speed*) iznosila je 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Injektirani volumen uzorka na kolonu iznosio je 1,50 μL . Protok kroz kolonu uređaja iznosio je 1000 mL/min pri 1300 bara. Ukupno vrijeme trajanja HPLC analize iznosilo je 19 minuta. Kao mobilna faza A korištena je 0,005 % otopina mravlje kiseline u visoko pročišćenoj vodi (0,5 mL u 1000 mL VPV). U ulozi mobilne faze B korištena je 0,005 % otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (0,5 mL mravlje kiseline u 1000 mL acetonitrila). Otapalo korišteno za LC-MS analizu pripremljeno je miješanjem jednakih omjera već pripremljene mobilne faze A i acetonitrila (200 mL mobilne faze A pomiješano sa 200 mL acetonitrila). Masena spektrometrija provedena je metodom elektrosprej ionizacije u pozitivnom načinu snimanja pri energijama od 5V, 10V, 20V. Protok inertnog plina prilikom izvođenja masene spektrometrije iznosio je 12 L/min, pri temperaturi od 290 °C. Na izlazu iz masenog spektrometra ionizirane molekule i fragmenti detektirani su pomoću DAD (engl. *diode array detector*) UV detektora pri 220 nm. Uzorak za analizu pripremljen je otapanjem 5 mg uzorka u 10 mL diluenta.

3.2.4.2. HPLC analiza

Analiza svih spomenutih uzoraka provedena je prema prethodno razvijenim metodama korištenim za kontrolu kvalitete istraživane aktivne farmaceutске tvari. Kromatografske analize provedene su korištenjem Waters H class HPLC uređaja, a za detekciju istraživanih analita korišten je DAD UV detektor pri valnoj duljini od 220 nm. Analiza je provedena na Waters XBridge18 koloni dimenzija 150 x 4,6 mm, sa česticama unutar kolone promjera 3,5 μm. Temperatura autosamplera iznosila je 10 °C, a analiza je provedena pri temperaturi od 30 °C uz protok mobilne faze od 2 μL/sec). Injektirani volumen uzorka na kolonu iznosio je 1,5 μL. Elucija uzoraka sa kolone provedena je prema principu gradijentne elucije, variranjem različitih omjera eluenta A i B kroz vrijeme provođenja procesa. Gradijent eluenta kroz HPLC analizu prikazan je u tablici 4. Kao eluent A korištena je 0,025 % otopina trifluoroctene kiseline (TFA) u visoko pročišćenju vodi (VPV) (250 μL TFA u 1000 mL VPV), dok je kao eluent B korištena 0,025 % otopina trifluoroctene kiseline u acetonitrilu (250 μL TFA u 1000 ml acetonitrila). Uzorci za analizu HPLC uređajem pripremani su otapanjem 20-40 mg uzorka u tikvici od 20 mL. Kao otapalo korištena je 0,05 % otopina trifluoroctene kiseline u vodi pomiješana sa acetonitriplom u omjeru 1 : 1 (250 μL TFA u 500 mL VPV pomiješano sa 500 mL acetonitrila). Dobiveni kromatogrami analizirani su pomoću računalnog programa Empower.

$$AREA_{impurity} \% = \frac{Area\ of\ impurity}{\sum Areas\ of\ all\ peaks} \times 100 \quad (3)$$

Jednadžba (3) korištena je za izračun Area% rezultata analiziranih uzoraka.

Tablica 4. Gradijentna elucija analiziranih spojeva tijekom HPLC analize

Vrijeme (min)	% eluent A	% eluent B
0,00	90	10
8,00	20	80
13,00	20	80
13,10	90	10
19,00	90	10

3.2.4.3. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija provedena je na inertoj staklenoj pločici premazanom silika gelom koji je u ulozi stacionarne faze sustava. Uzorak je na kolonu nanesen ručno, pomoću mikroinjekcije, na za to predviđeno mjesto na pločici. Pločica s ispitivanim uzorkom uronjena je u 20 % otopinu metanola u diklormetanu koja služi kao mobilna faza (slika 5). Nakon 20 minuta pločica s uzorkom je izvađena, posušena i analizirana pod UV svjetlom.



Slika 5. Pločica za tankoslojnu kromatografiju (vlastita fotografija, 2023)

3.2.4.4. Flash kromatografija

Finalni produkt postupka sinteze onečišćenja RRT 1,37 podvrgnut je dodatnom koraku pročišćavanja u obliku flash kromatografije s ciljem izolacije nastalog onečišćenja i potvrđivanja njegove strukture nuklearnom magnetskom rezonancijom. Flash kromatografija provedena je na Biotage Isolera One uređaju na Biotage SNAP Ultra 10 g koloni (slika 6). Analiza je provedena pri sobnoj temperaturi. Biotage Isolera One uređaj ima sposobnost prikupljanja maksimalno 192 frakcije bez promjene stalka dimenzija 16 x 150 mm, pri čemu se volumen frakcija može podesiti između 1 mL i 9999 mL. Za potrebe izrade ovog rada volumen izuzimanih frakcija podešen je na 10 mL. Analiza je provedena pri protoku mobilne faze od 15 mL/min. U ulozi mobilne faze bila je smjesa metanola i diklormetana u različitim omjerima. Kromatografija je započela mobilnom fazom koju je tvorio čisti diklormetan, uz postepeno povećavanje udjela metanola u mobilnoj fazi. Tijek kromatografije praćen je pomoću ugrađenog UV VIS detektora pri 235 nm, budući da je na temelju provedene HPLC analize uzorka detektiran pik ciljanog analita pri valnoj duljini od 235 nm. Referentna valna duljina iznosila 275 nm.

Izdvojene frakcije nakon provedene analize podvrgnute su operaciji uparavanja s ciljem odstranjivanja tekuće faze uzorka koju čini mobilna faza i izolacije ciljanog spoja. Prikupljeni uzorak dodatno je analiziran metodom nuklearne magnetske rezonancije.



Slika 6. Biotage SNAP Ultra 10 g kolona (vlastita fotografija, 2023)

3.2.4.5. Nuklearna magnetska rezonancija

NMR analiza provedena je na spektrometru *Bruker Neo 600 MHz* s 5 mm BBO inverznom probom i *z*-gradijentnom zavojnicom. Snimljeni su jednodimenzijski ^1H NMR i dvodimenzijski NMR spektri (COSY, HSQC) pri sobnoj temperaturi. Mjerenja su provedena u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Za snimanje ^1H NMR spektra primijenjen je pulsni slijed *zg30* uz spektralnu širinu od 9 kHz, broj pulseva 16 i razlučivanje 0,18 Hz. Spektar COSY snimljen je uz sljedeće uvjete: broj pulseva 3, spektralna širina 5,6 kHz, 2048 točke u dimenziji f_2 te 512 inkremenata u dimenziji f_1 . HSQC spektar dobiven je uz 40 snimaka, spektralnu širinu 9,6 kHz u dimenziji f_2 i 27,1 kHz u dimenziji f_1 . Primijenjeno je 4096 točaka u dimenziji f_2 te 256 inkremenata u dimenziji f_1 .

Uzorak je pripremljen otapanjem oko 30 mg pročišćenog uzorka u 550 μL deuteriranog metanola u ulozu otapala. Tetrametil silan korišten je kao unutarnji standard.

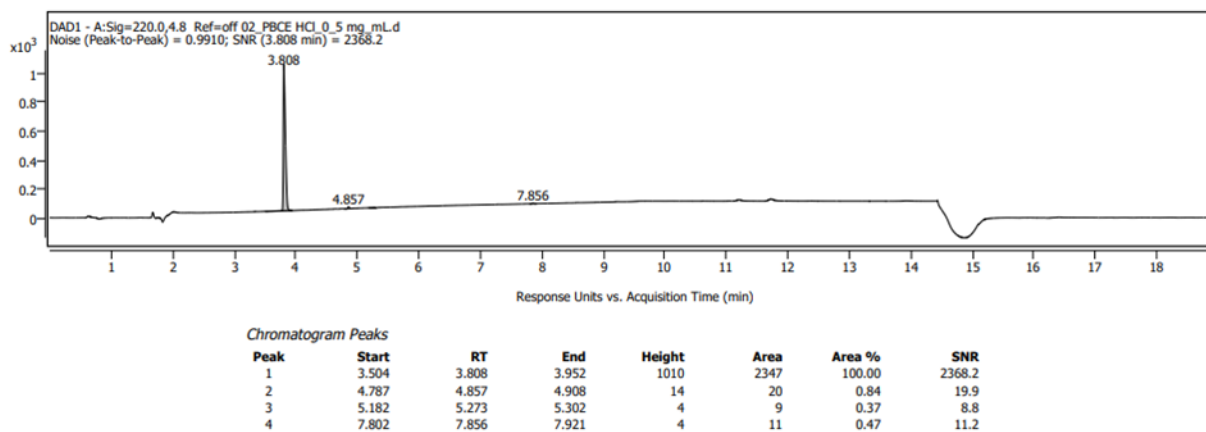
4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovoga rada provedena je sinteza i izolacija onečišćenja RRT 1,37 te je okarakterizirana molekularna struktura onečišćenja. Onečišćenje RRT 1,37 uspješno je sintetizirano reakcijom nukleofilne alifatske supstitucije. Struktura onečišćenja RRT 1,37 okarakterizirana je pomoću LC-MS analize (slika 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14), uspješnost sinteze onečišćenja potvrđena je HPLC analizom (slika 16, 17, 20), a izolacija onečišćenja provedena je flash kromatografijom (slika 19). S ciljem potvrđivanja pretpostavljene strukture istraživanog onečišćenja provedena je NMR analiza (tablica 8, slika 22, 23, 24). Nadalje, provedeno je ispitivanje utjecaja procesnih parametara poput brzine miješanja (tablica 9), temperature pri kojoj se natrijev karbonat dodaje (tablica 10) kao i količine i načina dodavanja natrijevog karbonata u reakcijsku smjesu (slika 25, 26, 27, 28) na prinos reakcije i sintezu istraživanog onečišćenja.

4.1. Rezultati sinteze i izolacije onečišćenja RRT 1,37

4.1.1. LC-MS karakterizacija onečišćenja RRT 1,37

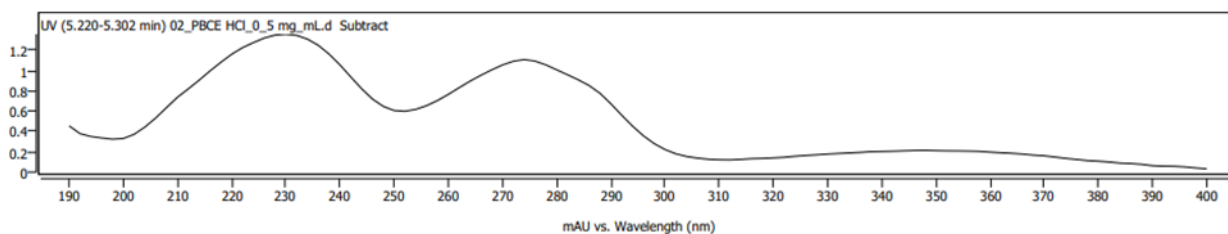
Struktura onečišćenja RRT 1,37 analizirana je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti spregnutom s masenom spektrometrijom.



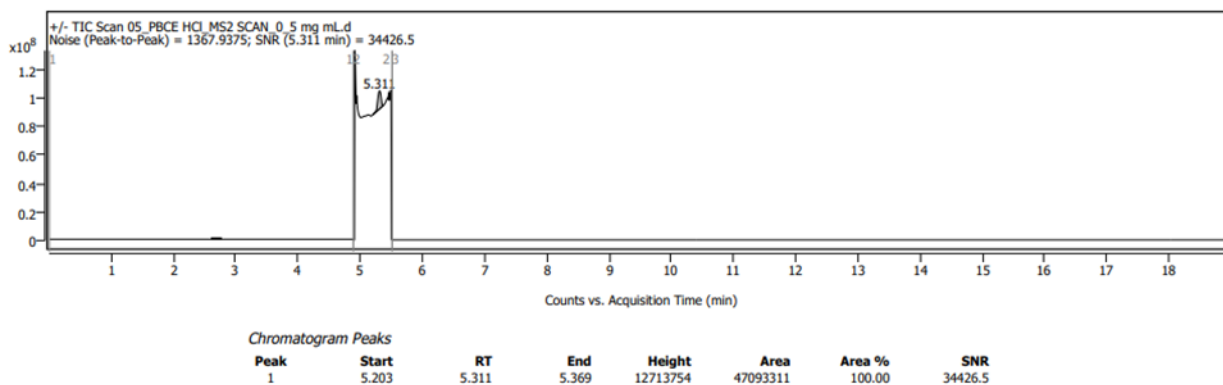
Slika 7. HPLC kromatogram uzorka

Na slici 7. prikazan je kromatogram dobiven HPLC analizom na DAD detektoru uzorka koji sadrži onečišćenje RRT 1,37 u sklopu LC/MS analize. Prijašnjim HPLC analizama određeno je da nepoznato onečišćenje apsorbira u UV spektru pri valnoj duljini od 220 nm s maksimumom na 235 nm (slika 8). Daljnjom analizom spektara četiri prikazanih pikova na slici 7., određeno je da željeno onečišćenje izlazi na RT ~ 5,3 (slika 9). Uzorak je ponovo analiziran HPLC metodom

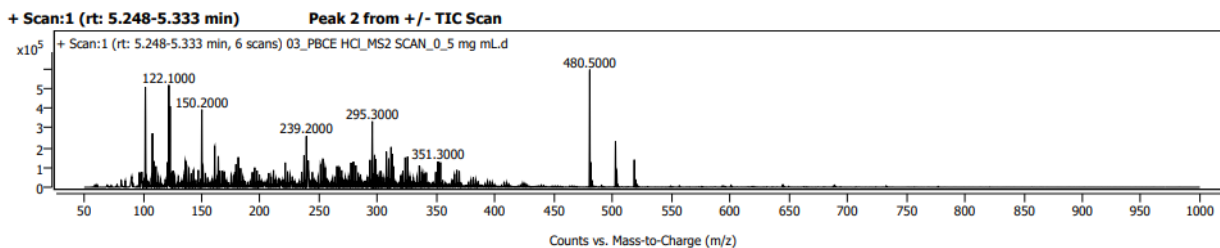
te je provedeno skeniranje fragmenata masenim spektrometrom *Scan* metodom u rasponu omjera mase i naboja (m/z) od 50 do 1000 u pozitivu i u negativu. U pozitivu je uspješno postignuta ionizacija analiziranog onečišćenja čime je potvrđeno da omjer mase i naboja iznosi $m/z = 480,2$ (slika 10).



Slika 8. Spektar molekule RRT 1.37

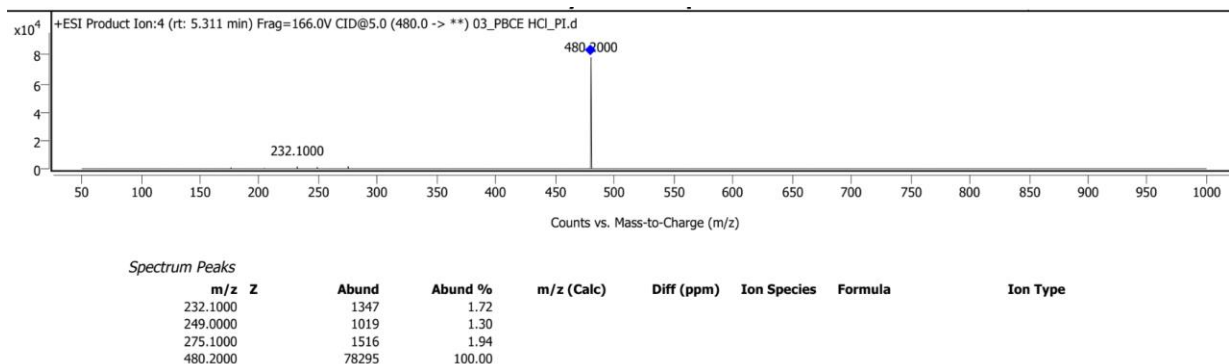


Slika 9. Kromatogram izdvojenog pika RT ~5.3



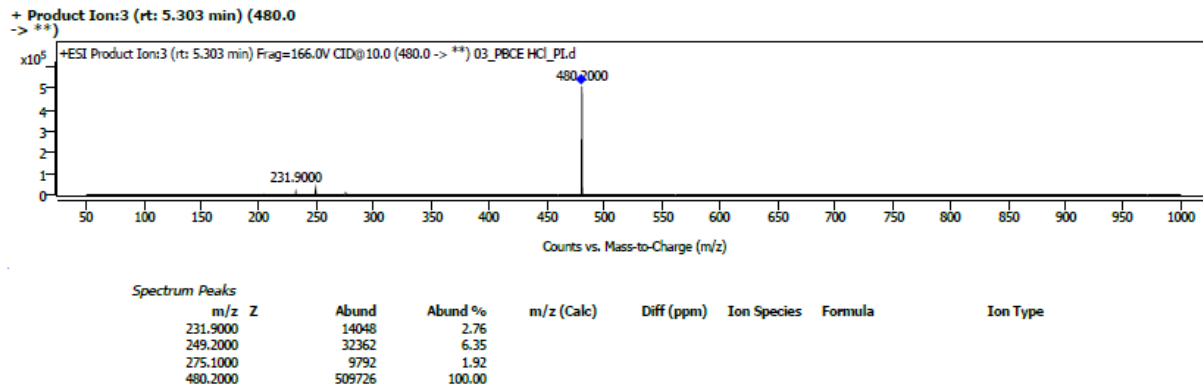
Slika 10. Skeniranje fragmenata *Scan* metodom

Potom je isti uzorak pušten na *Produkt ion* metodu, poznavajući m/z spoja od 480,5 na 4 energije kolizije (CID) (5V, 10V, 20V i 30V) s ciljem potvrde strukture nepoznatog onečišćenja.



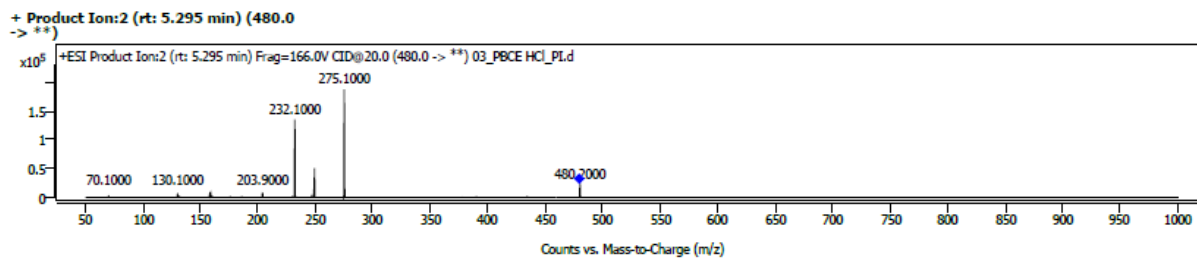
Slika 11. Maseni spektar pri energiji kolizije od 5 V

Na masenom spektru analiziranog spoja pri energiji kolizije u iznosu od 5 V (slika 11) vidljiv je samostalni molekulski ion nepoznate molekulske strukture s omjerom mase i naboja $m/z = 480,2$. Budući da se mjerenje masenog spektra odvijalo pri niskoj energiji kolizije, pretpostavlja se da slika 11. prikazuje signal ionizirane molekule analita $[M+H]$ bez pojave fragmentacije.



Slika 12. Maseni spektar pri energiji kolizije od 10 V

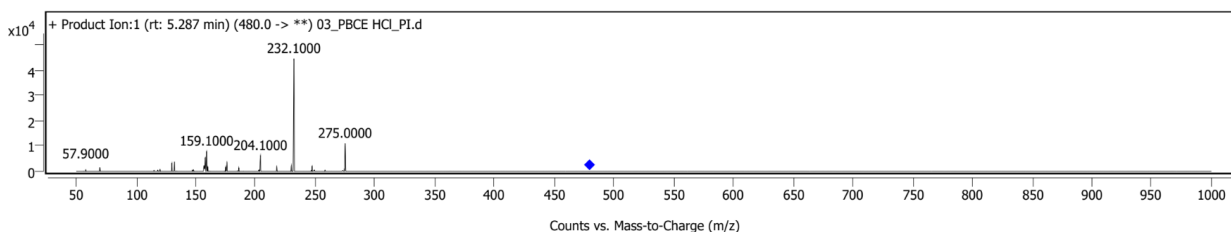
Primjenom energije kolizije u iznosu od 10 V nije došlo do izraženije fragmentacije molekulskog iona, čiji je signal na spektru vidljiv pri $m/z = 480,2$ (slika 12).



Spectrum Peaks		Abund	Abund %	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Ion Species	Formula	Ion Type
m/z	Z							
70.1000		2599	1.39					
130.1000		5725	3.06					
131.8000		2005	1.07					
158.1000		6277	3.35					
159.0000		7114	3.80					
160.2000		2174	1.16					
203.9000		7882	4.21					
232.1000		134942	72.05					
247.0000		3838	2.05					
249.2000		50994	27.23					
275.1000		187279	100.00					
480.2000		23452	12.52					

Slika 13. Maseni spektar pri energiji kolizije od 20 V

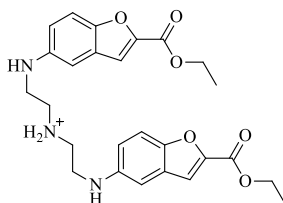
Na slici 13. prikazan je maseni spektar dobiven provedbom masene spektrometrije pri energiji kolizije u iznosu od 20 V. Pik ioniziranog spoja sa omjerom mase i naboja $m/z = 480,2$ znatno je manjeg intenziteta u odnosu na pik istog omjera mase i naboja na slici 10., što je rezultat primjene veće energije kolizije koja omogućuje znatno izraženiju fragmentaciju analizirane molekule. U prilog tome govori i činjenica da je zabilježena pojava pikova fragmenata pri manjim omjerima m/z od kojih su najizraženiji pikovi $m/z = 275,1$ i $m/z = 232,1$.



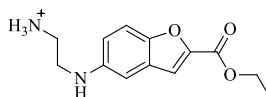
Slika 14. Maseni spektar pri energiji kolizije od 30 V

Provođenjem masene spektrometrije pri energiji kolizije od 30 V (slika 14) signal molekulskog iona $m/z = 480,2$ najslabijeg je intenziteta što je posljedica izlaganja molekule visokoj energiji kolizije koja rezultira najizraženijom fragmentacijom ispitivanog analita. U usporedbi sa slikom 11. na kojoj je prikazan spektar analize masene spektrometrije provedene pri energiji kolizije od 20 V, primijećena je pojava istih pikova poput fragmenata omjera mase i naboja $m/z = 275,0$; $m/z = 232,1$ i $m/z = 204,1$.

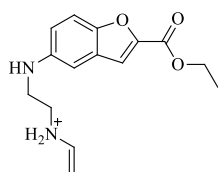
Masa onečišćenja najbolje je vidljiva pri kolizijskoj energiji od 5 V, a nastali fragmenti jasno su detektirani pri energiji kolizije od 20 V.



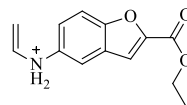
Kemijska formula: $C_{26}H_{30}N_3O_6^+$
Molekulska masa: 480,21



Kemijska formula: $C_{13}H_{17}N_2O_3^+$
Molekulska masa: 249,12



Molekulska masa: 275,14



Molekulska masa: 232,10

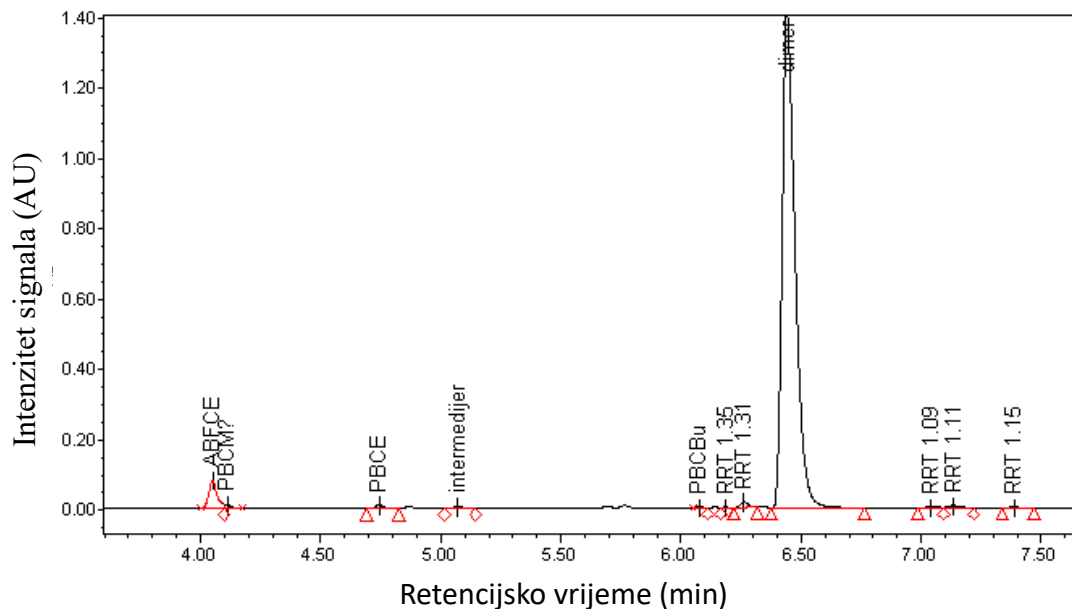
Slika 15. Pretpostavljeni fragmenti nastali prilikom masene spektrometrije

Slika 15. prikazuje kemijske strukture pretpostavljenih fragmenata kao i strukturu pretpostavljenog onečišćenja u obliku dimera dvije molekule ABFCE i jedne molekule BCEA. Pretpostavlja se da fragmenti nastali masenom spektrometrijom pri višim energijama kolizije (20V) predstavljaju najučestalije fragmente ioniziranog spoja, dok provođenjem analize pri nižim energijama kolizije nije postignuta fragmentacija što je rezultiralo signalom ionizirane molekule.

4.1.2. HPLC analiza sinteze i izolacije onečišćenja RRT 1,37

U nastavku su prikazani rezultati kromatografskih analiza provedenih u sklopu ovog rada kroz proces sinteze i izolacije onečišćenja RRT 1,37. Kromatogram sa slike 16. prikazuje rezultate HPLC analize sirovog materijala dobivenog procesom sinteze onečišćenja RRT 1,37. Istraživano onečišćenje prikazano je kao dimer s vremenom zadržavanja od 6,441 min. Od ostalih pikova

prikazanih na kromatogramu, vrijedi spomenuti signal neizreagirale molekule ABFCE molekula kao i signal intermedijera. Pikovi ostalih spojeva nisu značajni za istraživanje stoga nisu procesirani, već su uklonjeni u daljnjim koracima pročišćavanja. Procesom sinteze onečišćenja RRT 1,37 dobivena je masa uzorka od 0,39 g, čistoće 92,26 % (tablica 5).



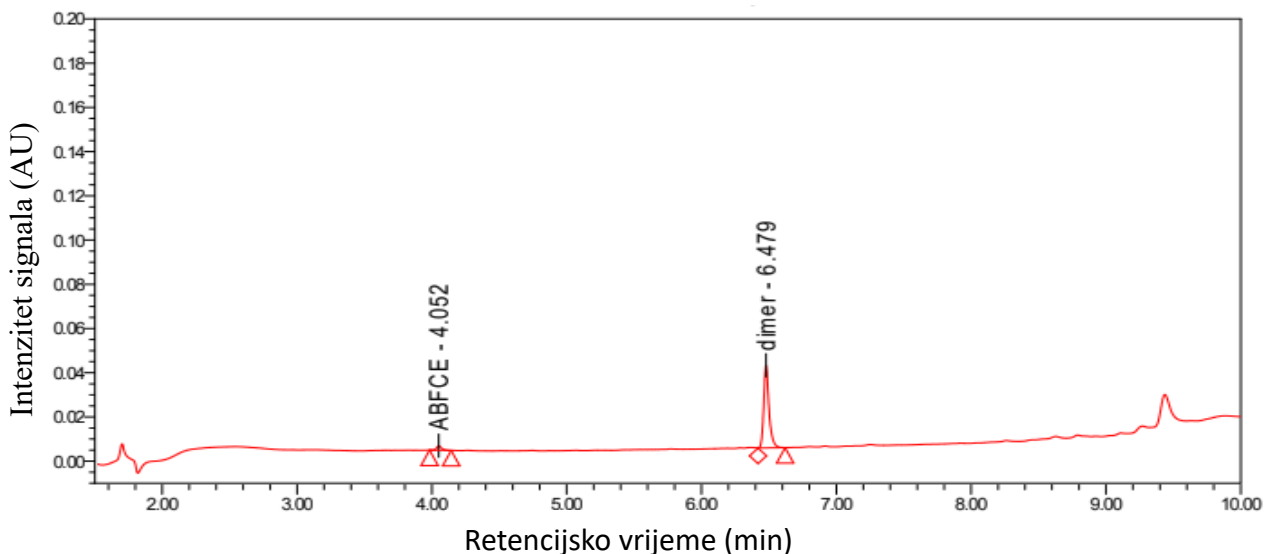
Slika 16. Kromatogram sirovog uzorka sinteze onečišćenja RRT 1,37

Tablica 5. Udio pojedinih analita i njihovo relativno vrijeme zadržavanja na HPLC koloni

Analit	Relativno vrijeme zadržavanja	Udio analita, area%
ABFCE	0.85	3,41
PBCE	1	0,40
Intermedijer	1.07	0,31
Onečišćenje RRT 1,37	1.37	92,26

Sirovi materijal dobiven u eksperimentu sinteze onečišćenja RRT 1,37 podvrgnut je dodatnom koraku pročišćavanja, ekstrakciji tvari topivih u vodi iz uzorka, s ciljem postizanja sintetiziranog onečišćenja maksimalne čistoće. Finalni produkt opisanog procesa bila je uljasta supstanca mase 0,38 g.

Kromatogram na slici 17. prikazuje rezultate HPLC analize uzorka iz procesa sinteze onečišćenja RRT 1,37 odnosno rezultate analize nakon provedenog dodatnog koraka pročišćavanja ekstrakcijom. O uspješnosti provedenog koraka ekstrakcije govori činjenica da su na kromatogramu uzorka nakon ekstrakcije prisutna samo 2 pika, naspram više od 10 pikova zabilježenih kromatogramom uzorka prije ekstrakcije. Prvi pik pripada molekuli ABFCE s vremenom zadržavanja od 4,052 min., dok drugi signal pripada ciljanom produktu sinteze, onečišćenju RRT 1,37, označenom kao dimer s vremenom retencije 6,479 min. Pikovi su jasno odijeljeni, udio spoja ABFCE iznosi 5,11% dok je udio istraživanog onečišćenja visokih 94,90 % (tablica 6). Nakon provedenog postupka ekstrakcije, pripremani uzorak dodatno je pročišćen flash kromatografijom.



Slika 17. Kromatogram uzorka sinteze onečišćenja RRT 1,37 nakon ekstrakcije

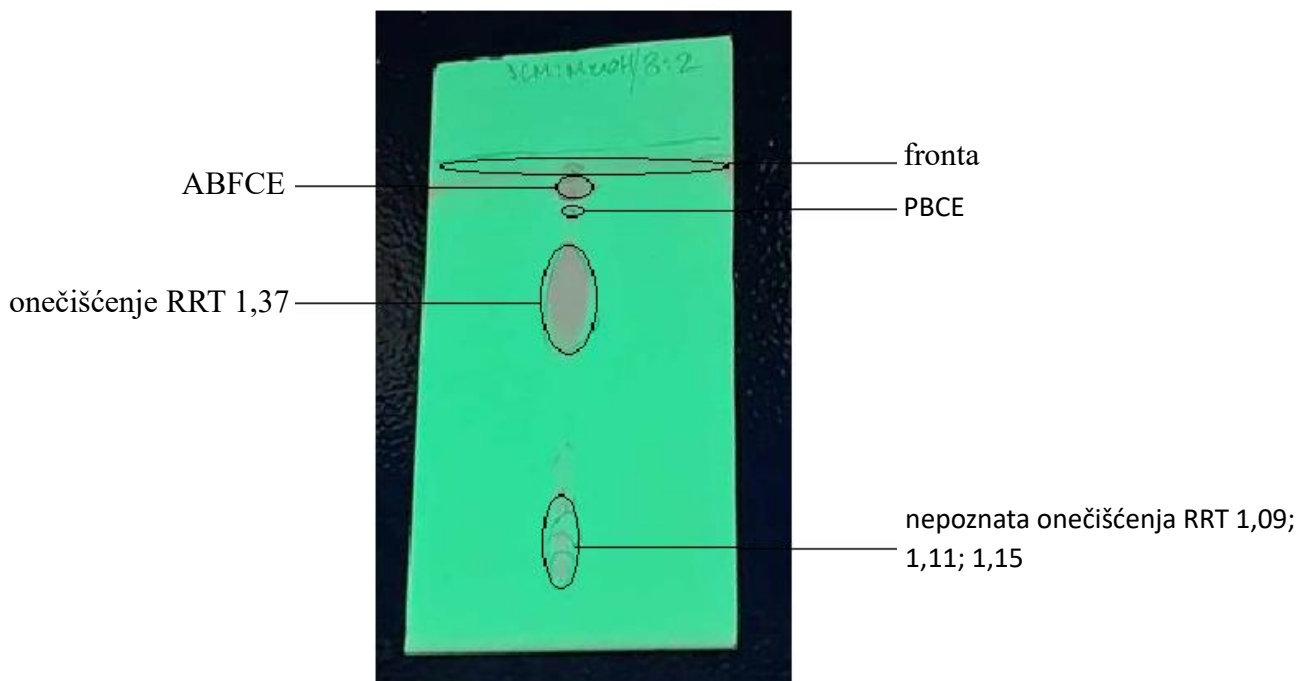
Tablica 6. Udio pojedinih analita i njihovo vrijeme zadržavanja na HPLC koloni u uzorku nakon ekstrakcije

Analit	Vrijeme zadržavanja, min	Udio analita, area%
ABFCE	4,052	5,1092
Onečišćenje RRT 1,37	6,479	94,90

4.1.3. Tankoslojna kromatografija

Prije izvođenja preparativne *flash* kromatografije potrebno je odabrati otapala i njihove omjere za mobilnu fazu koja će omogućiti optimalno razdvajanje tvari na silika gel koloni. Provedeno je ispitivanje mobilnosti analita u istraživanom uzorku. Najprije je provedeno ispitivanje topivosti uzorka u nepolarnim otapalima, diklormetanu i etil acetatu. Diklormetan se pokazao kao bolje otapalo. Budući da se konačna mobilna faza sastoji od dvaju komponenata suprotnih polarnosti, za potrebe ovog istraživanja, kao polarnija komponenta mobilne faze korišten je metanol. Nadalje, omjer komponenata sastavnica mobilne faze eksperimentalno je određen ispitivanjem mobilnosti uzorka tankoslojnom tekućinskom kromatografijom na pločici. Provedena je tankoslojna kromatografija korištenjem smjese otopina diklormetana i metanola kao mobilne faze u omjerima od 1:10 do 8:2.

20 % otopina metanola u diklormetanu pokazala se kao optimalna mobilna faza s najboljim razdvajanjem komponenata analiziranog uzorka prilikom izvođenja tankoslojne kromatografije na pločici (slika 18), stoga se koristila i kao mobilna faza prilikom izvođenja *flash* kromatografije.

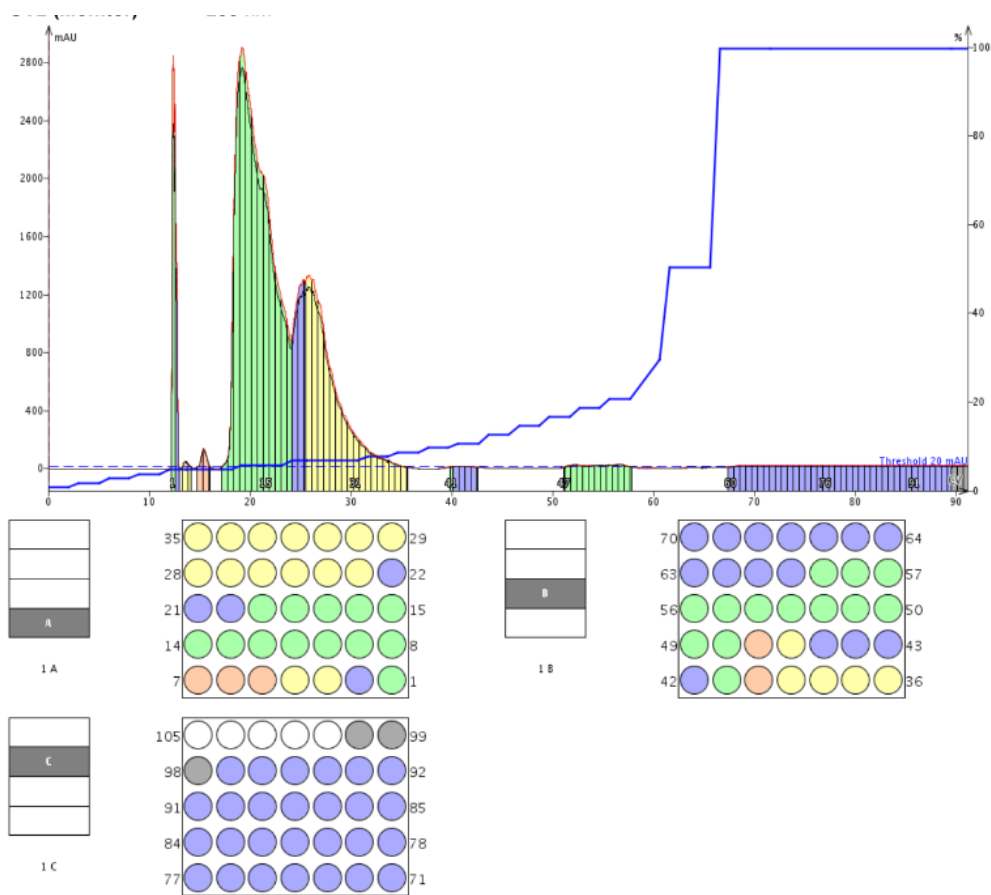


Slika 18. Tankoslojna kromatografija uzorka korištenjem 20 % otopine metanola u diklormetanu u ulozi mobilne faze

4.1.4. Flash kromatografija

Uzorak sintetiziranog onečišćenja RRT 1,37 dodatno je pročišćen flash kromatografijom. Kao mobilna faza korištena je 20 % otopina metanola u diklormetanu. Prema kromatogramu sa slike 19. vidljivo je da je prva izolirana komponenta razdvajane smjese eluirana s kolone bez udjela metanola u mobilnoj fazi, u prvoj frakciji. Prva značajnija izolirana komponenta eluirala se u frakcijama 10-19 pri čemu je vrijednost gradijenta polarnosti mobilne faze iznosila između 4 % i 7 %. Druga značajnija komponenta eluirana je u frakcijama 23-39 pri gradijentu polarnosti mobilne faze između 7 % i 9 %.

Ciljane komponente razdvajane smjese eluirale su se do 10 % udjela metanola u mobilnoj fazi nakon čega je udio metanola drastičnije povećavan budući da je ciljana molekula izašla iz kromatografskog sustava. Na kraju se završava na 100% metanola kako bi se s kolone eluiralo bilo koje potencijalno onečišćenje koje može zaostati.

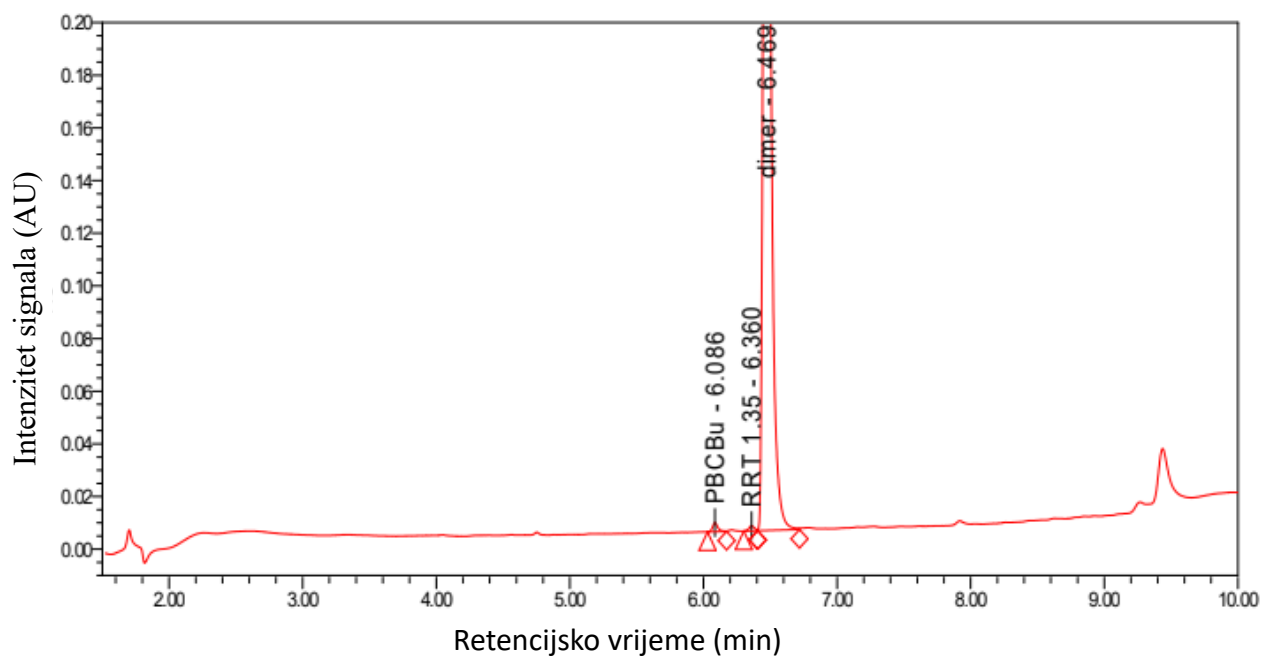


Slika 19. Kromatogram flash kromatografije: frakcije 10-19 (zeleno), frakcije 23-39 (žuto)

Frakcije 10-19 uparene su do uljaste supstance konačne mase 160 mg, a frakcije 20-39 nakon uparavanja rezultirale su uljastom masom težine 100 mg. Čistoća skupnog uzorka dobivenog spajanjem frakcija 20-39 potvrđena je HPLC metodom, te je provedena NMR analiza s ciljem potvrđivanja strukture izdvojenog onečišćenja. Pretpostavlja se da su frakcije 10-19 i 23-39 vjerojatno ista molekula, a razlog deformacije kromatograma leži u promijeni gradijenta metanola, no na temelju tankoslojne kromatografije odlučeno je da će se za daljnje korake analize koristiti frakcija 20-39.

4.1.4. HPLC analiza uzorka pročišćenog flash kromatografijom

Skupni uzorak sačinjen od frakcija 20-39 sakupljenih kroz flash kromatografiju analiziran je HPLC metodom čiji su rezultati prikazani na kromatogramu sa slike 20. Jasno je vidljiv oštar pik onečišćenja RRT 1,37 označenog kao dimer s vremenom zadržavanja na koloni od 6,469 min. Udio sintetiziranog onečišćenja u ovom uzorku iznosi 99,21 %. Čistoća analiziranog uzorka zadovoljava zahtjeve za čistoćom uzorka za provedbu NMR analize.



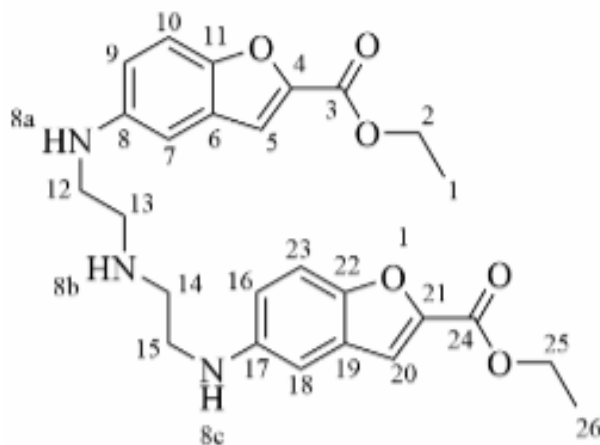
Slika 20. Kromatogram uzorka sinteze onečišćenja RRT 1,37 nakon flash kromatografije

Tablica 7. Udio onečišćenja i vrijeme zadržavanja onečišćenja RRT 1,37 u uzorku nakon flash kromatografije

Analit	Relativno vrijeme zadržavanja	Udio analita, area%
Onečišćenje RRT 1,37	1,37	99,21

4.2. NMR analiza

Pročišćenom onečišćenju RRT 1,37 struktura je potvrđena ^1H , HSQC i COSY NMR spektroskopijom (slika 21).

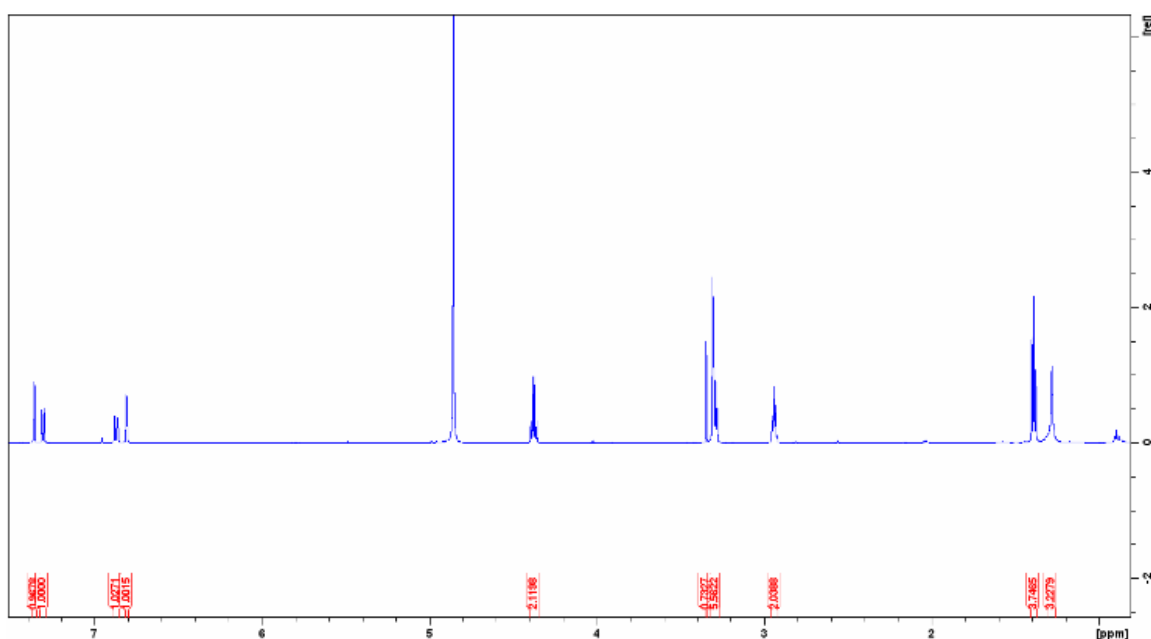


Slika 21. Pretpostavljena struktura onečišćenja RRT 1,37 s numeriranim ugljikovim atomima

Tablica 8. prikazuje vrijednosti kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C atoma zabilježenih kroz ^1H i HSQC spektroskopiju. Svakom C atomu i vrsti H atoma pretpostavljene strukture onečišćenja RRT 1,37 pridružena je vrijednost zabilježenog kemijskog pomaka.

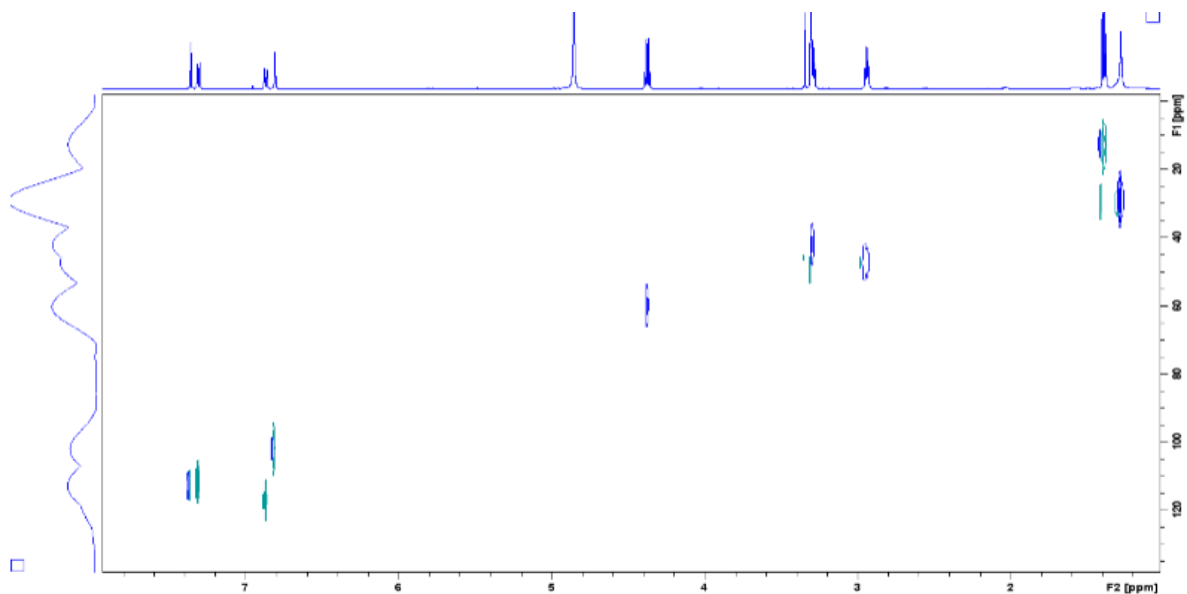
Tablica 8. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C atoma analiziranog uzorka u deuteriranom metanolu

atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1, 26	1,39	13,8	9, 16	6,88	117,2
2, 25	4,38	59,9	8a, 8c	-	-
3, 24	-	-	8b	-	-
4, 21	-	-	10, 23	7,31	111,6
5, 20	7,36	112,7	11, 22	-	-
6, 19	-	-	12, 15	3,29	41,3
7, 18	6,83	101	13, 14	2,95	47,5
8, 17	-	-			



Slika 22. ^1H NMR spektar onečišćenja RRT 1,37

Na slici 22. prikazan je ^1H NMR spektar onečišćenja RRT 1,37. Broj zabilježenih signala ^1H NMR spektra odgovara broju različitih vrsta vodikovih atoma u molekuli. Položaj signala ukazuje o kojoj se vrsti vodikovih atoma radi, površina ispod signala odgovara broju vodikovih atoma odgovarajuće vrste a cijepanje signala upućuje na broj susjednih vodikovih atoma. Prema ^1H NMR spektru sa slike 22., kemijski pomaci svake vrste H atoma upisani su u tablicu 8.



Slika 23. HSQC NMR spektar onečišćenja RRT 1,37

S ciljem potvrđivanja strukture izoliranog onečišćenja RRT 1,37 provedena je HSQC NMR spektroskopija. Iz dobivenog HSQC NMR spektra prikazanog na slici 23. vidljiva je korelacija između ugljikovog atoma koji se javlja kao pik na ^{13}C NMR spektru pri kemijskom pomaku od 41,3 ppm i pika pri kemijskom pomaku od 3,29 ppm na ^1H NMR spektru. Na temelju toga možemo zaključiti da su ova dva atoma povezana kovalentnom vezom. Prema istom principu dokazane su korelacije i drugih ugljikovih atoma zabilježenih ^{13}C NMR spektroskopijom sa specifičnim vodikovim atomima zabilježenih u ^1H NMR spektru. U tablici 8. upisane su sve vrijednosti kemijskih pomaka pri kojima su zabilježeni ugljikovi atomi koji stupaju u interakciju sa specifičnim vodikovim atomima.

4.3. Ispitivanje parametara koji utječu na sintezu onečišćenja RRT 1,37

4.3.1. Dodavanje natrijevog karbonata u reaktor pri različitim temperaturama

Prema rezultatima prikazanim u tablici 10. vidljiv je utjecaj temperature pri kojoj se dodaje natrijev karbonat u reakciju na prinos reakcije i prisustvo onečišćenja RRT 1,37 u reakcijskoj smjesi. Prinos reakcije proporcionalno raste s povećanjem temperature pri kojoj se dodaje natrijev karbonat, od sobne temperature do temperature refluksa. S druge strane, zamijećena je obrnuto proporcionalna korelacija između porasta temperature pri kojoj se dodaje natrijev karbonat u reakciju i prisustva onečišćenja RRT 1,37.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja utjecaja temperature šaržiranja natrijevog karbonata na prinos reakcije

Eksperiment	Temperatura šaržiranja Na₂CO₃	Prinos	Onečišćenje RRT 1,37 u finalnom kristalu
KP/5071/25	20 °C	57,0	0,27
KP/5071/32	72 °C	58,4	0,17
KP/5071/31	refluks	65,3	0,08

4.3.2. Brzina rotacije miješala u reaktoru

Prema tablici 9. vidljiva je obrnuto proporcionalna ovisnost brzine rotacije miješala i prinosa reakcije. S druge strane, udio formiranog onečišćenja RRT 1,37 raste s povećanjem broja okretaja miješala. Za uspješno formiranje onečišćenja RRT 1,37 potrebne su dvije molekule ABFCE. Shodno tome, za svaki udio formiranog dimera, prinos reakcije dvostruko se smanjuje. Topivost korištenog natrijevog karbonata u n-butanolu je niska što ovu reakciju čini heterogenom, stoga se pretpostavlja kako se s porastom brzine miješanja smanjuje granični sloj između soli i otapala te raste koeficijent prijenosa mase. Posljedično, raste topivost natrijevog karbonata u n-butanolu što uzrokuje porast pH vrijednosti suspenzije rezultirajući većim brojem ABFCE molekula u aktiviranom obliku, a samim time i većom dostupnošću tih molekula za reakciju s već formiranim intermedijerom, što u konačnici dovodi do porasta koncentracije onečišćenja u reakcijskoj smjesi.

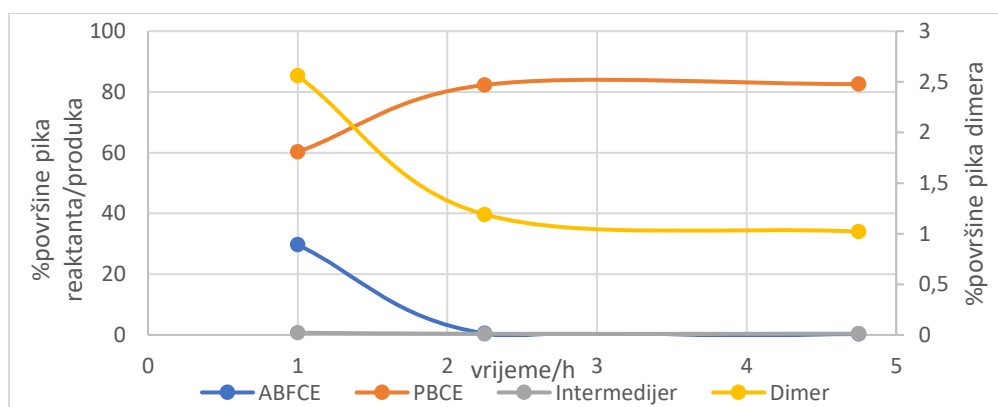
Tablica 10. Ovisnost prinosa i sinteze onečišćenja RRT 1,37 o brzini rotacije miješala u reaktoru

Ekperiment	Broj okretaja miješala [o/min]	Prinos [%]	Onečišćenje RRT 1,37 [area %]
KP/5071/29	150	67,59	0,05
KP/5071/28	250	66,31	0,13
KP/5071/30	350	63,55	0,05
KP/5071/25 & 26	450	55,805	0,27

Uzorak KP/5071/30 ne prati trend koncentracije onečišćenja u finalnom kristalu jer postoje dodatni potencijalni uzroci pročišćavanja tog onečišćenja u izolaciji kristala.

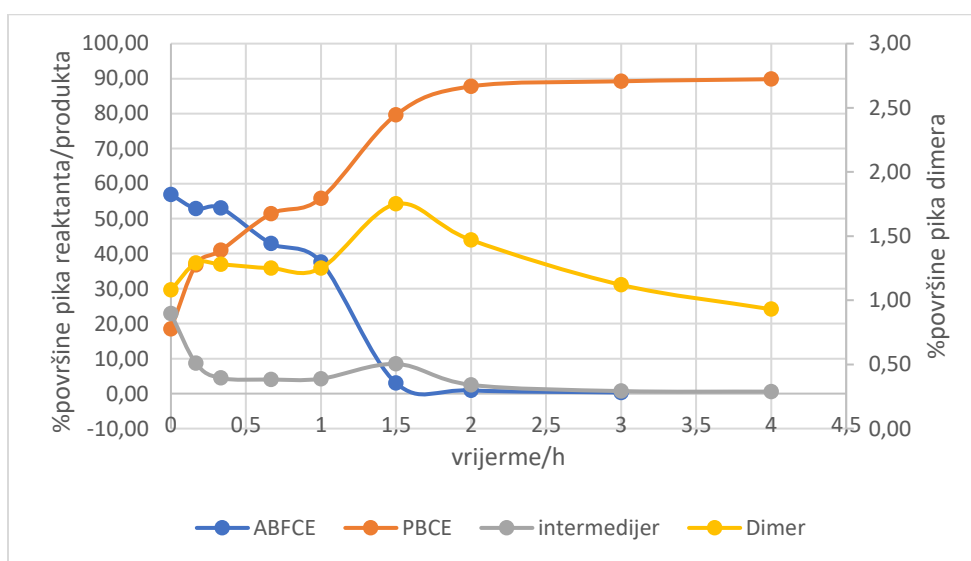
4.3.3. Količina dodane baze i način dodavanja baze

Ekperiment KP/5071/31 (slika 25) predstavlja standardni postupak korišten u industrijskoj proizvodnji. Dodavanje natrijevog karbonata provedeno je u 2 obroka od po 0,7 eq te 1,4 eq. Iz grafa je vidljivo da se ukupna količina onečišćenja formirala unutar prvog sata reakcije, a s napredovanjem reakcije dolazi do hidrolize onečišćenja što rezultira smanjenjem koncentracije onečišćenja kroz ostala 4 sata procesa. Uz pretpostavku da je visoka koncentracija dimera u prvih sat vremena reakcije posljedica dodavanja velike količine natrijevog karbonata od jednom u samom početku reakcije, provedeni su eksperimenti KP/5071/38 i KP/5071/40 s glavnim ciljem smanjenja pojave visoke koncentracije dimera na samom početku reakcije.



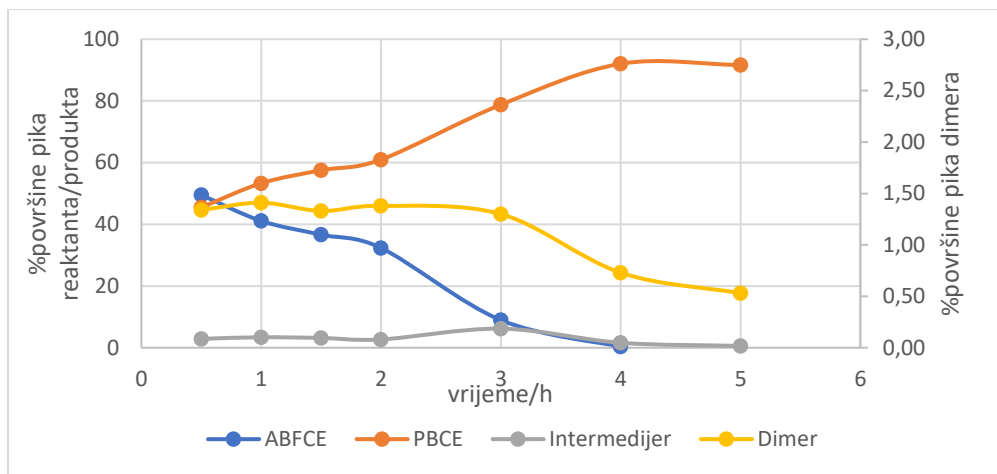
Slika 25. Ekperiment KP/5071/31 – Standardni postupak sinteze: Na₂CO₃ dodavan u 2 obroka (0,7 eq i 1,4 eq)

U eksperimentu KP/5071/40 (slika 26) dodavanje natrijevog karbonata provedeno je u 2 stupnja. U prvih sat vremena dodan je prvi dio ukupne količine korištenog natrijevog karbonata (0,7eq) kroz 8 pravilno raspoređenih obroka. Nakon toga dodano je ostalih 1,4 eq natrijevog karbonata, sat vremena od početka vođenja reakcije. U prvom satu provođenja reakcije uzorci su uzimani u manjim intervalima s naglaskom na početni dio reakcije. Iz grafa je vidljiva visoka koncentracija intermedijera na početku reakcije koja se smanjuje kroz prvih sat vremena. Nakon dodavanja ostatka natrijevog karbonata (1,4 eq) dolazi do porasta koncentracije dimera i intermedijera reakcije što dodatno potvrđuje hipotezu postojanja korelacije između visoke koncentracije intermedijera i koncentracije početnog reaktanta ABFCE-a, sa stajališta formiranja dimera.



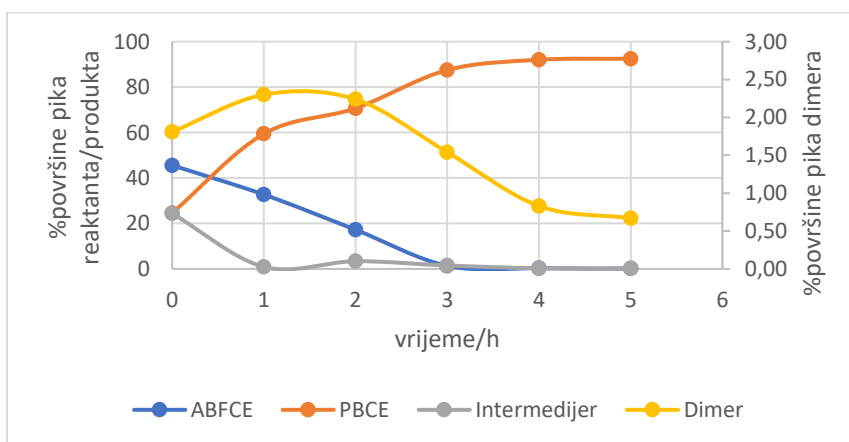
Slika 26. Eksperiment KP/5071/40 – dodavanje Na_2CO_3 u 2 faze: 8 jednakih obroka kroz prvih sat vremena (ukupno 0,7 eq), ostatak (1,4 eq) nakon sat vremena

S ciljem smanjenja zamijećenog porasta koncentracije dimera i intermedijera nakon drugog dodavanja natrijevog karbonata proveden je eksperiment KP/5071/38 (slika 27). Natrijev karbonat dodavan je u 24 pravilno raspoređena obroka čime je uspješno postignuta finalna koncentracija dimera od 0,53 area%. Nakon naknadno provedenih postupaka pročišćavanja kristalnog produkta reakcije, dimer nije zabilježen u konačnom kristalu. Usprkos vrlo dobrim rezultatima, u realnim uvjetima ovakav način dodavanja natrijevog karbonata u reakciju nije primjenjiv zbog poteškoća u izvođenju u velikom mjerilu.



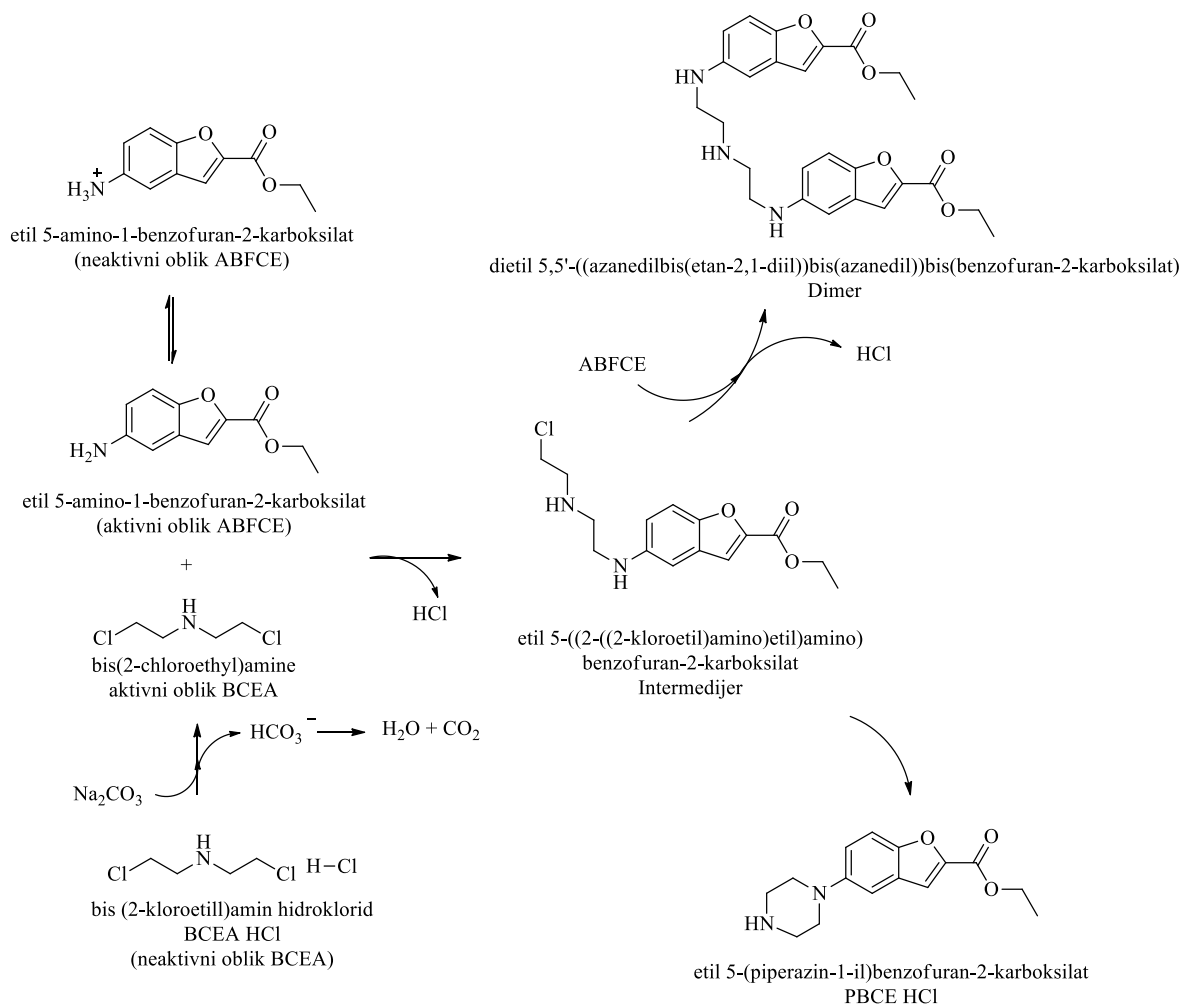
Slika 27. Eksperiment KP/5071/38 - Na_2CO_3 dodavan u 24 pravilno raspoređena obroka

Budući da dodavanje karbonata u puno malih koraka nije praktično u industrijskom mjerilu, u eksperimentu KP/5071/43 (slika 28) istraženo je dodavanje natrijevog karbonata u 3 jednaka obroka od po 0,7 eq. Porast koncentracije primijećen je pri svakom dodavanju natrijevog karbonata, ali u usporedbi sa prijašnjim eksperimentima u kojima se dodaje po 1,4 eq natrijevog karbonata u jednom obroku, dodatkom manje količine karbonata formira se manje dimera. Nadalje, zabilježene su vrlo zadovoljavajuće vrijednosti prinosa reakcije, do 72% prinosa.



Slika 28. Eksperiment KP/5071/43 - dodavanje Na_2CO_3 kroz 3 obroka od 0,7 eq

4.4. Mehanizam sinteze onečišćenja RRT 1,37

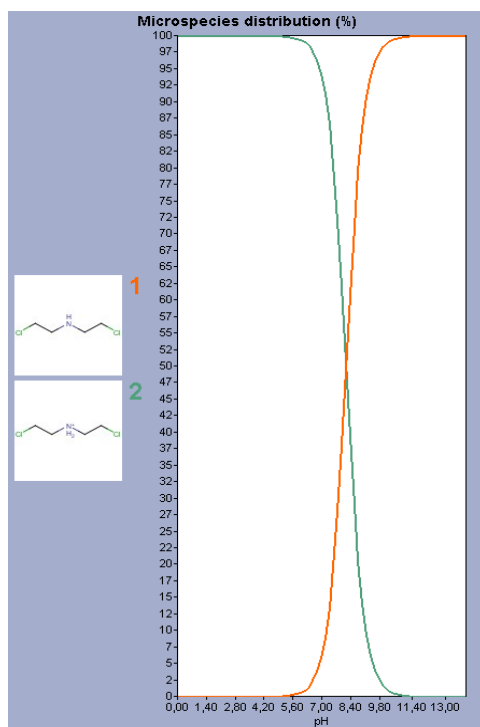


Slika 29. Reakcijska shema nastajanja onečišćenja RRT 1,37 (dimer)

Sinteza onečišćenja RRT 1,37 (slika 29) započinje dodavanjem reaktanata u reaktor u prije navedenim omjerima. Svojom prisutnošću u reakcijskoj smjesi, baza neutralizira HCl iz BCEA HCl čime ga prebacuje u bazni oblik molekule koji je kao takav topiv u reakciji. BCEA reagira s ABFCE prilikom čega se oslobađa HCl koji spušta pH reakcijske smjese. Reakcija se odvija sve dok se pH vrijednost ne spusti ispod kritične vrijednosti pri kojoj ABFCE prijeđe u protonirani oblik koji ne može reagirati sa BCEA. Ponovnim dodatkom natrijevog karbonata pH vrijednost opet se diže iznad kritične vrijednosti za deprotonaciju ABFCE molekula i reakcija se nastavlja.

Baza stupa u interakciju s BCEA HCl molekulom kojoj odcjepljuje HCl skupinu i time je prevodi u bazni, aktivirani oblik molekule. Prema pretpostavljenoj titracijskoj krivulji (korišten je *MarvinSketch* program) sa slike 30., vidljivo je da je bazni oblik molekule BCEA prisutan u uvjetima pH vrijednosti iznad 8,40. Nakon uspješne aktivacije molekula reaktanata, BCEA reagira s deprotoniranom molekulom ABFCE čime dolazi do formiranja intermedijera RRT 1,07 reakcijom zvanom nukleofilna alifatska supstitucija u kojoj se oslobađa HCl.

Intermedijer RRT 1,07, sastavljen od po jedne molekule ABFCE i BCEA može ponovo reagirati unutar sebe nukleofilnom alifatskom supstitucijom na drugom kloridu te tvori piperazinsku funkcionalnu skupinu ili stupa u interakciju s deprotoniranom aktiviranom molekulom ABFCE čime dolazi do sinteze dimera.



Slika 30. Titracijska krivulja BCEA

5. ZAKLJUČAK

- Struktura onečišćenja RRT 1,37 potvrđena je NMR analizom, a na temelju rezultata LC MS analize i NMR-a zaključeno je da se radi o dimeru dviju molekula ABFCE i jedne molekule BCEA.
- Sinteza dimera ima izražen utjecaj na konačni prinos krajnjeg produkta reakcije. Za svaku molekulu dimera koja se formira, gubitak konačnog prinosa reakcije je dvostruk stoga je sintezu dimera potrebno održavati minimalnom.
- Do sinteze dimera dolazi u uvjetima visokog omjera koncentracija intermedijera reakcije i ABFCE.
- Dodatkom baza, natrijevog karbonata ili trietilamina u reakcijsku smjesu dolazi do porasta pH vrijednosti reakcijske smjese što pogoduje reakciji deprotonacije i aktivacije molekule ABFCE. Povećana koncentracija aktiviranih ABFCE molekula pospješuje sintezu intermedijera RRT 1,07 i stvara uvjete za izraženiju sintezu neželjenog dimera.
- Natrijev karbonat je pogodnija baza za sintezu ciljanog produkta reakcije, PBCE HCl.
- Prilikom reakcije sinteze PBCE HCl, umjesto dodavanja bezvodnog natrijevog karbonata u 2 obroka, preporuča se dodavanje u 3 obroka čime se smanjuje količina nastalog dimera.
- Dodatak bezvodnog natrijevog karbonata u reakciju sinteze PBCE HCl potrebno je provoditi pri višim temperaturama, a najbolji rezultati postizani su dodavanjem pri temperaturi refluksa.
- Brzina miješanja također se pokazala kao jedan od faktora koji utječu na količinu sintetiziranog dimera, pri čemu su najbolji rezultati postignuti pri nižim brzinama miješanja. Razlog tome leži u nižem koeficijentu prijenosa mase i sporijem otapanju natrijevog karbonata koji tada aktivira ABFCE molekule.

6. POPIS LITERATURE

Aguilar M, Hearn M (1996) High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods Enzymol* **270**, 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)70003-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)70003-4)

Andrews A (2000) HPLC: A Practical Guide By T. Hanai (Health Research Foundation, Kyoto, Japan). *J Am Chem Soc* **122**, 2974–2974. <https://doi.org/10.1021/JA9957332>

Ardrey RE (2003) Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction. John Wiley & Sons Ltd.,

https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=L8U5ZtLsIFUC&oi=fnd&pg=PR9&dq=lc+ms+chromatography&ots=t9plOB7NCC&sig=xMpnJu9fOfW0LeRBWNfkzMQjyU&redir_esc=y#v=onepage&q=lc%20ms%20chromatography&f=true. Pristupljeno 10. listopada 2023.

Balci M (2005) Basic ^1H and ^{13}C -NMR Spectroscopy. Elsevier, https://books.google.hr/books?id=CPNRYTyAnDcC&hl=hr&source=gbs_navlinks_s. Pristupljeno 13. listopada 2023.

Böttcher H i sur. (1996) Piperidines and piperazines. Patent US005532241A .

Broeckhoven K, Desmet G (2021) Advances and Innovations in Liquid Chromatography Stationary Phase Supports. *Anal Chem* **93**, 257–272. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04466>

Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2008) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218–232. <https://hrcak.srce.hr/43663>

Cummins P, Rochfort K, O'Connor B (2017) Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods Mol Biol* **1485**, 209–223. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_11

Emwas AHM, Merzaban J, Serrai H (2015) Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. *Appl NMR Spectrosc* **1**, 93–130. DOI:10.1007/s11306-013-0524-y

Herbert CG, Johnstone RAW (2002) Mass Spectrometry Basics. CRC PRESS, https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=983ZkPwXXNYC&oi=fnd&pg=PP1&dq=mass+spectrometry+basics&ots=oLZ09nNNO&sig=g22fzTfgJhr0CmPbMgT12bcwts&redir_esc=y#v=onepage&q=mass%20spectrometry%20basics&f=false. Pristupljeno 10. listopada 2023.

Hu B, Song Q, Xu Y (2012) Scale-up synthesis of antidepressant drug vilazodone. *Org Process Res Dev* **16**, 1552–1557. <https://doi.org/10.1021/op300171m>

Neuhaus D (2011) Nuclear Overhauser Effect. *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. <https://doi.org/10.1002/9780470034590.EMRSTM0350.PUB2>

Nigović B, Sertić M (2012) Onečišćenja u lijekovima. *Farm Glas* **68**, 77–88. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:845598>

Otte C, Gold S, Penninx B i sur. (2016) Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers* **2**, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>

Reddy KI, Srihari K, Renuka J, Sree KS, Chuppala A, Jeankumar VU, i sur. (2014) An efficient synthesis and biological screening of benzofuran and benzo[d]isothiazole derivatives for Mycobacterium tuberculosis DNA GyrB inhibition. *Bioorg Med Chem* **22**, 6552–6563. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2014.10.016>

Rhodes CJ (2017) Magnetic resonance spectroscopy. *Sci Prog* **100**, 241–292. <https://doi.org/10.3184/003685017X14993478654307>

Roge A, Firke S, Kawade R, Sarje S, Vadvalkar S (2011) BRIEF REVIEW ON: FLASH CHROMATOGRAPHY. *IJPSR* **2**, 1930–1937. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(8\).1930-37](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(8).1930-37)

Savitz J, Lucki I, Drevets W (2009) 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* **88**, 17–31. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2009.01.009>

Sravani A (2018) A Review Article on Flash Chromatography. *Asian Journal of Research in Chemistry* **11**, 815. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2018.00144.X>

Steiner F, Paul C, Dong WM (2019) HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices. LCGC North America, <https://www.chromatographyonline.com/view/hplc-autosamplers-perspectives-principles-and-practices> . Pristupljeno 28. rujna 2023.

Kazakevich Y, LoBrutto R (2007) HPLC for Pharmaceutical Scientists. Yohn Wiley & Sons, Hoboken, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470087951>. Pristupljeno 15. listopada 2023.

Zotou A (2012) An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry* **10**, 554–569. <https://doi.org/10.2478/s11532-011-0161-0>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Filip Tomšić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis