

# Priprava etravirina, 3-fenilpiridina i 7-etiltriptofola protočnim sustavima

---

**Krajinović, Franjo**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:462176>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Franjo Krajinović

# **Priprava etravirina, 3-fenilpiridina i 7-etiltriptofola protočnim sustavima**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2018.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Plivi Hrvatska d.o.o. (podružnica TEVA TAPI) pod mentorstvom dr. sc. Ernesta Meštrovića, nasl. red. prof. i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Gordane Vrbanec. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta je izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković.



## Zahvale

Zahvaljujem se Plivi Hrvatska d.o.o. (podružnica TEVA TAPI) na utrošenim resursima i prilici da izradim ovaj diplomski rad.

Posebno se zahvaljujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Gordani Vrbanec za uloženi nesvakidašnji trud, energiju i volju da ovaj diplomski rad dovedemo do kraja. Osobito na tome što joj nije bilo žao uložiti dodatni napor koji nadilazi opis posla da bi ovaj projekt bio doveden do zadovoljavajućeg kraja.

Zahvaljujem se članovima stručnog povjerenstva.

Osobito se zahvaljujem profesoru dr. sc. Ernestu Meštroviću bez kojeg ovog rada ne bi bilo.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na korisnim savjetima i napucima.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević, izv. prof. dr. sc. Branimiru Bertoši i izv. prof. dr. sc. Ivanu Kodrinu na uloženom trudu i savjetima koji su unaprijedili rad.

Zahvaljujem se dr. sc. mont. Ivanu Krajinoviću, te kolegama Martinu Jendrlinu, mag. chem. i Martini Gačar, mag. biol. mol. na velikodušnoj pomoći oko lekture.

Zahvaljujem se Prirodoslovno-matematičkom fakultetu te njegovom osoblju na godinama truda i zalaganja koje su dovele do ostvarenja ovog diplomskog rada.



## Sadržaj

<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Cilj i hipoteza .....	1
1.2. Opseg i metode .....	1
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
2.1. Protočni sustavi .....	2
2.2. Odabrane reakcije .....	5
2.2.1. Priprava aromatskog etera.....	5
2.3. Računalni modeli i dizajn eksperimenata .....	9
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
3.1. Materijali i metode.....	12
3.1.1. Kemikalije.....	12
3.1.2. Pribor i metode.....	13
3.2. Priprava etravirina .....	15
3.2.1. Reakcijski uvjeti.....	15
3.3. Priprava 3-fenilpiridina .....	18
3.3.1. Pretraživanje reakcijskih uvjeta u protočnom reaktoru.....	18
3.4. Priprava 7-etiltriptofola.....	19
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
4.1. Priprava etravirina .....	21
4.1.1. Priprava etravirina u klasičnom reaktoru.....	21
4.1.2. Priprava etravirina u protočnom reaktoru.....	25
4.2. Pokušaj pripreme 3-fenilpiridina u protočnom reaktoru. ....	27
4.3. Priprava 7-etiltriptofola.....	28
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>35</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	<b>36</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>37</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XVI</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Priprava etravirina, 3-fenilpiridina i 7-etiltriptofola u protočnim reaktorima

Franjo Krajinović

Istražene su kemijske reakcije priprave poznatih spojeva: etravirina, 3-fenilpiridina i 7-etiltriptofola u protočnim reaktorima. Priprava etravirina najprije je uspješno provedena u šaržnom procesu uz kalijev karbonat kao bazu te je izrađen model praćenja reakcijske kinetike. Priprava etravirina u protočnom reaktoru nije bila uspješna ni nakon promjene baze (trietilamin i amonijak umjesto kalijeva karbonata). Priprava 3-fenilpiridina u protočnom reaktoru također je bila neuspješna zbog gubitka katalitičke moći korištenog katalizatora. Spoj 7-etiltriptofol uspješno je pripremljen u protočnom reaktoru te su optimirani reakcijski uvjeti. Konverzija reaktanta praćena je infracrvenom spektroskopijom i tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti uz 7-etiltriptofol i etravirin kao standarde. Standardi su prethodno identificirani spektroskopijom protonske nuklearne magnetske rezonancije i tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa.

(38 stranica, 18 slika, 9 tablica, 34 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor: dr. sc. Ernest Meštrović, nasl. red. prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Gordana Vrbanec

Nastavnik: izv. prof. dr.sc. Vesna Petrović Peroković

Ključne riječi: dizajn eksperimenata, etravirin, 7-etiltriptofol, 3-fenilpiridin, protočni reaktori

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  2. dr. sc. Ernest Meštrović, nasl. red. prof.
  3. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
  4. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Datum diplomskog ispita: 4. rujna 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Preparation of etravirine, 3-phenilpyridine, and 7-ethyltryptophol using flow reactors

Franjo Krajinović

Known chemical reactions were examined: etravirine, 3-phenilpyridine, and 7-ethyltryptofole in the flow reactors. Preparation of etravirine was first completed in a batch process with potassium carbonate as base and model for monitoring reaction kinetic was designed. Preparation of etravirine in flow reactor failed after the base change (triethylamine and ammonia). Preparation of 3-phenilpyridine failed due to depletion of the catalytic power of the catalyst. Compound 7-ethyltryptophol was successfully prepared and reaction conditions were optimized. The reactants conversion was monitored by means of the infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography. Compounds 7-ethyltryptofole and etravirine were used as reference standards. Standards were identified by means of proton nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

(38 pages, 18 figures, 9 tables, 34 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: design of experiments, flow reactors, 7-ethyltryptofole, etravirine, 3-phenyl pyridine

Mentor: Dr. Ernest Meštrović

Assistant mentor: Dr. Gordana Vrbanec

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Vesna Petrović Peroković

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.
  2. Dr. Ernest Meštrović, Prof.
  3. Dr. Sanda Rončević, Assoc. Prof.
  4. Dr. Branimir Bertoša, Assoc. Prof.
- Substitute: Dr. Ivan Kodrin Assist. Prof.

Date of exam: 4<sup>th</sup> September 2018



## § 1. UVOD

### 1.1. Cilj i hipoteza

Cilj ovog diplomskog rada jest provesti odabrane organske reakcije u protočnom reaktoru, te optimirati reakcijske uvjete. Odabrane su reakcije pripreve:

- a) etravirina koristeći 4-((4-amino-5-brom-6-klorpiridin-2-il)amino)benzonitril (BCAPBN) i 4-hidroksi-3,5-dimetilhidroksibenzonitril (DMHB) kao polazne tvari,
- b) 3-fenilpiridina iz fenilborne kiseline i 3-brompiridina kao polaznih tvari,
- c) 7-etiltriptofola reakcijom 2,3-dihidrofurana (DHF) i 2-etilfenilhidrazin hidroklorida.

Reakcije pripreve odabranih spojeva poznate su metodom klasične sinteze u šaržnom procesu (eng. *batch*), te su odabrane za ispitivanje u protočnim sustavima.

### 1.2. Opseg i metode

U izvedbi eksperimenata korišteni su protočni reaktori koji omogućuju rad pri povišenom tlaku, te time iznad temperatura vrelišta otapala.

Dizajn eksperimenata (eng. *Design of Experiments, DoE*), korišten je za optimiranje reakcijskih uvjeta. Dizajn eksperimenata statistička je metoda koja omogućuje ispitivanje utjecaja parametara na odziv uz smanjenje broja pokusa.

Za praćenje reakcija korištene su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC), infracrvena spektroskopija (IR) i spektrofotometrija u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra (UV/Vis). Uspješna priprava 7-etiltriptofola potvrđena je vezanim sustavom tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (LC-MS). Dobiveni produkti uspoređeni su sa standardom iz baze (TAPI, istraživanje i razvoj). Identitet standarda potvrđen je spektroskopijom protonske nuklearne magnetske rezonancije ( $^1\text{H}$  NMR) i tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (LC-MS).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Protočni sustavi

Protočni reaktori dopuštaju kontinuirani tok reaktanata kroz reaktor pri čemu se oni izlažu reakcijskim uvjetima. Miješanje reaktanata posljedica je difuzije i brzine protoka otapala. Rad u protočnom reaktoru dopušta korištenje tlakova viših od atmosferskih što omogućuje maksimalnu temperaturu reakcijske smjese u tekućoj fazi. Povišenje maksimalne temperature pak omogućava ubrzavanje kinetički kontroliranih reakcija, kao i reakcija kod kojih je promjena reakcijske entropije veća od nule.<sup>1,2,3</sup>

Protočni reaktori svinute su cijevi volumena od nekoliko mililitara (korišteni su reaktori od 2 mL i 10 mL) na polimernom ili čeličnom nosaču s odgovarajućim priključcima. Protočni reaktori spregnuti su jednom ili više pumpi koje pogone otapalo i reaktante kroz protočni reaktor i spojne cijevi. U kontrolni sustav nužno je unijeti podatke o promjeru i duljini svih cijevi u sustavu. U slučaju jedne pumpe, difuzija u otopini može se objasniti kao sudari čestica analogni Brownovom gibanju. U tom načinu gibanja čestica u polju, čestica se sudara s drugim česticama i odbija nasumično, dok se sve čestice sumarno pomiču u smjeru nižeg potencijala.<sup>1,4,5,6</sup>

U slučaju više mlazova, međusobno miješanje i sudari ovise i o svakoj pojedinoj brzini mlaza. Više mlazova tekućine se pri konstantnoj širini cijevi spajaju i ukupna brzina protoka jest zbroj brzina svih mlazova. Što su mlazovi brži, brže je miješanje zbog veće ukupne brzine čestica. Povećanjem promjera cijevi reaktora, miješanje postaje teže jer se udaljenosti povećavaju. Čestice u mlazu, kao i mlaz ukupno, ne gibaju se savršeno, niti samo u sumarnom smjeru izlaza iz reaktora. U širim cijevima javljaju se efekti poput mrtvih zona u kojima se dio čestica giba mnogo sporije u sumarnom smjeru gibanja. Različiti slojevi čestica imat će različite brzine. Takve pojave rezultiraju neponovljivošću eksperimenata.<sup>7,8</sup>

Način protoka najčešće se objašnjava Reynoldovim brojem ( $Re$ ). Reynoldov broj je najvažnija bezdimenzijska veličina kojom se opisuje protok. Niske  $Re$  vrijednosti upućuju na laminarno strujanje, a visoke na turbulentno. Većina protočnih laboratorijskih reaktora ima niske ili srednje vrijednosti  $Re$ , stoga se u njima očekuje laminarno strujanje.

$$Re = \frac{u L}{\nu} \quad (1)$$

Broj  $Re$  određuje se sukladno jednadžbi 1 pri čemu je  $u$  brzina fluida prema objektu,  $L$  je karakteristična linearna dimenzija, a  $\nu$  kinetička viskoznost fluida.<sup>1</sup>

Kada se kao reaktanti koriste krutine, zbog nestajanja reaktanata tokom reakcije dolazi do nehomogenih uvjeta uslijed promjene koncentracija i/ili volumena u reaktoru. Korištenjem plinova pojavljuju se „rupe“ zbog mjehurića koje utječu na miješanje i brzinu protoka te mogu izazvati odstupanja od izračunatih protoka i sakupljenih frakcija.<sup>9,10</sup>

Ovisno o tehničkim karakteristikama i promjeru cijevi moguće je koristiti otopine ili suspenzije. Ako sustav dozvoljava korištenje suspenzija, tada se mogu koristiti netopive kemikalije što proširuje spektar mogućih reakcija.<sup>11</sup>

S obzirom na zatvorenost sustava od vanjskih utjecaja, uz ograničenja snage pumpe i izdržljivosti cijevi, moguće je mijenjati tlak u sustavu. Provođenje reakcija pri povišenom tlaku omogućuje rad pri višim temperaturama od vrelišta otapala ili reaktanata. Više temperature obično skraćuju vrijeme reakcije, osobito za temperaturno osjetljive sustave. Sličnu prednost daje solvotermalna sinteza, ali pruža mnogo manje mogućnosti za mijenjanje reakcijskih uvjeta. Topljivost reaktanata ograničavajući je faktor za provođenje reakcija ukoliko sustav ne dozvoljava rad sa suspenzijama.<sup>12</sup>

### 2.1.1. Sustav plin/tekućina

Plinovi su uglavnom ekonomični s obzirom na odnos molarne mase i mase (velika množinska gustoća), ali se najčešće koriste u velikom suvišku zbog slabog interfacijalnog miješanja. Mala interfacijalna miješanja uglavnom rezultiraju vrlo sporim reakcijama. Upotreba dugih tankih cijevi velikih površina u protočnim reaktorima često rezultira dovoljnim interfacijalnim površinama i kraćim reakcijskim vremenima.<sup>1</sup>

Topljivost plinova pri niskim tlakovima najčešće je niska, što usporava reakcije i utječe na iskorištenje. Povišeni tlak u protočnim reaktorima povećava topljivost plinova u tekućinama te skraćuje reakcijsko vrijeme.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Sustav krutina/tekućina

Heterogene reakcije krutina i tekućina popularne su zbog lakog odvajanja supstanci na kraju reakcije. Najčešća primjena metode je heterogena kataliza iz razloga što ne dolazi do potrošnje krute faze. Pri tome se zadržavaju potpuno homogeni reakcijski uvjeti reakcije u reaktoru. Heterogeni katalizatori najčešće se nanose u kolonske reaktore.<sup>1</sup>



Primjena heterokatalize moguća je i za sustave tekućina/krutina/plin. Najpoznatiji primjer ovakvog sustava je reakcija hidrogeniranja, pri čemu se koriste heterogeni katalizatori visokih specifičnih površina, dok je u tekućoj fazi otopljen reaktant i vodik.<sup>1</sup>

### 2.1.3. Sustav tekućina/tekućina

Mali volumeni i velike površine cijevi reaktora pojačavaju miješanje u usporedbi s klasičnim reaktorima. Najveći izazov predstavlja očuvanje stabilnog protoka, što najčešće dovodi do produljenih reakcijskih vremena, u usporedbi s ostalim protočnim sustavima.<sup>1,11</sup>

Kod niskih brzina protoka različiti mlazovi imaju isti prijenos mase. To olakšava rad s tvarima značajno drugačijih koncentracija, no cijeli sustav ima sporije miješanje. Kod visokih brzina protoka dizajn reaktora najvažniji je čimbenik u prijenosu mase. Osobito su pogodni reaktori od čelika s visokim udjelom nikla i ugljika, pri čemu dolazi do turbulentnog miješanja struja reaktanata. Nedostatak istih veća je potrošnja materijala.<sup>1</sup>

### 2.1.4. Fotokemijska i mikrovalna primjena

Protočni reaktori mogu nadoknaditi volumna ograničenja za mikrovalne i fotokemijske sustave. S obzirom da sustavom konstantno teku mali volumeni otopine, mogu se sustavno i potpuno izlagati utjecajima UV/Vis i mikrovalnog zračenja. Pri tome se ne stvaraju nehomogeni uvjeti zbog dubine proboja elektromagnetskog zračenja.<sup>1,13</sup>

### 2.1.5. Elektrokemijska primjena

Kao alternativa klasičnim oksidansima i reducensima, protočni reaktor može se koristiti tako da se supstrat u visokoselektivnim uvjetima reducira na katodi, a oksidira na anodi. Proces se odvija upotrebom vanjskog naboja koji se najčešće krutim elektrodama uvodi u reakcijski sustav.<sup>13</sup>

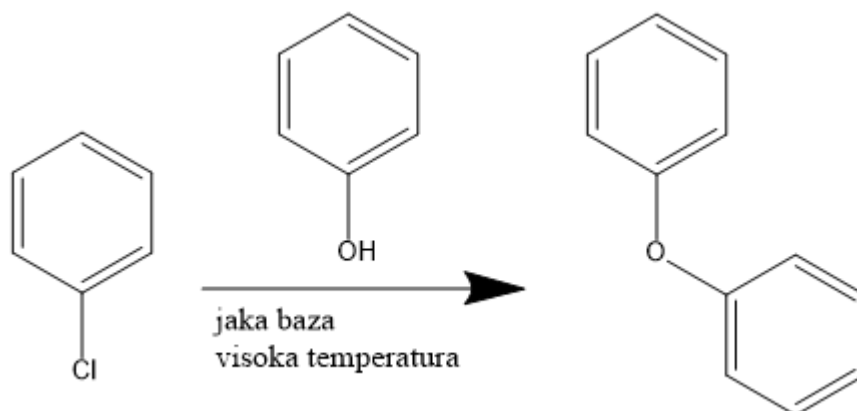
U elektrokemijskoj analizi pravilan smještaj elektroda nije problematičan, jer se koriste male elektrode. U klasičnim reaktorima elektrolitičke metode često stvaraju neželjene nusprodukte zbog promjenjivog otpora koji onda utječe na napon sustava.<sup>2,13</sup>

Prednost protočnih reaktora jest i ta što u slučaju nastanka plinova, nema opasnosti od eksplozije ili izolacije elektrode od sustava, zato jer se plin silom protoka sustava konstantno pomiče od elektroda. Plinovi također imaju bolju topljivost u otapalu.

## 2.2. Odabrane reakcije

### 2.2.1. Priprava aromatskog etera

Priprava aromatskog etera (slika 1) jest način priprave etera reakcijom alkohola s halogenalkanom. Reakcija se odvija u prisutnosti baze, pri povišenoj temperaturi, mehanizmom nukleofilne supstitucije na ugljikovom atomu molekule acilhalogenida. Ovisno o vrsti reaktanata, mehanizam reakcije može biti pomaknut prema  $S_N1$  ili  $S_N2$  mehanizmu, sukladno James-More-O'Ferrall dijagramima za specifičnu reakciju.

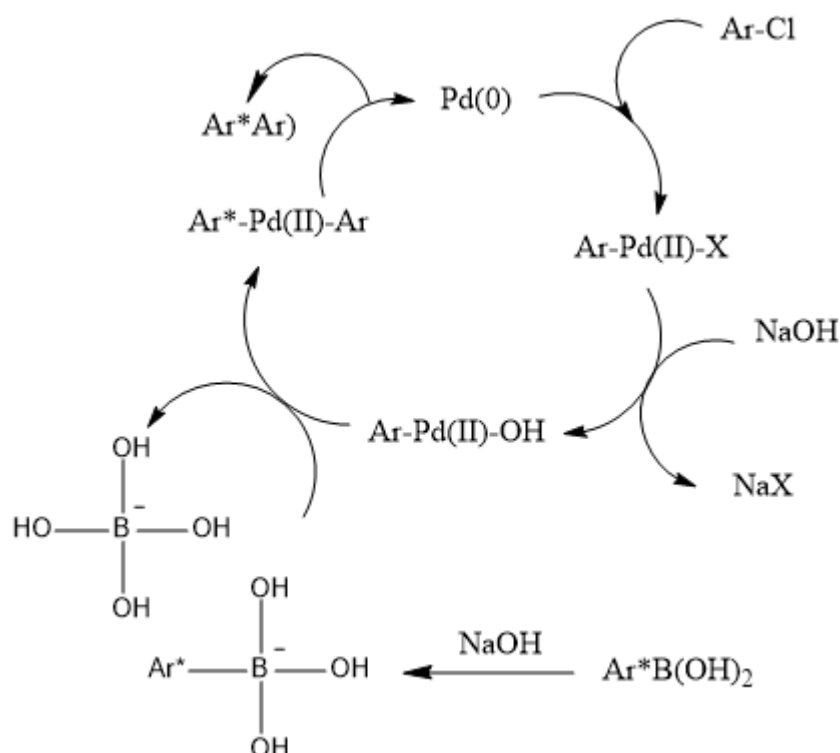


Slika 1. Shema priprave aromatskog etera

Priprava aromatskih etera provedena je u ključnom koraku sinteze etravirina. Etravirin je lijek korišten za liječenje infekcija uzrokovanih virusom humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1). Lijek je druge generacije nenukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze. Veže se izravno na reverznu transkriptazu i narušava strukturu katalitičkog mjesta enzima. Dizajniran je tako da bude aktivan protiv virusnih sojeva HIV-1 s mutacijama koje im daju otpornost na nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze (lijekove prve generacije). Sposobnost za to dolazi od fleksibilnosti strukture etravirina. Etravirin je biarilpirimidinska molekula koja veže reverznu transkriptazu u više konformacija, što omogućuje robusniju interakciju enzima i etravirina unatoč mutacijama.<sup>14</sup>

## 2.2.2. Suzukijevo sparivanje („Suzuki coupling“)

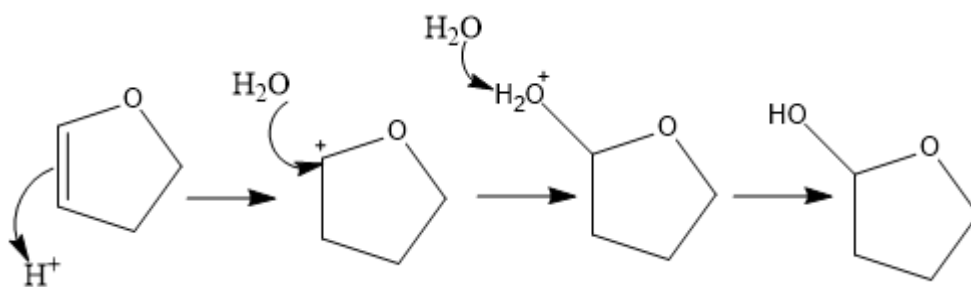
Suzukijevo sparivanje katalizirana je organska sintetska reakcija u kojoj supstituirana boronska kiselina reagira s organskim halidima u prisutnosti paladijevog katalizatora i jake baze (slika 2). Produkti ove vrste reakcija su anorganska sol boronske kiseline i sparni organski fragment supstituirane boronske kiseline te acilni fragment acil-halogenida pri čemu nastaje jednostruka kovalentna ugljik-ugljik veza između ugljikovog atoma vezanog na boronsku skupinu, odnosno vezanog na halogeni atom.



Slika 2. Mehanizam Suzukijevog sparivanja

## 2.2.3. Adicija vode na dvostruku vezu 2,3-dihidrofurana (DHF)

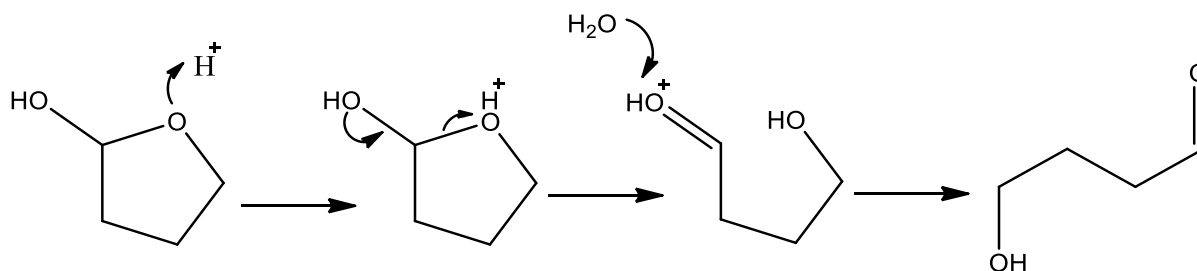
Adicija vode na dvostruku vezu molekule DHF-a između ugljikovih atoma na položajima 2 i 3 uz sumpornu kiselinu odvija se mehanizmom elektrofilne adicije (slika 3). Za dobra reakcijska iskorištenja potrebna je katalitička količina kiseline te veliki suvišak vode. Povišenje molarnih ekvivalenata kiseline od katalitičkih količina prema suvišku, pomiče reakciju prema nastanku reaktanata (eliminaciji). Sekundarni alkoholi pripremaju se lakše od primarnih i teže od tercijskih.



Slika 3. Mehanizam adicije vode na dvostruku vezu u kiselim uvjetima

#### 2.2.4. Otvaranje prstena 2-hidroksitetrahidrofurana

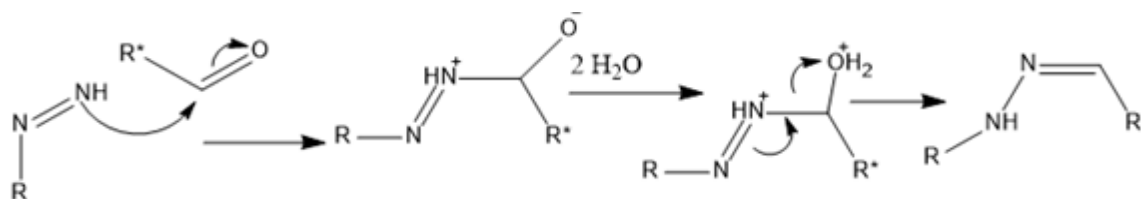
Do inicijacije reakcije dolazi kada se atom kisika u okosnici prstena protonira (slika 4.). Time kisik postaje pozitivno nabijen. Veza kisika u prstenu sa susjednim ugljikom se cijepa te dolazi do pomaka naboja pri čemu slobodan elektronski par s kisikovog atoma hidroksilne skupine formira dvostruku vezu, a kisik postaje pozitivno nabijen. Voda nukleofilno napada elektrofilni dio molekule i veže vodik s kisika povezanog dvostrukom vezom s ugljikom. Kao produkt nastaje terminalni hidroksialdehid.



Slika 4. Mehanizam adicije vode na dvostruku vezu u kiselim uvjetima

#### 2.2.5. Nastanak hidrazona

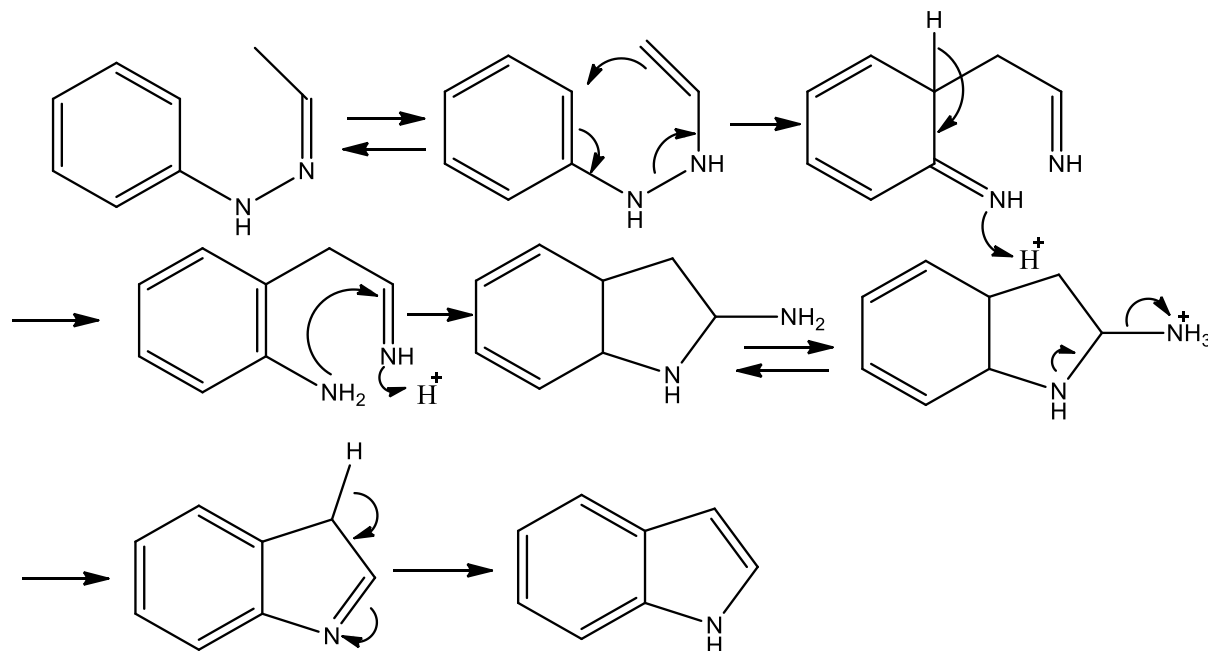
Hidrazoni nastaju nukleofilnim napadom nepodijeljenog elektronskog para terminalnog dušika hidrazina na karbonilni ugljikov atom (slika 5).



Slika 5. Mehanizam nastajanja hidrazona iz supstituiranih hidrazina

## 2.2.6. Fisherova indolna kondenzacija

Fisherova indolizacija je reakcija arilhidrazona u prisutnosti kiseline na povišenoj temperaturi (slika 6).



Slika 6. Mehanizam Fischerove indolne kondenzacije

Fisherova indolizacija ključan je korak u sintezi 7-etiltriptofola, koji je važna sirovina u sintezi aktivnih farmaceutskih supstanci (API) kao što su *etodolac*, *indoramin* i *sumatript*. Klasične metode sinteze daju izrazito visoke udjele nečistoća koje su posljedica [3+3] sigmatropne pregradnje, prisutnosti neaktiviranog oblika 2,3-dihidrofurana (DHF), dimerizacije i konkurentskih reakcija.<sup>15</sup>

### 2.3. Računalni modeli i dizajn eksperimenata

Kinetika i mehanizam kemijske reakcije često ovise o parametrima kao što su temperatura, vrijeme reakcije, vrsta otapala, pH područje, omjer reaktanata itd. U velikom broju slučajeva ekonomski je i vremenski zahtjevno ako se za optimiranje svakog pojedinog parametra mora izvoditi zaseban eksperiment.<sup>16</sup>

Dizajn eksperimenata (eng. *DoE*) statistička je metoda kojom se unaprijed planiraju eksperimenti iz kojih se statistički značajno može odrediti utjecaj promjene pojedinih parametara te linearne kombinacije parametara na odzivnu funkciju. Računalni program dizajnira eksperimente na način da reducira broj potrebnih reakcija za optimiranje reakcijskih uvjeta i željeni red interakcija među parametrima. Statistička matrica određena je najmanjom i najvećom vrijednošću razmatranog parametra. Odziv pri određenim uvjetima unese se u računalni program. Program iz navedenih podataka računa statistički utjecaj promjene parametara (utjecaji prvoga reda) i međusobne ovisnosti parametara (utjecaji viših redova) na promjenu odziva.

Parametre možemo u osnovi podijeliti na kontrolirane i nekontrolirane parametre. Kontrolirani brojčani parametri, mogu pak biti kontinuirani ili diskretni. Kontinuirani parametri su one veličine koje mogu poprimiti bilo koju vrijednost. Primjeri kontinuiranih parametara su temperatura reakcijskog sustava, vrijeme reakcije, omjer reaktanata, pH sustava i sl. Diskretni opisni parametri su oni koji mogu poprimiti točno određene vrijednosti, primjerice jedan, tri, pet i sedam. Kontrolirani opisni parametri su oni koji se odnose na vrstu parametra. Primjeri kontroliranih opisnih parametara su vrsta baze, vrsta otapala, način miješanja i sl. Suma nekontroliranih parametara naziva se šum. Primjeri nekontroliranih parametara su atmosferski tlak, sobna temperatura, vlažnost zraka u laboratoriju i sl.

Prije same izrade dizajna eksperimenata potrebno je odrediti granice parametara koji se ispituju. Najčešće je potrebno napraviti pretraživanje reakcijskih uvjeta ispitivanjem širokog raspona vrijednosti za željene parametre. Željeni parametri su veličine za koje se pretpostavlja da utječu na odziv procesa. Bitno je razlikovati i zadati razliku između kvalitativnih i kvantitativnih parametara. Poželjno je ponoviti određeni broj reakcija kako bi se procijenila pogreška slučajnih parametara tj. šum eksperimenta.<sup>17</sup>

Model je statistička reprezentacija utjecaja parametara na odziv. Moguće ga je izraditi bez ciljanog dizajna, drugačijim variranjem reakcijskih uvjeta. Najčešće je drugačije variranje u izradi modela posljedica ograničenja u vremenu, resursima ili načinu provođenja

eksperimenta. U tom slučaju pouzdanost modela može biti manja od one dobivene ciljanim dizajnom. Model daje samo numeričku reprezentaciju varijabli (značajnih faktora), dok je na istraživaču da objasni znanstvenu pozadinu istih.

Model se izrađuje iz dobivenih podataka, obično iz *DoE*. Utvrđuje se utjecaj pojedinog parametra reakcije te im se pripisuje kemijsko objašnjenje. Zatim se utvrđuje nasljednost i raširenost efekata u modelu. Centralna točka je srednja vrijednost ispitivanog parametara u modelu. Njima se određuje postojanje nelinearnih utjecaja i mogućnost greške u modelu. Ponovljenim pokusima određuje se ponovljivost. Testom slaganja moguće je ispitati model na manje značajne efekte.<sup>17</sup>

Validacija modela obično se provodi uvođenjem dodatnog pokusa s obzirom na broj pokusa iz dizajna i usporedbom slaganja s modelom ili usporedbom sa sličnim postojećim modelom. Model omogućuje procjenu reakcijskih uvjeta za promjenu značajnih faktora s obzirom na odziv sustava. Granice valjanosti modela nalaze se unutar maksimalne i minimalne istražene vrijednosti utjecaja faktora na odzivnu funkciju.

Najvažniji parametri dobiveni metodom dizajna eksperimenata i obradom rezultata trebali bi pokazati:<sup>17</sup>

- Broj značajnih faktora i jesu li faktori fiksni ili slučajnog odabira
- Jesu li potrebni kontrolni uvjeti i ako jesu koji su
- Manipulacijske provjere i provjera njihove djelotvornosti
- Pozadinske varijable
- Veličinu uzorka i je li uzorak statistički značajan
- Razinu i značaj odnosa među faktorima
- Utjecaj zakašnjelih efekata i nezavisnih faktora na ishod
- Kako promjena odziva utječe na promjenu vlastitih mjernih/izmjerenih veličina
- Vjerojatnost pogreške stroja tokom, prije ili nakon mjerenja
- Mogućnost korištenja testnih eksperimenata
- Postojanje sakrivenih varijabli
- Pretpostaviti mogućnost ljudske greške
- Vjerojatnost promjene različitih uvjeta na iste jedinice
- Broj kontrolnih faktora koje treba uključiti
- Iste parametre treba uzeti u obzir prilikom procjene eksperimenata i rezultata

U sintezi aktivnih farmaceutskih supstanci (API) prisutno je sedam koraka razvoja kvalitetnog modela. Prvi korak je navođenje svih svojstava API-a, s obzirom na psihokemijske, analitičke i sigurnosne kategorije pri čemu se kategorije tretiraju zasebno. Drugi je korak predviđanje rizika s obzirom na kvalitetu dizajna i ciljane zahtjeve kvalitete. Koristeći modul za promašaj i efekte analize pretražnim (eng. *screening*) pokusima dobivaju se potrebni parametri. Treći korak sastoji se od identifikacije kritičnih parametara i kritičnih polaznih materijala. Najvažniji parametri za kritične polazne materijale su cijena, čistoća i sigurnost rada. Kritični procesni parametri identificiraju se prema odzivnim funkcijama korištenim u dizajnu i numerička su reprezentacija efekata na odziv. Četvrti korak identifikacija je efekata s obzirom na unos varijabli. Pretražni pokusi dizajnirani su na način da daju informaciju o odnosu unosa varijabli i njihovog efekta na odziv kao i kvalitetu dizajna. Peti korak je kontrolirana strategija. Procesnim analitičkim alatima kontrolira se zadržavanje procesa unutar opsega zadanog dizajnom. Šesti je korak reevaluacija rizika. Nakon razvoja strategije i identifikacije kritičnih parametara i materijala pristupa se ponovnoj procjeni rizika nakon optimizacije procesa s obzirom na kvalitetu procesa. Posljednji je korak nastavljanje promatranja i reevaluacije rezultata s obzirom na efekte zapažene u proizvodnji se optimizacija s obzirom na njih.<sup>17</sup>

### 2.3.1. Program JMP

Program korišten za modeliranje u ovom diplomskom radu omogućuje izradu i planiranje različitih modela i dizajna eksperimenta. Sadrži nekoliko desetaka osnovnih oblika dizajna od kojih svaki ima naglašenu orijentaciju prema specifičnom cilju u eksperimentalnom radu. Program omogućuje unaprjeđenje, evaluaciju, usporedbu s drugim modelima, procjene statističke vrijednosti pretražnih pokusa kao i rad s nelinearnim parametrima.



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Kemikalije

U radu korištene su kemikalije sljedećih proizvođača:

- *Aldrich Chemistry*: fenilboronska kiselina (čistoće 95 %), 3-brompiridin (čistoće 99 %), 2-etilfenilhidrazine hidroklorid (čistoće 98 %), 2,3-dihidrofuran (čistoće 98 %)
- *Sinocompound*: diacetobis(trifenilfosfin)paladij(II)
- *Kemika*: koncentrirana sumporna kiselina (čistoće 96 %)
- Interna priprava: 4-((4-amino-5-brom-6-klorpiridin-2-il)amino)benzonitrila, (čistoće 96 % površine) i DMHB (čistoće 98 % površine)
- Razni proizvođači: acetonitril, dimetilsulfoksid NaOH, metanol, *N*-metilpirolidin, tetrahidrofuran, demineralizirana voda, etanol (sve tehničke čistoće)

Svi navedni omjeri otapala u radu su volumi omjeri.

### 3.1.2. Pribor i metode

Reakcije su provođene uz korištenje Vapourtec R2S pumpi (slika 7). Pumpni modul sastoji se od dvije pumpe, maksimalnog tlaka do 10 bara, R-4 grijača reaktora, kontrolnog gumba, cijevnog sustava, dva injekcijska modula i metalnog kućišta. Pumpama se upravlja postojećim računalnim sustavom.



Slika 7. Vapourtec R2S pumpe<sup>18</sup>

Najveća brzina protoka otapala kroz pumpe je 10 mL u minuti, dok sustav omogućuje rad pri temperaturama od -50 do 250 °C. Dozvoljena vrijednost za korišteni reaktor je maksimalno 150 °C.

Sustav dozvoljava računalno praćenje tlaka, temperature, vremena zadržavanja i brzine protoka.

Protočni reaktor može biti spregnut s automatskim uzorkivačem (eng. *autosampler*) čime se može automatizirati provođenje reakcija.

Korišteni je reaktor volumena 1 L, te protočni reaktori volumena 2 i 10 mL.

Za pripremu otopina korišteno je uobičajeno laboratorijsko posuđe. Reakcije su praćene na Agilent 1100 kromatografu uz Waters Xbridge Shield RPC18, 150 x 4,6, 3,5  $\mu\text{m}$  koloni. Kao pufer korišten je  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,36  $\text{g/L}^{-1}$  vode) pri čemu je pH podešen na 6,5 uz KOH (10 %). Kao mobilna faza A korištena je smjesa acetonitrila i vode (80:20) te kao mobilna faza B čisti acetonitril. Vrijeme zadržavanja na koloni iznosilo je 30 min. Temperatura sustava podešena je na 45 °C.

### 3.1.3. Praćenje reakcije *in-line*

Reakcija pripreme etravirina praćena je infracrvenom spektroskopijom *in line*, pri čemu je vrijeme reakcije iznosilo 24 sata, dok su spektri prikupljeni u intervalima od 5 minuta. Spektri su prikupljeni atenuiranim totalnim refleksijama infracrvenog zračenja (eng. *Attenuated Total Reflectance, ATR*) pomoću spektrofotometra BRUKER MATRIX MF opremljenog dijamantnom sondom. Spektralno područje koje nosi najviše informacija i pogodno je za kvalitativnu obradu je 650-1800  $\text{cm}^{-1}$ . Analizom glavne komponente (eng. *principal component analysis*) utvrđena je odgovarajuća kvaliteta prikupljenih spektara. Za obradu spektara korišteni su softverski alati Unscrambler X ver 10.4 i OPUS 7.2.0.

### 3.1.4. Softverski alati korišteni za izradu modela

Za modeliranje optimalnih uvjeta pripreme 7-etilriptofola korišten je program podrške JMP verzija 13.0.

## 3.2. Priprava etravirina

### 3.2.1. Reakcijski uvjeti

Spojevi BCAPBN (100,0 g), DMHB (72,5 g),  $K_2CO_3$  (140,4 g), NMP (700 mL) i acetonitril (300 mL) šaržirani su u reaktor od 1 L. Suspenzija je zagrijana na temperaturu vrenja (108 - 112 °C) i zagrijavana 18 sati nakon postizanja temperature vrenja. Reakcija je praćena IR spektroskopijom i metodom HPLC. Po završetku reakcije, smjesa je ohlađena na 58 - 62 °C te je filtriran suvišak kalijevog karbonata. Filtrat je ohlađen na sobnu temperaturu, kristali su isprani s 700 mL demineralizirane vode. Filtrat je prekrizaliziran iz butan-2-ola, profiltriran i sušen na 60 °C uz sniženi tlak do konstantne mase. Izolirano je 110 g ( $\eta = 89,56\%$ ) suhog kristaliničnog produkta.<sup>14</sup>

Za pripravu etravirina u protočnim reaktorima napravljen je dizajn (Tablica 1) na temelju pretražnih pokusa (Tablica 2.). Varirani parametri bili su: reakcijsko vrijeme, koncentracije reaktanata, omjer reaktanata te temperatura reakcije.

Tablica 1. Tablica pokusa DoE za pripravu etravirina, uz trietilamin (TEA) kao bazu, na temelju 11 pretražnih pokusa

$t/^{\circ}\text{C}$	$n(\text{BCAPBN})/n(\text{DMHB})$	$c(\text{BCAPBN})/$ $\text{mol L}^{-1}$	$c(\text{DMHB})$ $/\text{mol L}^{-1}$	$t/\text{min}$
120	1,25	0,2	1	25
140	1	0,5	1	45
140	1	0,5	0,2	25
140	1	0,5	0,2	45
120	1	0,5	1	25
120	1	0,2	0,2	45
120	1,25	0,2	1	45
120	1	0,2	0,2	25
140	1,25	0,2	0,2	25
140	1,25	0,5	1	25
120	1,25	0,5	0,2	25
120	1,25	0,2	0,2	25
140	1	0,2	1	25
120	1	0,5	1	25
140	1	0,2	0,2	45
120	1,25	0,5	0,2	45
140	1,25	0,5	0,2	45
120	1	0,5	0,2	45
120	1	0,2	1	45
140	1	0,2	0,2	25
140	1,25	0,2	1	45
130	1,125	0,35	0,6	35
130	1,125	0,35	0,6	35
130	1,125	0,35	0,6	35

Tablica 2. Pretražni pokusi za pripravu etravirina uz amonijak kao bazu napravljen na temelju 11 pretražnih pokusa

$t/^{\circ}\text{C}$	$n(\text{BCAPBN})/n(\text{DMHB})$	$c(\text{BCAPBN})/$ $\text{mol L}^{-1}$	$c(\text{DMHB})/$ $\text{mol L}^{-1}$	$t/\text{min}$
110	1,6	0,5	1	5
140	1,6	0,5	1	5
140	1,6	0,5	1	30
110	1,4	0,5	1	30
140	1,8	0,5	1	30
140	1,6	0,5	1	120
140	1,6	0,5	1	30
140	1,6	0,3	0,76	30
140	1,2	0,3	0,76	30
110	1,2	0,3	0,76	30
140	1,4	0,3	0,76	60

### 3.3. Priprava 3-fenilpiridina

#### 3.3.1. Pretraživanje reakcijskih uvjeta u protočnom reaktoru

Pretražni pokusi za optimiranje reakcije fenilboronske kiseline i 3-brompiridina vođeni su uz diacetobis(trifenilfosfin)paladij(II) kao homogeni katalizator. Kao otapalo korištena je smjesa etanola, vode i tetrahidrofurana (THF) (20:22:20). Upotrijebljene su otopine reaktanata: fenilboronske kiseline množinske koncentracije  $0,19 \text{ mol L}^{-1}$  i 3-brompiridina množinske koncentracije  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Priprava je provedena u tubularnom reaktoru volumena  $0,89 \text{ mL}$ . Reakcijski uvjeti varirani su sukladno pretpostavljenim vrijednostima glavnih varijabli (tablica 3). Prinos produkta nije bilo moguće utvrditi UV/Vis spektroskopijom.<sup>18,19</sup>

Tablica 3. Reakcijski uvjeti za pretražne pokuse za pripravu 3-fenilpiridina uz homogeni katalizator

$t/\text{min}$	$n(3\text{-brompiridin})/n(\text{fenilboronska kis.})$	$t/^\circ\text{C}$
3	1/1,25	100
5	1/1,25	100
1	1/1,25	100
3	1/1,10	100
3	1/1,25	80
3	1/1,25	110

### 3.4. Priprava 7-etiltriptofola

Pripremljene su otopine polaznih reaktanata množinskih koncentracija: 0,8 mol L<sup>-1</sup> otopine spoja DHF i 0,8 mol L<sup>-1</sup> 2-etilfenilhidrazina. Variranje parametara (tablica 4) napravljeno je prema predlošku Lv<sup>15</sup> i suradnika. Reakcije su provedene u protočnom reaktoru od 10 mL ( $l = 12,73$  m,  $d = 1$  mm).

Predaktivacija spoja DHF vođena je 10 min dodatkom 0,1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 7 mL reakcijske otopine uz snažno miješanje. U ovom koraku upotrijebljen je protočni reaktor od 2 mL.

Reakcijska frakcija je sakupljana u otopinu NaOH. Korištene su otopine NaOH u vodi (2 mol L<sup>-1</sup>) i metanolu (zasićena otopina).

Reakcija 4 (tablica 4) provedena je uz korištenje klorovodične kiseline. U reakcijskim smjesama navedenima kao pokusi 21-26 (tablica 4) korištena je otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu (MeOH). U reakcijama 1-8 i 11-20 korištena je otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(aq), dok su reakcije 9 i 10 provedene bez dodatka kiseline.

Neutralizacija 2-etilfenilhidrazina hidroklorida u pokusima provedena je s ekvimolarnom količinom NaOH otopljenog u metanolu.

Pretražne reakcije napravljene su u smjesi otapala voda:etilen-glikol (2:5) i metanol:voda (5:2).

U pokusima korištenima za izradu modela svaki reaktant je zasebno pripremljen. Kao otapalo za ispiranje sustava korištena je smjesa MeOH:H<sub>2</sub>O (5:2). Otopina 2-etilfenilhidrazina hidroklorida pripremljena je dodatkom 5,6 mmol reaktanta u 7 mL MeOH. Otopina spoja DHF pripremljena je dodatkom 5,6 mmola reaktanta u 7 mL H<sub>2</sub>O, prije predaktivacije. U obje otopine dodano je 140 μL metanolne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 %).<sup>15,21</sup>



Tablica 4. Reakcijski uvjeti za pretražne pokuse pripreve 7-etiltriptofola

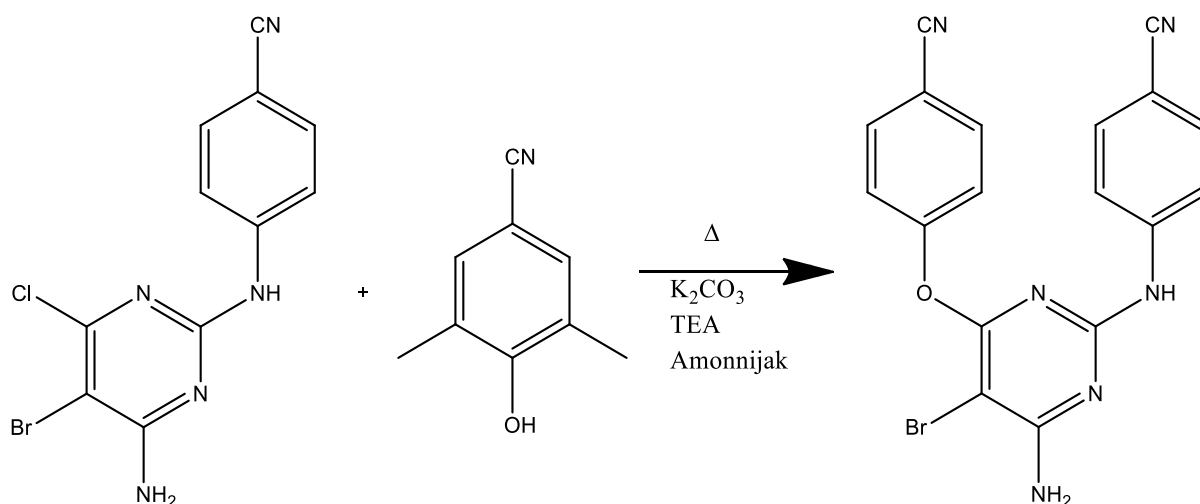
Redni broj pokusa	DHF/predaktivacija	NaOH/eq	c(kis.)/mol L <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /mol ekv.	otapalo	t/°C	RDT/min
1	NE	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	4
2	NE	1	3,0	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	5
3	NE	0	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	4
4	NE	0	11,8	3,6	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	4
5	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	4
6	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	2
7	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	100	4
8	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	100	2
9	DA	1	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	60	5
10	DA	0	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	60	5
11	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	0,5
12	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	1
13	DA	1	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	0,5
14	DA	0	7,4	1,8	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	115	1
15	DA	0	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	60	10
16	DA	0	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	80	5
17	DA	0	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	60	5
18	DA	0	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	80	5
19	DA	0	0	0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	140	0,5
20	DA	0	5	1,35	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	60	10
21	DA	0	5	1,35	MeOH	60	5
22	DA	0	5	1,35	MeOH	80	5
23	DA	0	5	1,35	MeOH	115	5
24	DA	0	5	1,35	MeOH	115	1
25	DA	0	5	1,35	MeOH	130	0,5
26	DA	0	5	1,35	MeOH	115	0,5

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprava etravirina

#### 4.1.1. Priprava etravirina u klasičnom reaktoru

U reakciji provedenoj u klasičnom reaktoru iz spojeva DMHB i BCAPBN, uz  $K_2CO_3$  kao bazu (slika 8), pri čemu je kao otapalo korištena smjesa acetonitrila i *N*-metilpirolidona (7:3), izoliran je etravirin u iskorištenju od 89,56 %. Tijek reakcije praćen je metodom HPLC, pri čemu su uzimani uzorci (tablica 5) te prikupljeni spektri IR ATR spektroskopijom *in-line* svakih 5 minuta tijekom 15 sati. Spektri čistih komponenata prikupljeni su u reakcijskom omjeru smjese otapala NMP/acetonitril (7:3), unošenjem ATR sonde u pripravljenu otopinu čistih komponenti.<sup>14</sup>



Slika 8. Shema priprave etravirina

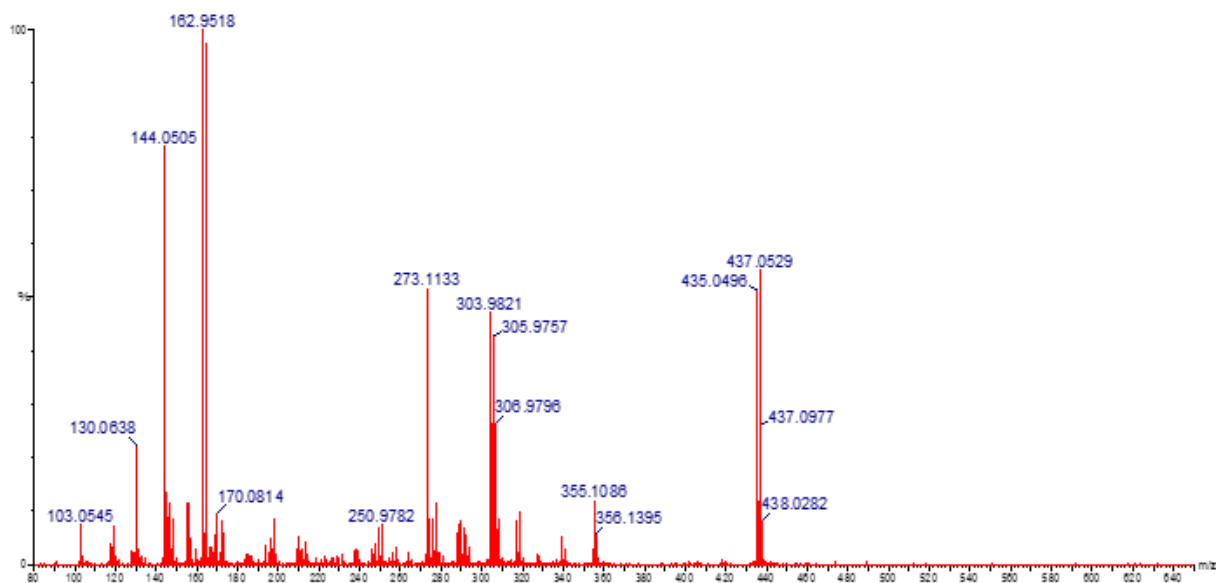
Tablica 5. Sastav reakcijskih smjesa u postupku pripreve etravirina u klasičnom reaktoru u ovisnosti o vremenu metodom HPLC

t/min	% BCAPBN	% DMHB	% ETV
0	76	22,34	1,50
60	70,22	19,11	10,54
130	64,8	15,71	19,84
290	51,66	8,75	39,37
420	46,65	5,61	48,43
530	42,25	3,68	53,70
890	37,37	0,83	61,31
1080	36,79	0,36	62,40

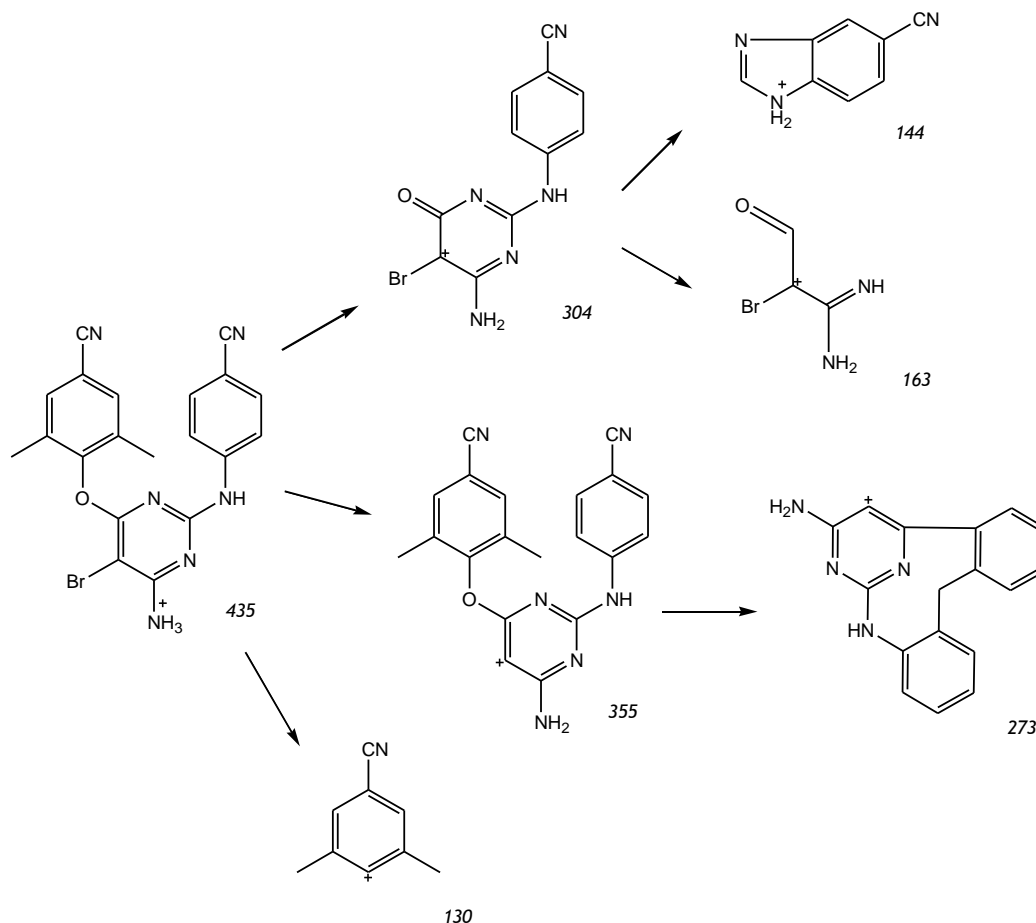
Prema analizi metodom HPLC (tablica 5), te računskom obradom prinos šaržnog procesa pripreve etravirina nakon 15 h iznosio je 98,72 %. Ukupna onečišćenja iznosila su 0,71 % od čega je najveći udio polazne supstancije BCAPBN u iznosu od 0,57 %.

Spektri prikupljeni metodom IR ATR u vrijeme uzorkovanja za analizu metodom HPLC korelirani su s kvantitativnim i kvalitativnim rezultatima dobivenima metodom HPLC. Računalnom obradom bilo je moguće (Slike 11-13) napraviti model u kojem se iz IR spektara *in-line* može pratiti sastav otopine. Prikupljeni IR spektri predobrađeni su prvom derivacijom i metodom multivarijatne korekcije raspršenja. Nije zamijećena značajna statistička razlika ukoliko je korišten jedan ili dva spektra za unakrsnu validaciju. Analiza je provedena u spetrokopskom području  $698-1798\text{ cm}^{-1}$ .

Rezultatima analize metodom LC-MS (slika 9 i slika 10) potvrđeno je nastajanje molekule etravirina i određen standard za metodu HPLC.

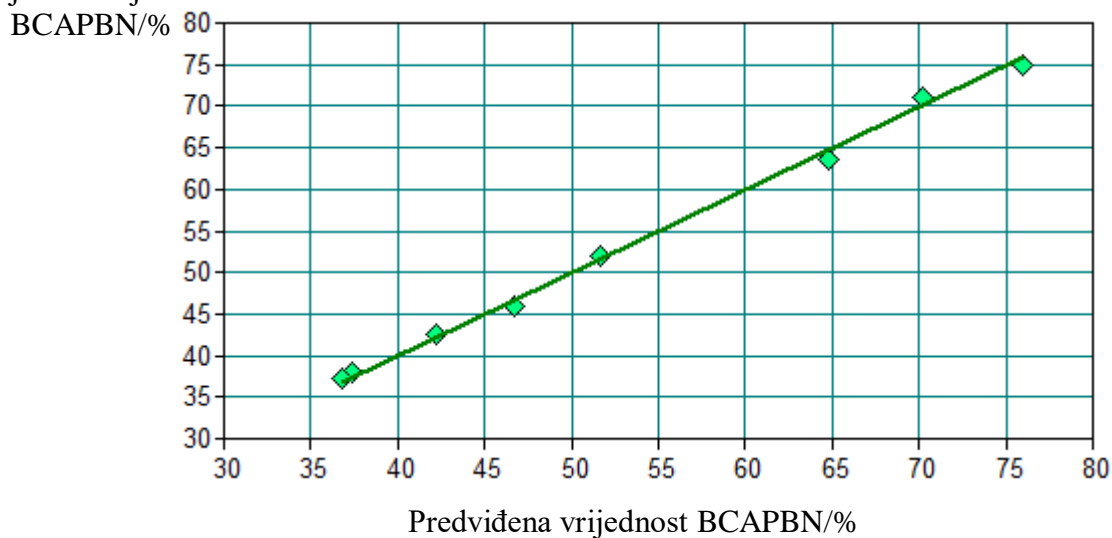


Slika 9. Rezultati analize uzorka etravirina metodom LC-MS



Slika 10. Fragmenti etravirina tokom analize metodom LC-MS

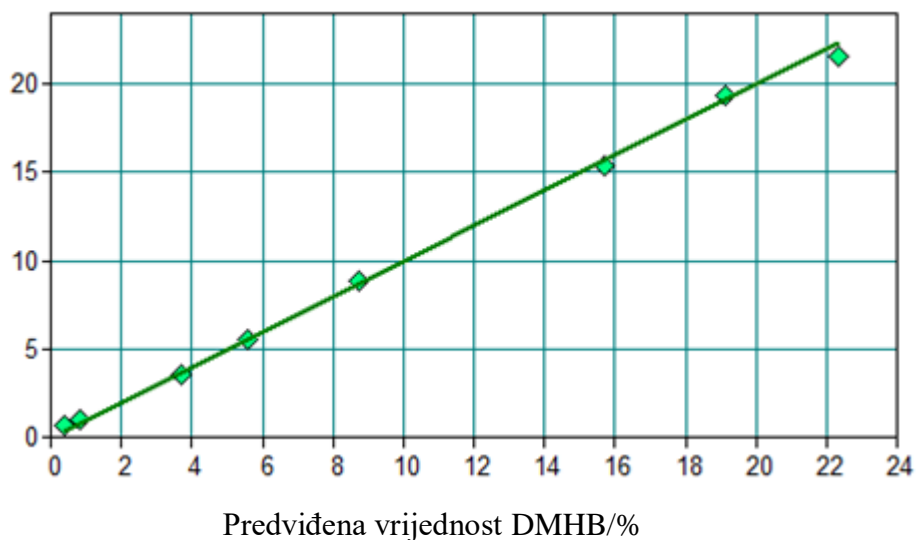
Izmjerena vrijednost



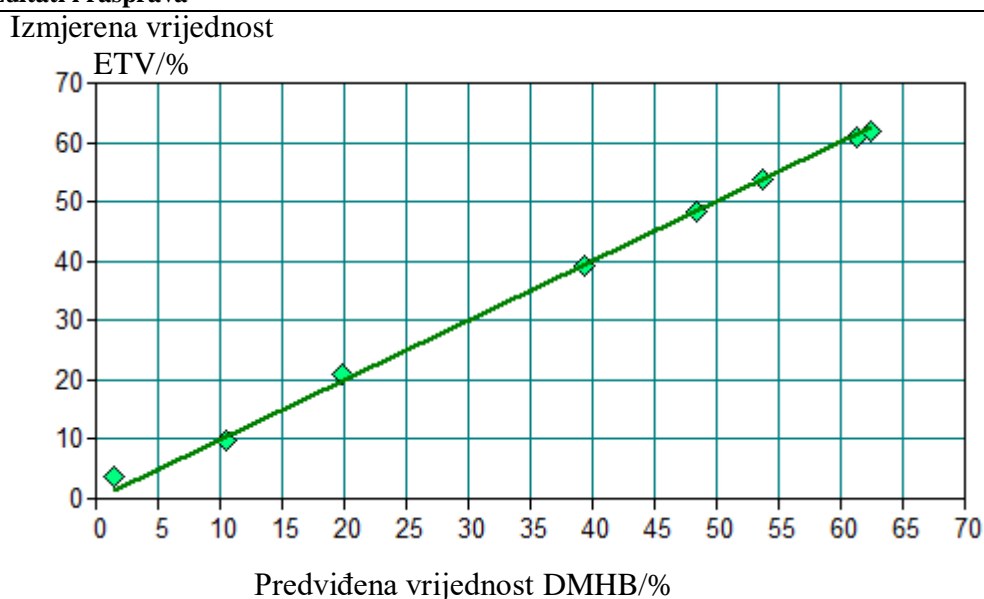
Slika 11. Rezultati unakrsne validacije za BCAPBN na temelju prikupljenih spektara, pri čemu broj glavnih komponenti iznosi 2, a  $R^2 = 99,72\%$

Izmjerena vrijednost

DMHB/%



Slika 12. Rezultati unakrsne validacije za DMHB na temelju prikupljenih spektara, pri čemu broj glavnih komponenti iznosi 2, a  $R^2 = 99,81\%$



Slika 13. Rezultati unakrsne validacije za ETV na temelju prikupljenih spektara, pri čemu broj glavnih komponenti iznosi 2, a  $R^2 = 99,82\%$

#### 4.1.2. Priprava etravirina u protočnom reaktoru

Zbog uskog promjera cijevi u protočnom reaktoru, te kako bi se izbjegla sedimentacija kalijevo karbonata korištenog kao baze, pokušaji pripreve etravirina u protočnom sustavu provedeni su uz korištenje trietilamina i amonijaka kao baze.

Reakcijom s trietilaminom kao bazom pokušalo se optimirati koristeći dizajn eksperimenata s ciljem smanjenja pokusa za opis parametarskog prostora. Izabran je pretražni dizajn (eng. *screening design*) pri čemu se pokušalo ispitati utjecaj pet parametara (tablica 6) na reakcijski prinos. Korišteno otapalo u navedenim reakcijama smjesa je otapala DMSO i ACN (2:1).

Tablica 6. Parametri varirani u optimizaciji pripreve etravirina u protočnim reaktorima

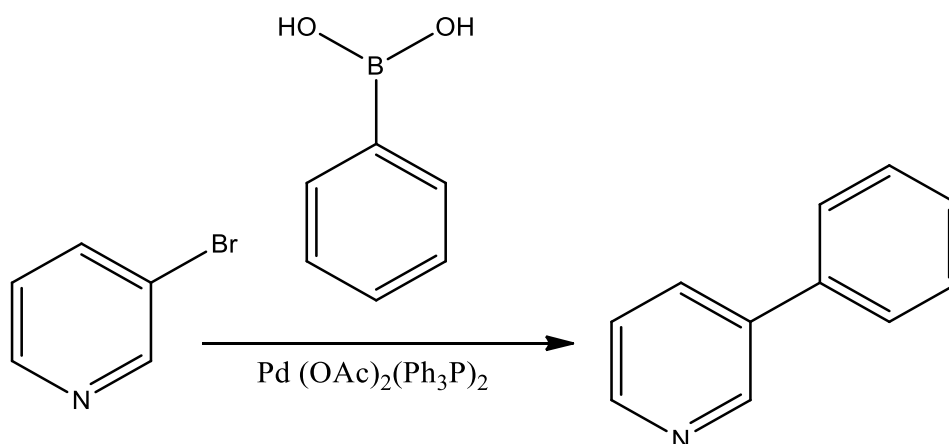
parametar	-1	0	1
<i>temperatura/°C</i>	140	125	110
molarni omjer	1,6	1,4	1,2
<i>t/min</i>	120	60	5
$c(\text{DMHB})/\text{mol L}^{-1}$	1,00	0,60	0,20
$c(\text{BCAPBN})/\text{mol L}^{-1}$	0,50	0,35	0,20

Niti jedna promjena reakcijskih uvjeta nije rezultirala prinosom etravirina koji se mogao detektirati na temelju provedene analize HPLC reakcijske smijese. Obzirom da je promjena baze najveća izvedena promjena, te da su svojstva korištenih otapala usporediva, može se zaključiti da trietilamin nije dovoljno jaka baza (slika 8). Nastanak produkta nije primijećen niti uz amonijak kao bazu.

Etravirin najvjerojatnije nije bilo moguće pripremiti u protočnom reaktoru jer ide mehanizmom bliskim  $S_N1$ . Pretpostavlja se da stabilizacija karbokationa na alkilnom ostatku ovisi o izlasku halogenida iz sustava u obliku netopive anorganske soli.

#### 4.2. Pokušaj pripreve 3-fenilpiridina u protočnom reaktoru.

Reakcija pripreve 3-fenilpiridina iz 3-brompiridina i fenilboronske kiseline uz  $\text{Pd}(\text{OAc})_2(\text{PPh}_3)$  kao katalizator nije rezultirala nastankom željenog produkta (slika 14). Očekivalo se da će reakcija ići mehanizmom Suzukijevog sparivanja. Sedimentacija i promjena boje katalizatora iz žute u sivu nakon nekoliko minuta upućivala je na mogućnost gubitka katalitičke moći katalizatora. Spektrofotometrijom UV/Vis nisu dobiveni rezultati kojima bi se potvrdio reakcijski prinos i je li reakcija išla u željenom smjeru. Produkt nije bilo moguće izolirati (niska koncentracija u malom volumenu.).



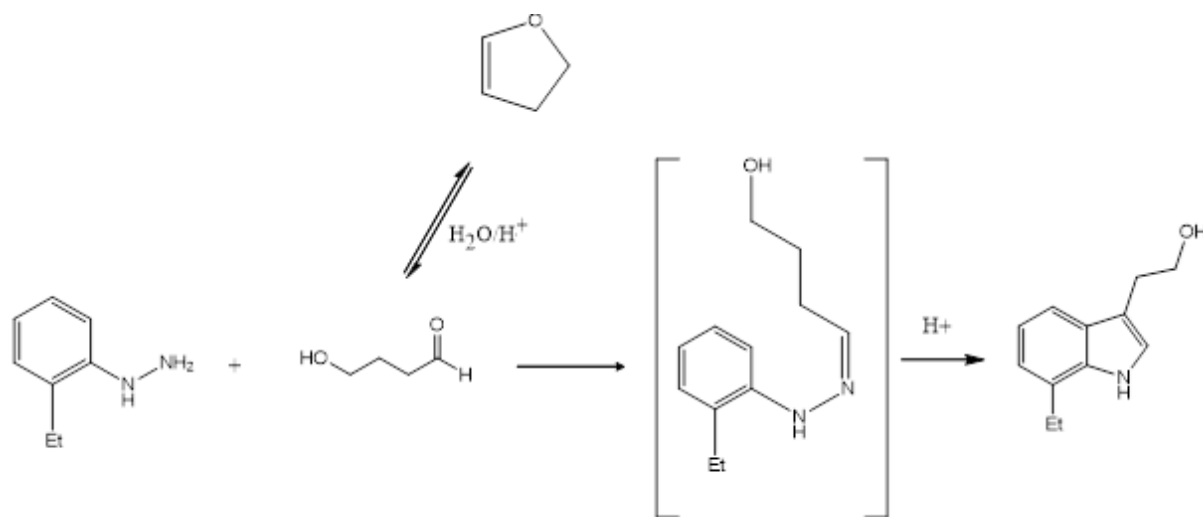
Slika 14. Reakcijska shema za očekivani nastanak 3-fenilpiridina

Sukladno mehanizmu (slika 2) i shemi (slika 14) očekivao se nastanak 3-fenilpiridina. Reakcija može biti predmetom budućih istraživanja. Iz dobivenih rezultata nije moguće jednoznačno utvrditi što se dogodilo s katalizatorom i reaktantima.



### 4.3. Priprava 7-etiltriptofola

Tijekom inicijalnih pretražnih pokusa napravljene su reakcije u kojima je korištena klorovodična kiselina, pri čemu je izoliran produkt znatno niže čistoće (36,89 %) od onih provedenih uz sumpornu kiselinu (55 %). Iz eksperimenata provedenih u metanolu dobiven je nepoznati produkt prema analizi metodom HPLC. Produkt nije bilo moguće izolirati (niske koncentracije, mali volumeni, nepoznata svojstva topljivosti). Nepoznati produkt može biti predmet budućih istraživanja.



Slika 15. Shema priprave 7-etiltriptofola iz 2,3-dihidrofurana i 2-etilfenilhidrazina

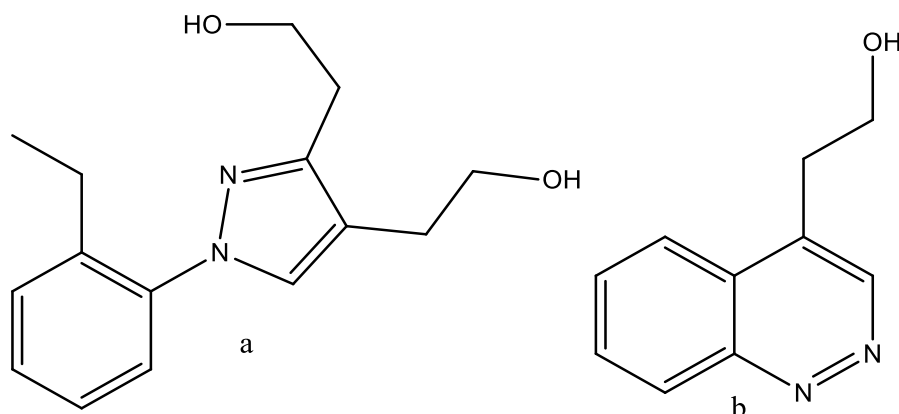
Prema radu Lv i suradnika<sup>20</sup>, koji opisuju reakciju u smjesi otapala etilen-glikol:voda i pri koncentracijama reaktanta od 0,1 do 0,8 mol L<sup>-1</sup> mijenjani su parametri inicijalnih pokusa. Prvi korak u optimizaciji koji su napravili bila je neutralizacija 2-etilfenilhidrazina. Napravljene su tri prilagodbe pokusa:

- struje reaktanata nisu predmiješavane,
- struje reaktanata miješane su na 60 °C u trajanju od 5 min,
- struje reaktanata miješane na 115 °C u trajanju od 20 s.

U sva tri pokusa sakupljena frakcija hlađena je na sobnu temperaturu 20 s, što je postignuto uvođenjem u novi hlađeni reaktor. U prva dva pokusa glavna reakcija je vođena na 100 °C, a u trećem na 115 °C. Reakcijska vremena bila su 30 min za prvu, 16 min za drugu i 4 min za treću reakciju. Najbolje prinose Lu i suradnici dobili su u trećem reakcijskom sustavu. Sve reakcije vođene su uz 50 %-tnu sumpornu kiselinu u 1,8 ekvivalenata prema

reaktantima. Reakcijski koraci sastoje se od aktivacije spoja DHF, reakcije 2-etilfenilhidrazina i 4-hidroksibutanona koja rezultira formiranjem međuproducta, te Fisherove indolizacije (slika 15).<sup>15,22,23,24</sup>

U istom radu autori navode korelaciju između kraćih reakcijskih vremena i boljih iskorištenja, navodeći pritom nastanak nusprodukata putem [3,3] sigmatropne pregradnje (slika 16) kao glavni uzrok smanjenja prinosa reakcije.<sup>15, 21,22, 23,24,25,</sup>



Slika 16. Nusprodukti nastali u pripravi 7-etiltriptofola

Autori navode da su produkt sakupljali u 30 %-tnoj vodenoj otopini NaOH pri čemu nije primijećeno izuljivanje u reakcijskom sustavu. Autori također ne specificiraju jednoznačno korištene koncentracije reaktanata.<sup>15, 26,27,28,29,30,</sup>

Inicijalni pretražni pokusi davali su razmjerno niske prinose koji su unaprijeđeni izbacivanjem koraka neutralizacije. Zaključeno je da neutralizacija 2-etilfenilhidrazin hidroklorida nije potrebna s obzirom da se reakcija provodi uz dodatak pet ekvivalenata sumporne kiseline.

Prema prethodno spomenutom radu i referencama navedenim u radu<sup>15,</sup> na DHF se adira voda u vodenom mediju uz katalitičku količinu kiseline. Spoj DHF se aktivacijom prevodi u 4-hidroksibutanal koji je podložan nukleofilnom napadu terminalnog dušika 2-etilfenilhidrazina. Hidrazonski međuproduct podliježe Fisherovoj indolizaciji pri čemu dolazi do nastajanja 7-etiltriptofola (7ET).<sup>31,32,33,34</sup>

Zabilježeni su niži prinosi u reakcijama bez predaktivacije kiselinom, kao i u slučaju kada nije bilo predmiješanja. Za predmiješanje je korištena cijev duljine 0,5 m i zapremine 0,5 mL.

Vodena otopina NaOH zamijenjena je otopinom NaOH u metanolu zbog primijećenog izuljivanja iz lužnatih vodenih otopina. Eksperimentalno je pokazna netopljivost 7-etiltriptofola u smijesi voda:MeOH s manje od 40 % volumnog udjela MeOH. Upravo je MeOH odabran zbog poznate topljivosti glavnog produkta u njemu te relativno dobre topljivosti NaOH. Topljivost 7-etiltriptofola u smijesi voda:MeOH s više od 60 % volumnog udjela vode je veća od 400 g L<sup>-1</sup>.

Tablica 7. Reakcijski uvjeti za optimiranja pripreve 7-etiltriptofola u smjesi otapala MeOH:voda (5:2)

Redni broj pokusa	$c(\text{H}_2\text{SO}_4)/\text{mol L}^{-1}$	ekvivalenti kiseline	$t/^\circ\text{C}$	RDT/min	7ET /%
1	5	1,35	115	0,5	2,3
2	5	1,35	115	0,75	40
3	5	1,35	115	1	34
4	5	1,35	60	5	10
5	5	1,35	60	10	12
6	5	1,35	80	5	30
7	0,1	0,73	125	10	75,3
8	0,1	0,73	125	15	77,2
9	0,1	0,73	140	5	70,4
10	0,1	0,73	140	10	70,94
11	0,1	0,73	140	15	68,05
12	0,1	0,73	110	10	60

Model koji opisuje ovisnost konverzije u reakciji pripreve 7-etiltriptofola o mijenjanim parametrima za reakcijski smijesa metanol:voda izrađen je u programskom paketu JMP 13.0 na temelju dobivenih rezultata (tablica 7.).

Na temelju preliminarnih pokusa optimiranja, spoj DHF aktiviran je u vodenom mediju. Smjesa metanola i vode (5:2) korištena je i kao otapalo za ispiranje sustava spregnutog s protočnim reaktorom. Spoj 7-etiltriptofol otopljen je u metanolu kako bi se osigurala topljivost produkta u sustavu otapala.

Prema rezultatima modela, u granicama ispitivanja sustava, pokazano je da na reakcijski prinos najveći utjecaj ima koncentracija kiseline, dok vrijeme zadržavanja te odnos koncentracije kiseline i vremena zadržavanja (RDT) imaju zanemariv utjecaj. Model nije pokazao nikakvu ovisnost konverzije o temperaturi u rasponu od 100 do 140 °C. Metanol je upotrijebljen kao alternativno otapalo zbog niže cijene u usporedbi s etilen-glikolom. Obzirom da su prinosi u metanolu bili bolji u usporedbi sa smjesom etilen-glikol:voda (2:5), optimizacija i model su izrađeni u smjesi metanol:voda (tablica 7.).

Inicijalni pokusi provedeni u smjesi otapala etilen-glikol:voda (tablica 8) rezultirali su nižim prinosom produkta u odnosu na rezultate pokusa provedenih u smjesi otapala metanol:voda.

Tablica 8. Reakcijski uvjeti optimiranja pripreve 7-etiltriptofola u smjesi otapala etilen-glikol:voda (2:5)

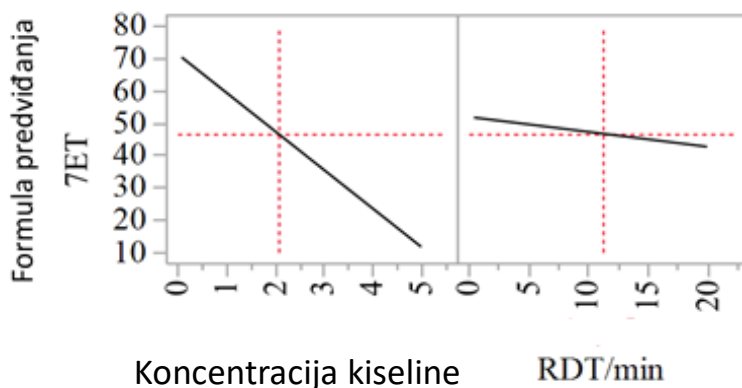
Redni broj pokusa	$c(\text{H}_2\text{SO}_4)/\text{mol L}^{-1}$	ekvivalenata kiseline	$t/^\circ\text{C}$	RDT/min	$\eta/\%$
1	5	1	140	5	48,7
2	5	1	140	10	55,3
3	5	1	140	15	57,8
4	5	1	110	10	58,8
5	5	1	140	15	53,4
6	5	1	140	10	28,3

Log i P vrijednosti dobivenog modela (tablica 9) upućuju da najveći utjecaj na parametarski prostor ima koncentracija kiseline.

Tablica 9. Sumarni efekti modela za značajne parametre tokom pripreve 7-etiltriptofola

Parametar	Log Vrijednost	P Vrijednost
Koncentracija kiseline	3,425	0,00038
Koncentracija kiseline *RDT/min	0,368	0,42872
RDT/min	0,276	0,52962

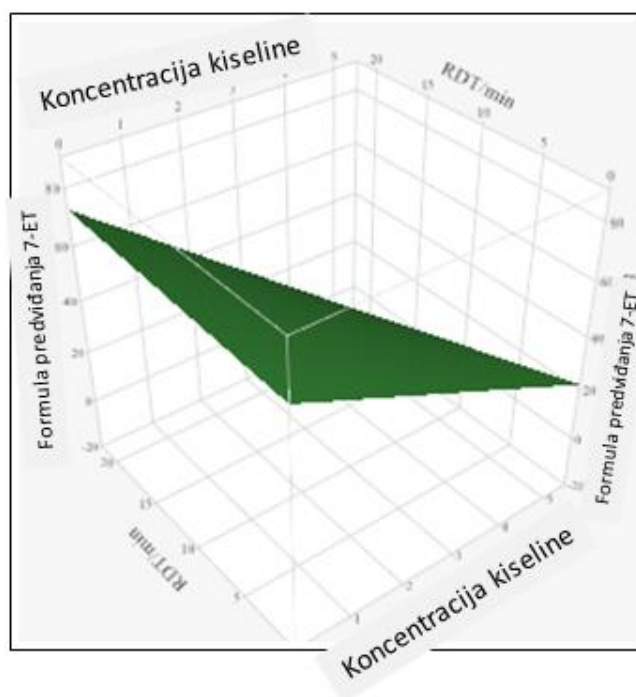
Jednadžba predviđanja kromatografske čistoće reakcijske smjese pripreve 7-etiltriptofola pokazuje utjecaj koncentracije kiseline kao parametra od najvećeg značaja. U profilu predviđanja (slika 17) vidljiv je utjecaj parametara na kromatografsku čistoću reakcijske smjese 7-etiltriptofola. Vidljivo je da povećanje koncentracije kiseline ima negativan utjecaj na čistoću reakcijske smjese.



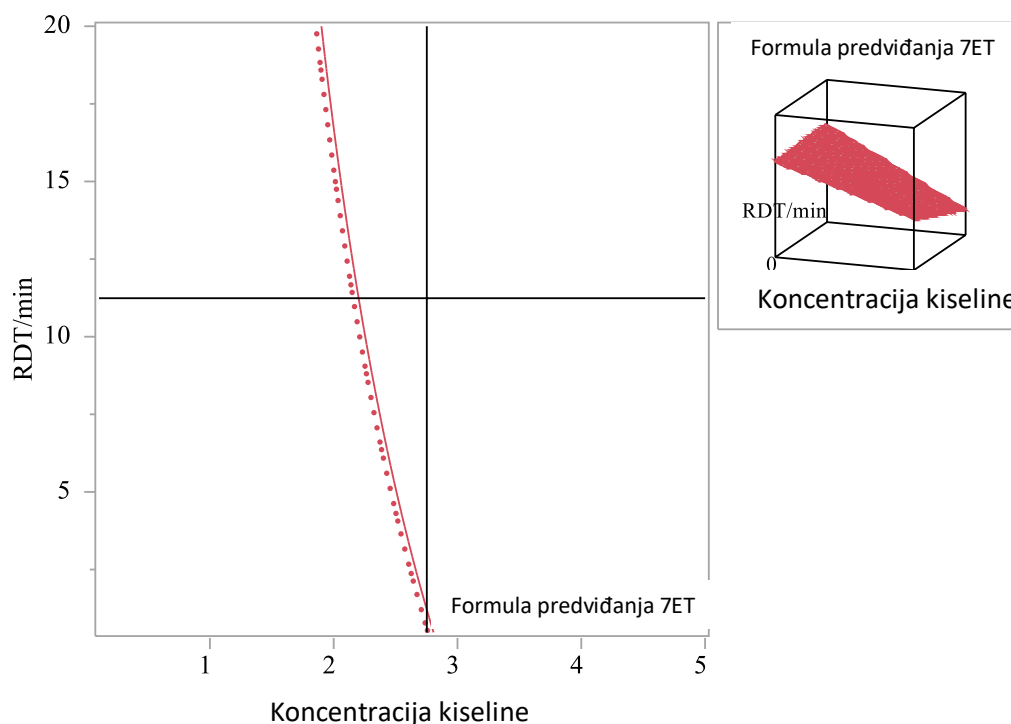
Slika 17. Profil predviđanja kromatografske čistoće reakcijske smjese 7-etiltriptofola u ovisnosti o ključnim parametrima: koncentraciji kiseline i vremenu zadržavanja

Obzirom da su parametri mijenjani u širokom rasponu u dvije rubne vrijednosti, o potencijalnoj infleksiji krivulje postizanja optimuma ne može se jednoznačno zaključivati.

a)



b)



Slika 18. Obrisni (eng. *contour*) profil predviđanja kromatografske čistoće reakcijske smjese pripreve 7-etiltriptofola o koncentraciji kiseline i vremenu zadržavanja te njegova 3D (a) i 2D (b) reprezentacija

Grafička (slika 17, slika 18) i brojčana reprezentacija (tablica 9) predviđenog prinosa pripreve 7-etilriptofola dana je tako da je srednja vrijednost 46,5 %, a obrnuto je proporcionalna koncentraciji kiseline s faktorom 2,073 (horizontalno) i reakcijskom vremenu 11,25 (okomito). Temeljem toga zaključeno je da će predviđeni rezultati eksperimenata uz vrijednosti parametara ispod krivulje (lijevo) rezultirati manjim prinosom, dok će eksperimenti uz vrijednosti parametara iznad krivulje (desno) rezultirati prinosom većim od prosječnog. Daljnja eksperimentalna potvrda može biti predmet budućih istraživanja.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Etravirin nije bilo moguće pripremiti u protočnom reaktoru. Promjena baze iz kalijeveg karbonata u trietilamin i amonijak nije dala željeni rezultat. Etravirin je uspješno pripremljen u šaržnom reaktoru.
- Uspješno je razvijena metoda *in-line* monitoringa reakcije pripreme etravirina uporabom infracrvene spektroskopije.
- Zbog gubitka katalitičke moći katalizatora, ograničenja metode te nemogućnosti izolacije produkta, nije bilo moguće potvrditi pripremu 3-fenilpiridina u ispitanim reakcijskim uvjetima.
- Protočni reaktor uspješno je upotrijebljen za pripremu i optimizaciju postupka pripreme 7-etiltriptofola. Optimirana reakcija dala je reakcijski prinos od 77 % u smijesi MeOH:voda (tablica 7, reakcija 8), uz aktivaciju spoja DHF dodatkom katalitičke količine sumporne kiseline u vodi kao otapalu. Struje reaktanata su predmiješavane. Stehiometrijski omjer reaktanata iznosi 1:1. Utvrđeno je da temperatura reakcije u granicama 100-140 °C, uz vrijeme zadržavanja od 5 do 15 min nema utjecaja na reakcijsku konverziju. Značajan parametar je koncentracija kiseline koja posljedično utječe na pH sustava.



## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN = acetonitril

API = (eng. *Active Pharmaceutical Ingredients*) aktivne farmaceutske tvari

BCAPBN = 4-((4-amino-5-brom-6-klorpiridin-2-il)amino)benzonitril

DHF = 2,3-dihidrofuran

DMHB = 4-hidroksi-3,5-dimetilaminobenzonitril

DMSO = dimetilsulfoksid

DoE = (eng. *Design of Experiments*) dizajn eksperimenata

<sup>1</sup>H NMR = protonska nuklearna magnetska rezonancija

HPLC = tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

LC-MS = tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa

NMP = *N*-metilpirolidon

RDT = (eng. *residence time*) vrijeme zadržavanja

TEA = trietilamin

THF = tetrahidrofuran

UV/Vis = spektrofotometrija u vidljivom i ultraljubičastom području

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. B. Plutschack, B. Pieber, K. Gilmore, P.H. Seeberger, *Chem. Rev.* **117** (2017) 11796-11893
2. G. Jass, A Kirschning, *Chem. Eur. J.* **12** (2006) 5708-5723
3. C. K. Fredrickson, Z. H. Fan, *Lab Chip*, **4** (2004) 526-533
4. T. S. Glasnov, C. O. Kappe, *Macromol. Rapid Commun.* **27** (2007) 395-400
5. V. Hassel, *Chem. Eng. Technol.* **32** (2009) 1682-1694
6. C. G. Frost, L. Mutton *Green Chem.* **12** (2010) 1687-1703
7. T. Razzaq, C.O. Kappe, *Chem.- Asian J.* **5** (2010) 1274-1289
8. J. Wagner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Chem. Commun.* **47** (2011) 4583-4592
9. M. Irfan, T. N. Glasnov, C. O. Kappe, *ChemSusChem* **4** (2011) 300-316
10. J. Yoshida, H. Kim, A. Nagaki, *ChemSusChem* **4** (2011) 331-340
11. J. C. Pastre, D. L. Browne, S. V. Ley, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013), 8849-8869
12. K. Watts, A. Baker, T. Wirth, *J. Flow Chem.* **4** (2015), 2-11
13. A. Q. Mohammed, P. K. Sunkari, P. Sirnavis, A. H. Roy, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 1634-1644
14. M. Šepelj Majer, I. Krizmanić, G. Vrbanec, Process for the preparation of etravirine and intermediates in synthesis thereof, US Pat Appl. 2013123498 A1, 16th May, 2013
15. Y. Lv, Z. Yu, W. Su, , *J. Am. Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 471-475
16. J. Musters, L. Bos, E. Kellenbach, *Org. Process Res. Dev.* **17** (2013) 87-96
17. N. G. Anderson, D. C. Burdick, M. M. Reeve *Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 162-172
18. <https://www.vapourtec.com> (datum pristupa 30. travnja 2018.)
19. M. Al-Hashimi, A. Qazi, Sullivan, J. R. H. A. C. Wilson, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **273** (2007) 160-164
20. M. Al-Hashimi, A. C. Sullivan, J. R. H. Wilson, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **278** (2007) 298-302
21. F. Fanelli, G. Parisi, L. Degannrao, R. Luisi *Beilstein of Org. Chem.*, **13** (2017) 520-542  
K. P. Cole, J. McClary Groh, M.D, Johanson and associates, *Science* **356** (2017) 1144-1150
22. B. Gutmann, M. Gottsponer, P. Elsner, D. Cantillo, D. H. Roberge, C. O. Kappe, *J. Am. Org. Process Res. Dev.* **17** (2013) 294-302

23. P. Tfelt-Hansen, P. De Veris, P.R. Saxena, *Drugs* **60**, (2000) 1259-1287
24. C.A. Demerson, L.G. Humber, A.H. Philip *J. Med. Chem.* **19** (1976) 391-395
25. S. J. Garden, R.B. da Silva, A. C. Pinto, *Tetrahedron* **58** (2002) 8399-8412
26. C.-y. Chen, D. R. Liberman, R. D. Larsen, R. A. Reamer, T.R. Verhoeven, P.J. Reader, *Tetrahedron Lett.* **35** (1994) 6981-6984
27. P. R. Brodfuehrer, B. C. Chen, T. R. Sattelberg, P.R. Smith, J.P. Reddy, D.R. Stark, S. L. Quinlan, J.G Reid, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 9192-9202
28. C.-y. Chen, C. H. Senanayake, T. J. Bill, R. D. Larsen, P.J. Reider, *J. Org. Chem.* **59** (1994) 3738-3741
29. L. G. Humber, E. Ferdinandi, C.A. Demerson, S. Ahmed, U. Shah, D. Mobilio, J. Sabatucci, B. De Lang, F. Labbadia, P. Hughes, J. DeVirgilio, G. Neuman, T.T. Chau, B. M. Weichamn, *J. Med. Chem* **31** (1988) 1712-1719
30. H. Katsuki, M. Nishiuchi, S. Kobayashi, H. Nishizawa. *J. Org. Chem.* **61** (1994) 984-990
31. K. R. Campos, J. C. S. Woo, S. Lee, R. D. Tillyer *Org. Lett.* **49** (2008) 79-82
32. Y. Lv, Z. Yu, W. Su, *Org. Process Res. Dev*, **15** (2011) 73-77
33. P. R. Sheng, M. P. Sumpur, S. P. Patil, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 3861-3865
34. R. B. Carlin, M. S. Moores, *J. Am. Chem. Soc.* **84** (1962) 4107-4112



## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Franjo Krajinović

Datum rođenja: 26.02.1994.

Mjesto rođenja: Grad Zagreb, Republika Hrvatska

### Obrazovanje

2000–2008 Osnovna škola Čučerje, Grad Zagreb, Republika Hrvatska

2008–2012 Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Grad Zagreb, Republika Hrvatska

2012–2016 preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Grad Zagreb, Republika Hrvatska

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

### Publikacije

F. Krajinović, *Povijesni razvoj pojmova oksidacija i redukcija*, Rad za titulu prvostupnika kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.