

# Utjecaj najčešćih onečišćenja na kristalne forme entakapona

---

**Vušak, Vitomir**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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:217:413091>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-29**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Vitimir Vušak

# **UTJECAJ NAJČEŠĆIH ONEČIŠĆENJA NA KRISTALNE FORME ENTAKAPONA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Dr. sc. Ernest Meštrović, zn. savj., nasl. red. prof.

Zagreb, 2022.





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Vitomir Vušak

# **INFLUENCE OF THE MOST COMMON IMPURITIES ON THE CRYSTAL FORMS OF ENTACAPONE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Dr. Ernest Meštrović, Scientific Advisor, Adjunct Full Professor

Zagreb, 2022





*U stranicama ovog rada sadržani su vrijeme, posvećenost i pažnja mnogo ljudi koji su mi pružali bezrezervnu podršku. Ovo je prilika da kažem veliko HVALA:*

*...odjelu Kemije Teva API Istraživanje i razvoj PLIVA Hrvatska d.o.o u čijim laboratorijima je ovaj rad izrađen.*

*...mom dragom mentoru, prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću, na nesebičnom dijeljenju vremena i znanja i pretvaranju nepremostivih prepreka u rješive izazove.*

*...članovima povjerenstva izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković, prof. dr. sc. Aleksandri Sander i dr. sc. Ivanu Halaszu na trudu i pruženoj stručnoj podršci, na svim sugestijama koje su utkane u ovaj doktorski rad.*

*...dr. sc. Krešimiru Molčanovu na pruženoj pomoći prilikom snimanja i difraktograma rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.*

*...svim kolegama iz PLIVA-e, osobito Marini Guji i Karmen Čolakić na pruženoj pomoći oko snimanja difraktograma polikristalnih uzoraka, Mihaeli Cerjak na pomoći oko snimanja DSC, TG i IR analiza te kolegi Mislavu Runji na svim savjetima i pruženoj pomoći oko kromatografskih analiza. Posebna zahvala dragoj Mirjani Sulimanec na svakodnevnoj podršci i motivaciji – dani u laboratoriju bili bi dulji bez Vas.*

*...Sari, za podršku (i slatkiše) kojima je uvijek znala pretvarati umor i tugu u još malo snage i smijeha..*

*...Ani, Atiđi, Mladenki i svim mojim prijateljima i kolegama iz odjela koji su me podržavali i vjerovali u mene.*

*...mojoj obitelji, pogotovo Darku za sav trud i vrijeme, neograničeni broj „jokera zovi“ i prisebnost u sitnim satima.*

*...i svojoj supruzi Štefi, na njenoj ljubavi i stalnoj podršci, za sve kasne noći i rana jutra, što me držala pri zdravom razumu tijekom proteklih nekoliko mjeseci. Bez tebe i Eminog veselja i smijeha u najtežim trenucima ovaj rad nebi bio moguć.*

*„Sometimes the only available transportation is a leap of faith.“*

*Margaret Sheppard*



## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| SAŽETAK.....   | IX |
| ABSTRACT .....   | XI |
| § 1. UVOD.....   | 1  |
| § 2. LITERATURNI PREGLED .....   | 4  |
| 2.1. Djelatne tvari i polimorfija.....   | 4  |
| 2.2. Onečišćenja u API-ima .....   | 11 |
| 2.3. Kristalizacija.....   | 22 |
| 2.4. Entakapon.....  | 28 |
| 2.5. Utjecaj onečišćenja na ishod kristalizacije .....   | 39 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....   | 45 |
| 3.1. Materijali .....  | 45 |
| 3.2. Postupak pripreve 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehida (1).....   | 46 |
| 3.3. Postupak pripreve 3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrobenzaldehida (2) .....   | 47 |
| 3.4. Postupak pripreve 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehida (3).....   | 47 |
| 3.5. Postupak pripreve 3,4-dimetoksi-5-nitrobenzaldehida (4).....  | 48 |
| 3.6. Postupak pripreve 2-metoksi-4,6-dinitrofenola (5).....  | 49 |
| 3.7. Postupak pripreve 3,5-dinitrobenzen-1,2-diola (6) .....   | 50 |
| 3.8. Postupak pripreve ( <i>E</i> )-2-cijano- <i>N,N</i> -dietil-3-(4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrofenil)akrilamida (7).....        | 51 |
| 3.9. Postupak pripreve ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilne kiseline (8).....                            | 52 |
| 3.10. Postupak pripreve ( <i>E</i> )-etil-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilata (9).....                              | 53 |
| 3.11. Postupak pripreve ( <i>E</i> )-propan-1-il-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilata (10).....                      | 54 |
| 3.12. Postupak pripreve ( <i>Z</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dietilakrilamida (11).....            | 55 |
| 3.13. Postupak pripreve ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dietilakrilamida; entakapon (12)..... | 56 |
| 3.14. Postupak pripreve forme A spoja 12.....  | 57 |
| 3.15. Postupak pripreve forme D spoja 12.....  | 57 |
| 3.16. Postupak pripreve forme E spoja 12.....  | 57 |
| 3.17. Postupak pripreve forme $\alpha$ spoja 12 .....  | 58 |
| 3.18. Postupak pripreve forme $\beta$ spoja 12 .....   | 58 |
| 3.19. Postupak pripreve forme $\delta$ spoja 12 .....  | 58 |
| 3.20. Postupak pripreve forme $\tau$ spoja 12.....   | 59 |

---

|   |              |
|---|--------------|
| 3.21. Postupak pripreme amorfa spoja 12 .....                                     | 59           |
| 3.22. Kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....                              | 59           |
| 3.23. Razlikovna pretražna kalorimetrija.....                                     | 60           |
| 3.24. Termogravimetrijska analiza.....  | 60           |
| 3.25. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku.....                  | 60           |
| 3.26. Difrakcija rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.....                  | 60           |
| 3.27. Spektroskopija NMR .....  | 61           |
| 3.28. Infracrvena spektroskopija .....  | 61           |
| 3.29. Postupak provedbe pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije ..... | 61           |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>63</b>    |
| 4.1. Sinteza i strukturna karakterizacija spojeva 1 - 12 .....                    | 63           |
| 4.2. Kristalne strukture spojeva 1, 2, 3 i 6.....                                 | 83           |
| 4.3. Priprava kristalnih formi entakapona .....                                   | 91           |
| 4.4. Ispitivanje utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije .....               | 98           |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>112</b>   |
| <b>§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI) .....</b>                 | <b>114</b>   |
| <b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>   | <b>116</b>   |
| <b>§ 8. DODATAK.....</b>  | <b>XIV</b>   |
| <b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>   | <b>LXVII</b> |



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

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### UTJECAJ NAJČEŠĆIH ONEČIŠĆENJA NA KRISTALNE FORME ENTAKAPONA

Vitomir Vušak

PLIVA Hrvatska d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustavno istraživanje polimorfije organskih spojeva, a posebno djelatnih tvari, u fokusu je znanstvenih istraživanja više od 50 godina. Izuzetno su dobro istraženi fizikalni parametri koji utječu i dovode do nastanka polimorfnih formi, te je uspostavljena metodologija njihove identifikacije i karakterizacije. S druge strane, malobrojna su sustavna istraživanja kojima se nastoji spoznati u kojoj mjeri određena onečišćenja imaju utjecaj na nastanak i varijabilnost polimorfnih formi.

U nakani da se potvrdi hipoteza da određena onečišćenja ili međuprodukti koji nastaju prilikom pripreme djelatnih tvari mogu imati utjecaj na varijabilnost polimorfije, kao modelni spoj odabran je entakapon. Priređena je biblioteka od 11 strukturno sličnih onečišćenja te većina u literaturi opisanih polimorfnih formi entakapona. Nakon toga je provedeno istraživanje u kojem je korištenjem metoda cijepljenja i obogaćenog uzorka ispitan utjecaj vrste i strukture onečišćenja na varijabilnost polimorfije. Ustanovljeno je da je taj utjecaj veći što su spojevi sličnije građe. Na temelju dobivenih podataka potvrđena je osnovna hipoteza ovog rada.

Disertacija je napisana na hrvatskom jeziku i sadrži 134 stranice (s dodatcima 187 stranica), 24 sheme, 138 slika, 30 tablica i 110 literaturnih navoda.

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: djelatna tvar/ entakapon/ kristalizacija /polimorfizam

Mentor: Dr. sc. Ernest Meštrović, zn. savj., nasl. red. prof.

Rad prihvaćen: 5. svibnja 2022.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković, PMF, Zagreb
2. prof. dr. sc. Aleksandra Sander, FKIT, Zagreb
3. dr. sc. Ivan Halasz, v. zn. sur., IRB, Zagreb





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

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF THE MOST COMMON IMPURITIES ON THE CRYSTAL FORMS OF ENTACAPONE

Vitomir Vušak

PLIVA Croatia Ltd., Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia

Systematic research of polymorphism of organic compounds and especially active substances, has been the focus of scientific research for more than 50 years. The physical parameters that lead to formation of certain polymorphic forms have been well researched and the methodology of identification and characterization has been established. On the other hand, there is very little systematic approach to determine the extent and impact of certain contaminants on the formation and variability of polymorphic forms.

In order to confirm the hypothesis that certain impurities or intermediates used in the preparation may affect the variability of polymorphism, entacapone was selected as model compound. A library of 11 structurally related compounds and polymorphic forms of entacapone described in the literature were prepared. A study in which the influence of impurities on the variability of polymorphism was examined using seed or spike methods. This effect was found to be greater with structurally similar compounds. Based on collected data, the basic hypothesis of this thesis was confirmed.

The dissertation was written in Croatian and contains 134 pages (187 pages with Appendix), 24 schemes, 138 pictures, 30 tables and 110 references.

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: active pharmaceutical ingredients/ Entacapone/crystallization /polymorphism

Supervisor: Dr. Ernest Meštrović, Scientific Advisor, Adjunct Full Professor

Thesis accepted: May 5, 2022

Reviewers:

Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor, PMF, Zagreb  
Dr. Aleksandra Sander, Professor, FKIT, Zagreb  
Dr. Ivan Halasz, Senior Research Associate, IRB, Zagreb





## § 1. UVOD

Tvar koja postoji u kristalnom obliku može imati sposobnost rasta i kristalizacije u više oblika što dovodi do nastanka različitih polimorfa koji pokazuju razlike u molekularnom rasporedu, ali svaki oblik ima isti kemijski sastav. Iako su kemijski identični, različiti polimorfni oblici mogu pokazivati značajne razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima, uključujući profil topljivosti, područje taljenja, brzinu otapanja, stabilnost, higroskopnost itd. Sva ova svojstva imaju značajne učinke na proizvodnju, skladištenje i potencijal bioraspoloživosti formulacija u komercijalnim farmaceutskim proizvodima.<sup>1,2</sup>

U literaturi je poznato da određeni aditivi ili strukturno srodni spojevi mogu inhibirati ili poboljšati proces nukleacije i rasta kristala. Pažljivo odabrane ili dizajnirane komponente aditiva mogu inhibirati nukleaciju ulaskom u strukturu osnovnih nukleusa ili vezanjem za već nastale jezgre nukleusa. Iscrpno proučavanje mogućih mehanizama i čimbenika utjecaja na nukleaciju pruža bolje razumijevanje polimorfa i njihovih svojstava što omogućuje kontrolu tijekom faze razvoja i proizvodnje farmaceutskih proizvoda.

Parkinsonova bolest (PB) idiopatski je poremećaj motoričkog sustava, karakteriziran gubitkom dopaminergičnih neurona te je trenutno druga najrasprostranjenija neurodegenerativna bolest.<sup>3</sup> Procijenjeno je da je broj ljudi pogođenih PB u 2015. godini bio oko 6 milijuna širom svijeta.<sup>4</sup> Poput ostalih neurodegenerativnih poremećaja, stopa incidencije PB pokazuje pozitivnu korelaciju s dobi. Sa starenjem stanovništva i povećanjem očekivanog životnog vijeka, očekuje se porast stope incidencije PB te bi broj oboljelih do 2030 mogao narasti na oko 9 milijuna.

Većina bolesnika oboljelih od PB liječi se lijekovima za ublažavanje simptoma bolesti. Razvijen prije više od 30 godina, spoj poznat pod imenom levodopa često se smatra zlatnim standardom terapije PB. Levodopa djeluje tako da se nakon prelaska krvno-moždane barijere, složene mreže finih krvnih žila i stanica koje filtriraju krv koja dolazi do mozga, pretvara u dopamin, jedan od najvažnijih neurotransmitera u mozgu i tijelu. Budući da enzimi u krvi (AADC i COMT) razgrađuju većinu levodope prije nego što dospije u mozak, levodopa se kombinira s inhibitorom enzima zvanim karbidopa (blokira AADC enzim) te entakaponom (inhibitor COMT enzima). Za većinu bolesnika levodopa smanjuje simptome sporosti, ukočenosti i tremora, međutim, ovaj lijek ne zaustavlja niti usporava napredovanje bolesti.

Entakapon je selektivni i reverzibilni inhibitor enzima katehol-*O*-metiltransferaze (COMT) i primjenjuje se zajedno s djelatnim tvarima (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*; API) levodopa i karbidopa. Sam entakapon nema utjecaja na liječenje simptoma Parkinsonove bolesti nego omogućuje duže zadržavanje levodope u organizmu čime se postiže veća aktivnost. Na temelju objavljenih puteva sinteze, američka agencija za lijekove (FDA) i europska agencija za lijekove (EMA) dale su svoje smjernice za praćenje prisutnosti određenih onečišćenja koja se mogu pojaviti u finalnom obliku djelatne tvari. Tako FDA u svojoj farmakopeji predlaže praćenje samo *Z*-izomera kao potencijalnog onečišćenja, dok EMA predlaže praćenje čak 9 potencijalnih onečišćenja. Uz to, entakapon ima jako izraženu sposobnost stvaranja polimorfa te je do sada poznato čak 10 različitih kristalnih formi.

Cilj ovog istraživanja je na primjeru API-a entakapona ispitati utjecaj različitih srodnih spojeva na ishod kristalizacije i varijabilnost polimorfije. Biti će sintetizirano desetak spojeva srodnih entakaponu, te će se za njih napraviti potpuna strukturna karakterizacija. Dobivena onečišćenja biti će korištena da bi se sustavno istražio njihov utjecaj na promjenu polimorfije. Priprava srodnih spojeva biti će provedena standardnim laboratorijskim postupcima organske sinteze, a sintetizirani spojevi analizirati će se korištenjem tekućinske kromatografije ultravisoke razlučivosti (UHPLC). Po potrebi, dio spojeva dodatno će biti pročišćen postupcima kristalizacije. Za potrebe određivanja strukture sintetiziranih spojeva, biti će snimljeni FTIR i NMR spektri te će se provesti asignacija snimljenih spektara. Za određene srodne spojeve odrediti će se i kristalna struktura difrakcijom rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.

Priprava čistih polimorfnih formi entakapona provesti će se prema propisima dostupnima u literaturi te će isti propisi biti korišteni i u ispitivanju utjecaja srodnih spojeva na ishod kristalizacije. Ispitivanje utjecaja srodnih spojeva provesti će se dodatkom srodnih spojeva u otopinu entakapona prije početka kristalizacije ili dodatkom srodnih spojeva u otapalo u kojem je topljivost entakapona neznatna (u tu smjesu dokapavati će se otopina entakapona pri čemu će doći do kristalizacije zbog smanjenja topljivosti entakapona u sustavu). Ispitati će se utjecaj različitih količina dodanih onečišćenja u rasponu masenih udjela od 0,05 – 5 %. Analiza dobivenih polimorfa entakapona provesti će se uz pomoć difrakcije rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (PXRD), te će se po potrebi koristiti termalne metode – termogravimetrija (TG) i razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC).

Istraživanje će pokazati snažan utjecaj pojedinih srodnih spojeva na ishod kristalizacije čak i pri niskim udjelima ( $w=0,1$  %) te će se zahvaljujući potpunoj karakterizaciji priređenih

---

spojeva, načiniti korelacija između sličnosti u molekulskoj strukturi onečišćenja i dobivenih rezultata. Ti će podatci pomoći u fundamentalnom razumijevanju polimorfije te doprinijeti boljoj kontroli parametara kristalizacije.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Djelatne tvari i polimorfija

Djelatne tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*; API) mogu se definirati kao tvari koje imaju određeno biološko djelovanje te su zaslužne za željeni učinak lijeka kojeg osoba uzima. Svi lijekovi sastoje se od dvije komponente: djelatne tvari koja je najvažnija komponenta te od ekscipijensa, odnosno neaktivne pomoćne tvari.

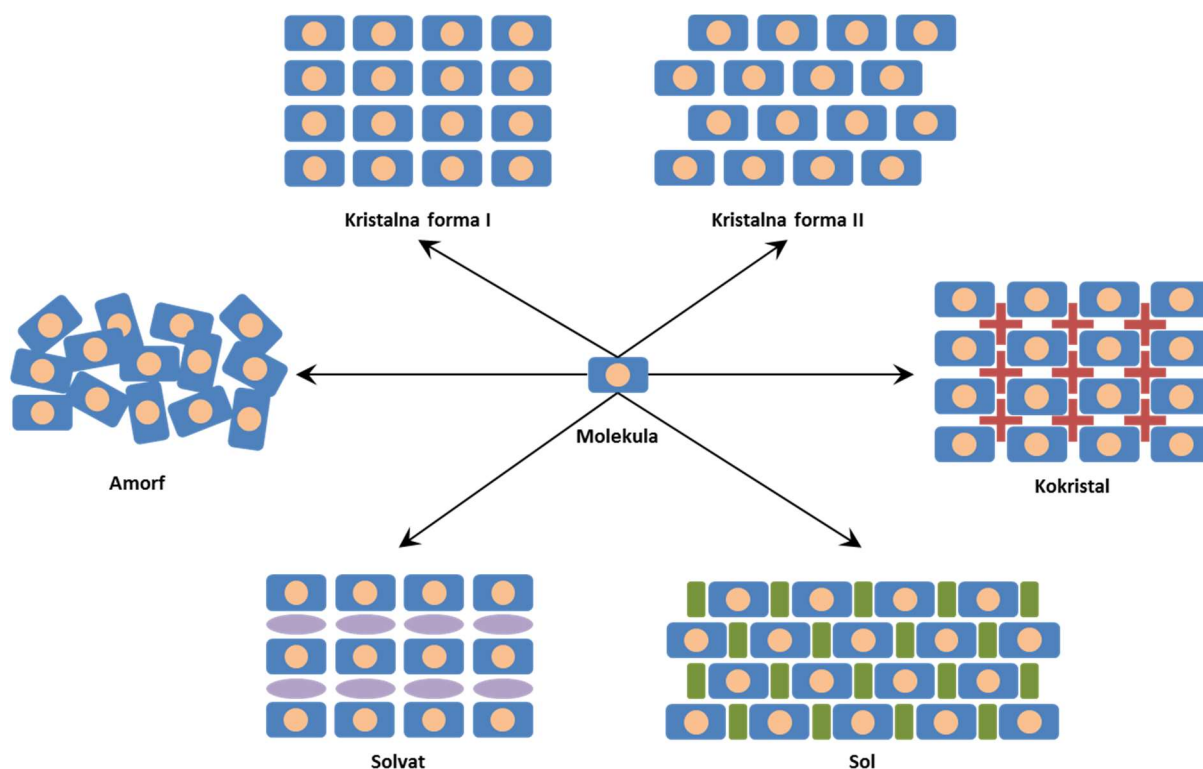
Djelatne tvari mogu se proizvesti na nekoliko načina:

- kemijskom sintezom
- fermentacijskim postupcima
- metodom rekombinantne DNA iz bakterija
- izolacijom ili ekstrakcijom iz prirodnih izvora
- kombinacijom navedenih procesa

Prema definiciji, uloga djelatnih tvari je određena farmakološka aktivnost ili drugi utjecaj u dijagnozi, liječenju, tretmanima ili u sprečavanju bolesti odnosno da svojim učinkom djeluju na strukturu i funkciju ljudskog tijela. Unatoč tome, postoje djelatne tvari koje same nemaju nikakav učinak na organizam, tek u kombinaciji nekoliko djelatnih tvari dolazi do željenog učinka.

#### 2.1.1. Polimorfija

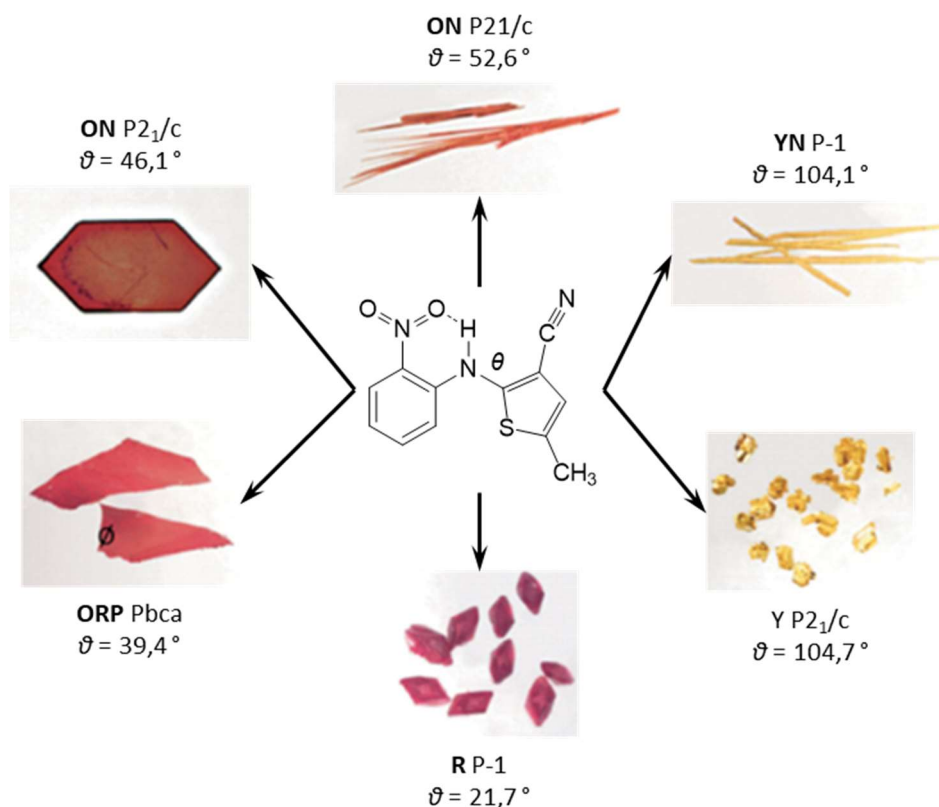
Polimorfija se definira kao mogućnost postojanja čvrstog materijala u dva ili više kristalnih oblika s različitim rasporedom atoma, molekula ili jedinki u kristalnoj rešetki.<sup>5</sup> Iako se puno napora ulaže u istraživanje fenomena pojave polimorfije kod različitih tvari, on i dalje predstavlja veliki znanstveni izazov. Naime, teško je predvidjeti hoće li određena tvar kristalizirati u jednoj ili više kristalnih modifikacija ili neće uopće kristalizirati (amorf), hoće li tvoriti solvate s različitim stehiometrijskim omjerima otapala ili će se povezivati s drugim molekulama te formirati soli ili kokristale (Slika 1).<sup>6</sup>



Slika 1. Prikaz mogućih čvrstih oblika molekula.<sup>6</sup>

### 2.1.2. Svojstva polimorfa

Na temelju termodinamičkih zakonitosti, u određenim uvjetima trebao bi biti stabilan samo jedan polimorf. Međutim, zbog različitih kinetičkih parametara, uz termodinamički stabilne forme mogu biti prisutne i različite metastabilne forme. Relativne stabilnosti kristalnih formi i mogućnosti prijelaza između njih, između solvata i amorfne i kristalne faze mogu imati veliki utjecaj na „životni vijek“ polimorfne forme, a time i na različita svojstva koja su karakteristična za određenu formu. Dobar primjer su kristalne modifikacije 5-metil-2-[(2-nitrofenil)amino]-3-tiofenkarbonitrila (engl. *Red-Orange-Yellow*; ROY) koji egzistira u šest različitih kristalnih formi različitih boja i morfologija kristala (Slika 2).<sup>7,8</sup>



**Slika 2.** Primjer različitih svojstava i morfologije različitih polimorfa.<sup>8</sup>

Osim boje i morfologije, polimorfi se mogu razlikovati i prema topljivosti, čvrstoći, optičkim svojstvima, temperaturi tališta i kemijskoj reaktivnosti.<sup>9, 10</sup> Te razlike otvaraju veliki broj mogućnosti različitih primjena polimorfa u industriji, posebice farmaceutskoj industriji.

### 2.1.3. Uloga polimorfije u API-ima

Polimorfizam kod djelatnih tvari široko je rasprostranjen fenomen koji je opažen kod više od polovice svih poznatih farmaceutskih tvari dok se čak 85 % supstanci javlja u obliku hidrata ili solvata.<sup>11</sup> Poznato je da različiti polimorfi API-a mogu imati utjecaj na niz parametara koji su ključni u razvoju gotovih oblika lijekova kao što su bioraspoloživost, brzina otapanja, topljivost, stabilnost i rok trajanja (Tablica 1).<sup>12-14</sup>

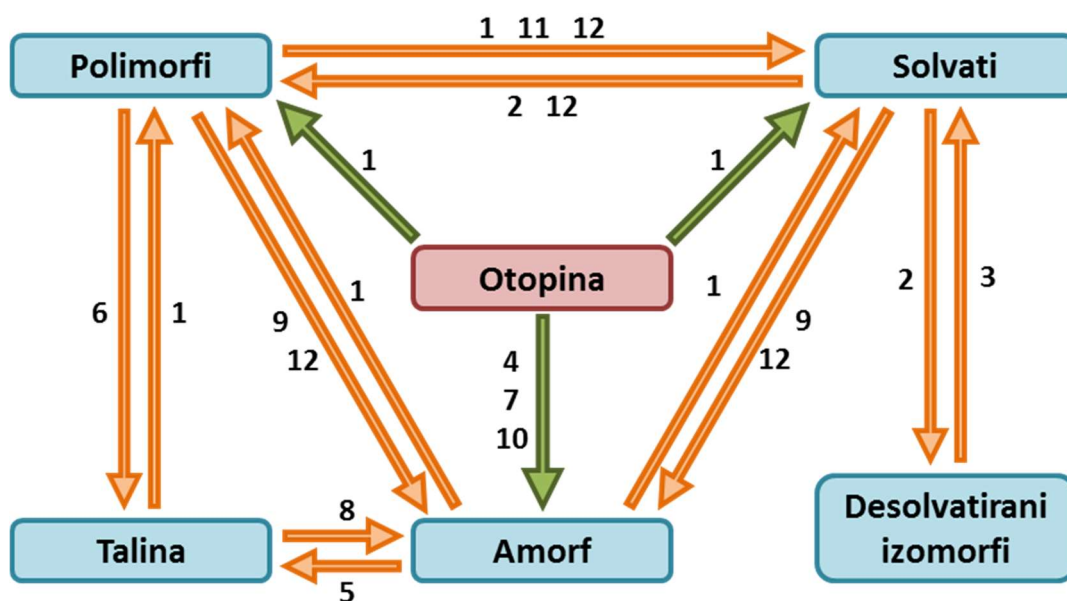
**Tablica 1.** Primjeri kemijskih i fizikalnih svojstava koja se razlikuju u različitim kristalnim formama.

| Svojstva                              | Primjer   |
|---------------------------------------|---|
| <b>FIZIKALNA I<br/>TERMODINAMIČKA</b> | gustoća, indeks loma svjetlosti, toplinska i električna vodljivost, higroskopnost, talište                                  |
| <b>SPEKTROSKOPSKA</b>                 | elektronska, vibracijska i rotacijska svojstva  |
| <b>KINETIČKA</b>                      | brzina otapanja, kinetika brzine reakcije u čvrstom stanju, fizikalna/kemijska stabilnost, brzina nukleacije/rasta kristala |
| <b>POVRŠINSKA</b>                     | slobodna energija površine, habitus kristala, specifična površina, raspodjela veličine čestica                              |
| <b>MEHANIČKA</b>                      | tvrdća, stlačljivost, temperaturna ekspanzija   |
| <b>KEMIJSKA</b>                       | kemijska i fotokemijska reaktivnost   |

Osim utjecaja na svojstva gotovih oblika lijekova, polimorfija može imati veliki utjecaj i na procese pripreme lijekova i API-a kao što su primjerice filtracija, sušenje, mikronizacija, tečljivost kristala te na procese pripreme gotovih oblika djelatnih tvari. Bitno je naglasiti da se s regulatornog stajališta i mala količina krivog polimorfa smatra onečišćenjem te može dovesti do povlačenja lijeka s tržišta.

Tijekom razvoja procesa pripreme API-a, važno je dobro istražiti polimorfizam molekule kako bi se odabrao pravi polimorf željenih svojstava (morfologija, topljivost, bioraspoloživost, stabilnost), ali isto tako polimorf koji će biti stabilan tijekom cijelog procesa pripreme ljekovite tvari.<sup>15</sup> To je moguće jedino uz razumijevanje mehanizama koji utječu na rast kristala i nastanak određene kristalne forme. Istraživanje polimorfije na API-ima provodi se kombiniranjem većeg broja metoda (Slika 3, Tablica 2).<sup>6</sup>





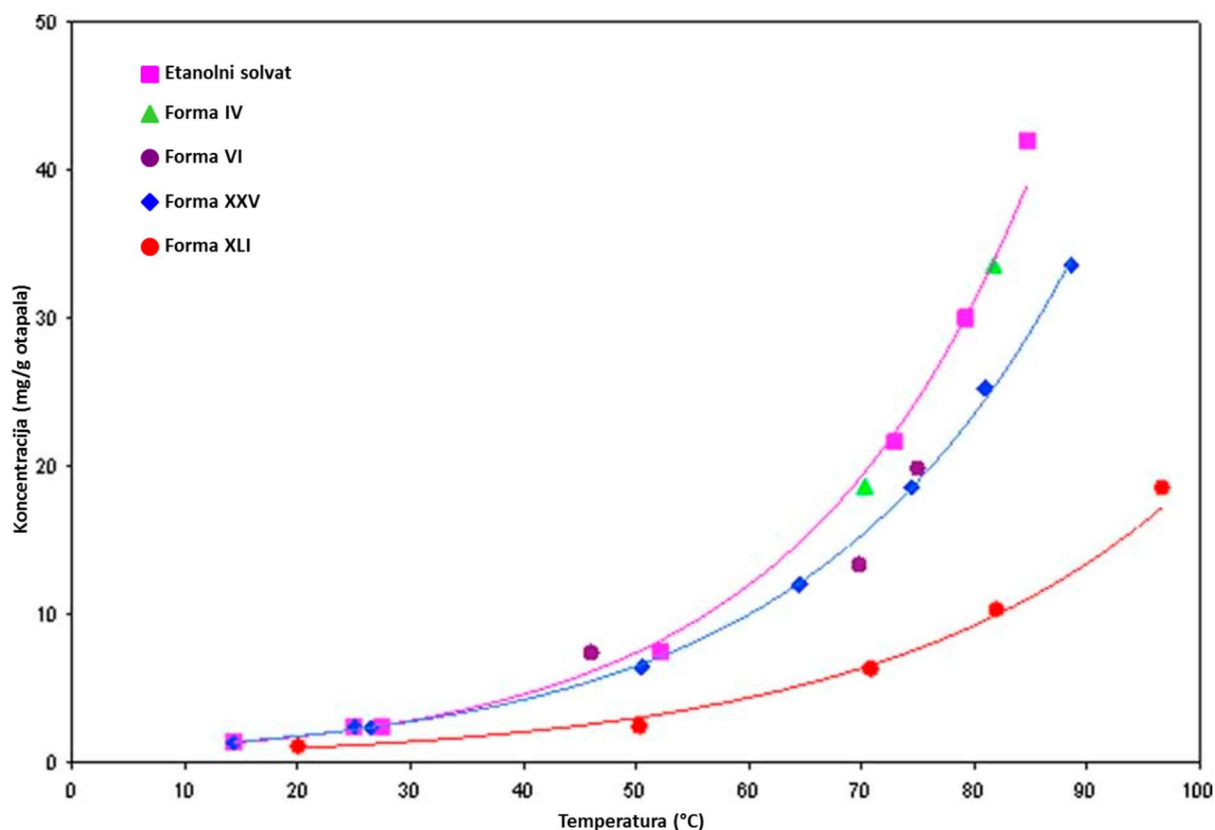
**Slika 3.** Odnosi između različitih faza i uobičajenih postupaka pripreve polimorfa u laboratorijskim istraživanjima (Tablica 2).<sup>6</sup>

**Tablica 2.** Prikaz najčešćih metoda pripreve polimorfa u laboratorijskim istraživanjima (Slika 3).<sup>6</sup>

| Broj | Metoda   |
|------|--|
| 1    | kristalizacija                                     |
| 2    | desolvatacija                                      |
| 3    | izlaganje parama otapala                           |
| 4    | liofilizacija                                      |
| 5    | zagrijavanje                                       |
| 6    | taljenje   |
| 7    | taloženje  |
| 8    | naglo hlađenje                                     |
| 9    | mljevenje  |
| 10   | sušenje raspršivanjem                              |
| 11   | mehanokemijska sinteza uz dodatak par kapi otapala |
| 12   | „mokra“ granulacija                                |

Unatoč velikim naporima i opsežnim istraživanjima polimorfije prilikom razvoja djelatnih tvari, u literaturi se može pronaći veliki broj primjera koji pokazuju kako nije uvijek jednostavno otkriti i odabrati pravi polimorf za daljnji razvoj.<sup>16-18</sup>

Dobar primjer je aksitinib (Inlyta®), inhibitor tirozin kinaze, koji se pokazao kao dobar inhibitor rasta stanica raka dojke. Do sada je otkriveno preko 70 različitih kristalnih formi od kojih pet anhidro- formi.<sup>19</sup> Tijekom razvoja procesa na laboratorijskom mjerilu otkrivena je forma XXV za koju se vjerovalo da je termodinamički najstabilnija (do tada je otkriveno 39 različitih formi). Uvećanjem proizvodnog postupka, prilikom pilotne proizvodnje dobivena je do tada nepoznata forma, forma XLI. Dodatnim ispitivanjima otkriveno je da je forma XLI termodinamički najstabilnija te ima bitno nižu topljivost u odnosu na željenu formu XXV (Slika 4).



**Slika 4.** Usporedba topljivosti etanolnog solvata i formi IV, VI, XXV i XLI aksitiniba u ovisnosti o temperaturi.<sup>19</sup>

Uz velike napore i dodatna istraživanja otkriveni su mehanizmi nastajanja velikog broja formi aksitiniba čime je omogućen razvoj robusnog procesa pripreve željenog polimorfa.

Još jedan primjer je lijek atorvastatin kalcij koji spada u klasu statina, molekula koje inhibiraju određene enzime u tkivu jetre koji imaju bitnu ulogu u sintezi kolesterola u organizmu.<sup>20</sup> Od 1996 do 2012. godine, atorvastatin kalcij postao je najprodavaniji lijek na svijetu svih vremena uz zaradu od preko 125 milijardi dolara. Do sada je otkriveno preko 60 različitih kristalnih formi, ali još nije objavljena niti jedna struktura koja bi objasnila njegovu prirodu stvaranja tolikog broja polimorfa. Između ostaloga, atorvastatin kalcij slabo je topljiv, a time je i njegova bioraspoloživost vrlo mala te iznosi svega 14 %. Stoga i dalje traje potraga za novom polimorfnom formom koja bi imala bolja željena fizikalna svojstva.<sup>21</sup>

#### 2.1.4. Analitičke metode praćenja polimorfije

Strukturne karakteristike polimorfa i fazne transformacije tijekom obrade analiziraju se kombinirajući nekoliko metoda.<sup>22</sup>

Morfološke karakteristike i habitus kristala najčešće se analizira mikroskopskim metodama kao što su optička mikroskopija, pretražna elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*; SEM), transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *Transmission Electron Microscopy*; TEM). Razlike između površina kristala analiziraju se mikroskopom atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*; AFM), dok se mikroskopija s grijaćom pločom (engl. *Hot Stage Microscopy*; HSM) koristi u analizi grijanjem induciranih faznih transformacija između polimorfa.<sup>23–26</sup>

Toplinske analize kao što su termogravimetrijska analiza (engl. *Thermogravimetry*; TG) i razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*; DSC) koriste se u analizi toplinskih svojstava polimorfa.<sup>27, 28</sup> Informacije o kristalnoj strukturi mogu se odrediti difrakcijom rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku dok se difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (engl. *Powder X-ray Diffraction*; PXRD) koristi za potvrdu strukture.<sup>29</sup> Vibracijska spektroskopija kao što je infracrvena (engl. *Infrared Spectroscopy*; IR) ili Ramanova koristi se za identifikaciju razlika u vibracijama polimorfa koje su uzrokovane razlikama u strukturi.<sup>30</sup> Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) u čvrstom stanju bazira se na različitim magnetskim stanjima i pokretljivost jezgara svakog pojedinog polimorfa što utječe ne kemijski pomak svakog signala.<sup>31, 32</sup>

Iako se većina metoda bazira na analizi već izoliranih čvrstih uzoraka, postoji sve veća potreba za *in-line* analizom procesa kristalizacije kako bi se došlo do podataka koji mogu biti korisni u boljem razumijevanju mehanizama koji utječu na rast kristala i nastanak određene

kristalne forme ili prijelaza iz jedne forme u drugu. U tu svrhu, najčešće korištene metode su infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*; FTIR) i FT-Raman sonde, mjerenje refleksije fokusiranog snopa laserskih zraka (engl. *Focused Beam Reflectance Measurement*; FBRM) sonda.<sup>33, 34</sup>

## 2.2. Onečišćenja u API-ima

Prilikom procesa proizvodnje djelatne tvari, bilo kemijskom sintezom, uzgojem stanica/fermentacijom, ekstrakcijom spojeva iz prirodnih materijala ili bilo kojom kombinacijom istih, postoji mogućnost njenog onečišćavanja. Onečišćenje je definirano kao svaki spoj koji egzistira s djelatnom tvari bilo da je riječ o polaznom materijalu, međuproduktu u sintezi ili spoju koji je nastao neželjenom reakcijom.<sup>35</sup> Razumijevanje podrijetla onečišćenja, kontrola i mjerenje njihove razine kritičan je korak u proizvodnji djelatnih tvari. Aktivnosti poduzete na području analize onečišćenja su među najvažnijima u modernoj farmaceutskoj analitici.<sup>36-38</sup>

### 2.2.1. Podrijetlo onečišćenja prisutnih u API-ima

S obzirom na put nastanka, postoje tri vrste onečišćenja:

- procesna onečišćenja – onečišćenja koja nastaju prilikom sinteze djelatne tvari
- degradacijska onečišćenja – onečišćenja nastala spontanom raspadom djelatne tvari prilikom skladištenja ili izloženosti vanjskim uvjetima
- kontaminacijska onečišćenja – onečišćenja koja nisu povezana s djelatnom tvari, ali su unesena u proizvod obradom ili skladištenjem, a nisu dio sintetskog, ekstrakcijskog ili fermentacijskog procesa

Dodatno, različiti polimorfi ili enantiomeri također se u nekim slučajevima smatraju onečišćenjima.

#### 2.2.1.1. Procesna onečišćenja

Procesna onečišćenja uključuju anorganska onečišćenja, organska onečišćenja te ostatna otapala.<sup>35</sup> Organska onečišćenja mogu biti produkti neželjenih reakcija tijekom kemijske sinteze, primjerice mogu nastati reakcijom međuprodukta s otapalom, ciklizacijom u krivom smjeru, reakcijom međuprodukta s onečišćenjima u reagensima itd.

Anorganska onečišćenja uključuju vodu, različite anorganske soli, reagense, ligande, katalizatore, teške metale ili druge ostatne metale, anorganske spojeve korištene prilikom obrade, kao što su filtracijska zemlja ili aktivni ugljen. Anorganskim onečišćenjima također se smatraju i onečišćenja prisutna u djelatnoj tvari zbog neodgovarajuće ili dotrajale opreme (dijelovi gume, brtvi, teflona, keramike, hrđe).<sup>39</sup>

Ostatna otapala tretiraju se kao posebna vrsta onečišćenja. Otapala koja se koriste prilikom sinteze djelatnih tvari ne mogu se potpuno ukloniti tijekom proizvodnje te će u određenoj mjeri biti prisutna u finalnoj djelatnoj tvari. To mogu biti otapala korištena u zadnjim stupnjevima sinteze, ali isto tako i slabo hlapljiva otapala korištena u ranijim stupnjevima sinteze.

#### *2.2.1.2. Degradacijska onečišćenja*

Degradacijska onečišćenja su kemijski spojevi nastali raspadom djelatne tvari tijekom skladištenja. U rjeđim slučajevima, djelatna tvar reagira s drugim spojevima ili onečišćenjima. Ukoliko se tijekom skladištenja uoči porast procesnih onečišćenja, tada su ta onečišćenja ujedno i degradacijska. Prema smjernicama regulatornih agencija ona spadaju pod organska onečišćenja.<sup>35</sup>

#### *2.2.1.3. Kontaminacijska onečišćenja*

Kontaminacijska onečišćenja su neočekivani spojevi prisutni u djelatnoj tvari, kao što je primjerice olovo koje je isprano s cjevovoda, ljudska kosa, komadići boje, guma, staklo, aluminij ili čelik.<sup>39</sup> Zbog ovih razloga u modernim proizvodnim pogonima se koriste uglavnom zatvorene proizvodne linije od nehrđajućeg čelika ili stakla da se maksimalno smanji mogućnost neočekivane kontaminacije.

#### *2.2.1.4. Ostala onečišćenja*

U ostala onečišćenja spadaju enantiomerni, diastereomerni oblici djelatne tvari, te neželjeni polimorfi.

Više od polovice djelatnih tvari na tržištu su kiralni spojevi.<sup>40</sup> I dok su prirodni i polusintetski lijekovi uglavnom čisti enantiomeri, kiralni sintetski lijekovi uglavnom su prisutni u obliku racemata. Ipak, sve veće poznavanje aktivnosti i nuspojava neželjenih enantiomera dovodi do novih zahtjeva regulatornih agencija koje preferiraju enantiomerno čiste spojeve te

će zahtjevi biti sve stroži.<sup>41, 42</sup> S druge strane, industrijska proizvodnja enantiomerno čistih spojeva upotrebom stereoselektivnih sintetskih metoda sve je uspješnija.

Različiti polimorfi mogu nastati u slučaju promjena proizvodnog procesa, prisutnosti određenih onečišćenja, prisutnosti cjepiva krive forme itd..<sup>43</sup> U nekim slučajevima prisutnost krivog polimorfa u djelatnoj tvari nije bitno, međutim postoje slučajevi kada kriva polimorfna forma ima kritični utjecaj na svojstva djelatne tvari, te se tada smatra kao onečišćenje.<sup>44</sup>

### 2.2.2. Regulatorni zahtjevi

Identifikacija, te kvalitativna i kvantitativna analiza onečišćenja bitan su alat u procjeni sigurnosti i kvalitete kako djelatnih tvari, tako i njihovih dozirnih oblika. Sigurnost i kvaliteta moraju biti dokazani kroz registracijsku dokumentaciju, ali isto tako i konstantnim praćenjem te ponovnim dokazivanjem u slučaju bilo kakvih promjena u procesu sinteze djelatne tvari ili formulacije koje mogu utjecati na kvalitetu ili sigurnost. Godinama je o pitanju kvalitete i sigurnosti samih djelatnih tvari odlučivala regulatorna agencija svakog pojedinog tržišta. Međutim, od 1990. godine ovom temom se bavi Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku uporabu (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*; ICH).<sup>35</sup>

Projekt ICH pokrenut je od strane triju svjetskih regulatornih agencija: europske, američke te japanske, kako bi se uskladili tehnički zahtjevi za registracijske prijave na tim velikim farmaceutskim tržištima. Glavni zadatak ICH je osiguravanje kvalitete, sigurnosti te efikasnosti kako djelatnih tvari tako i finalnih proizvoda.<sup>35</sup>

### 2.2.3. Granice onečišćenja

Ključan faktor u proizvodnji nekog farmaceutskog proizvoda je kontrola onečišćenja, jer njihova prisutnost, čak i u malim količinama može utjecati na učinkovitost proizvoda, ali i na sigurnost, odnosno zdravlje osoba koje ga koriste (može imati nepoželjne ili toksične efekte na organizam). Zbog toga za farmaceutsku industriju postoje smjernice kojima se definiraju granice onečišćenja za svaki proizvod.<sup>35</sup>

Tako postoje granice prijavljivanja (količina pri kojoj se onečišćenje mora prijaviti s naznačenim analitičkim postupcima), granice identifikacije (razina na kojoj se onečišćenje mora strukturno identificirati) te kvalifikacijske granice (granice pri kojima se onečišćenje mora kvalificirati). Količina onečišćenja u nekom proizvodu ovisi o dnevnoj dozi lijeka, a ovisno o

udjelu onečišćenja u lijeku definirane su i granice za prijavljivanje regulatornim tijelima, identifikaciju, odnosno toksikološke analize (Tablice 3 – 5).

**Tablica 3.** Granice prijavljivanja (engl. *Reporting Tresholds*).<sup>35</sup>

| Maksimalna dnevna doza | Granica |
|------------------------|---------|
| ≤ 1 g                  | 0,1 %   |
| > 1 g                  | 0,05 %  |

**Tablica 4.** Identifikacijske granice (engl. *Identification Tresholds*).<sup>35</sup>

| Maksimalna dnevna doza | Granica                                     |
|------------------------|---|
| < 1 mg                 | 1,0 % ili 5 µg TDI*, uzima se niža granica  |
| 1 mg – 10 mg           | 0,5 % ili 20 µg TDI*, uzima se niža granica |
| > 10 mg – 2 g          | 0,2 % ili 2 mg TDI*, uzima se niža granica  |
| > 2 g                  | 0,10 %                                      |

\* TDI – maksimalna dnevna količina unosa (engl. *Total Daily Intake*)

**Tablica 5.** Kvalifikacijske granice (engl. *Qualification Tresholds*).<sup>35</sup>

| Maksimalna dnevna doza | Granica                                      |
|------------------------|--|
| < 10 mg                | 1,0 % ili 50 µg TDI*, uzima se niža granica  |
| 10 mg – 100 mg         | 0,5 % ili 200 µg TDI*, uzima se niža granica |
| > 100 mg – 2 g         | 0,2 % ili 3 mg TDI*, uzima se niža granica   |
| > 2 g                  | 0,15 %                                       |

\* TDI – maksimalna dnevna količina unosa (engl. *Total Daily Intake*)

#### 2.2.4. Identifikacija onečišćenja

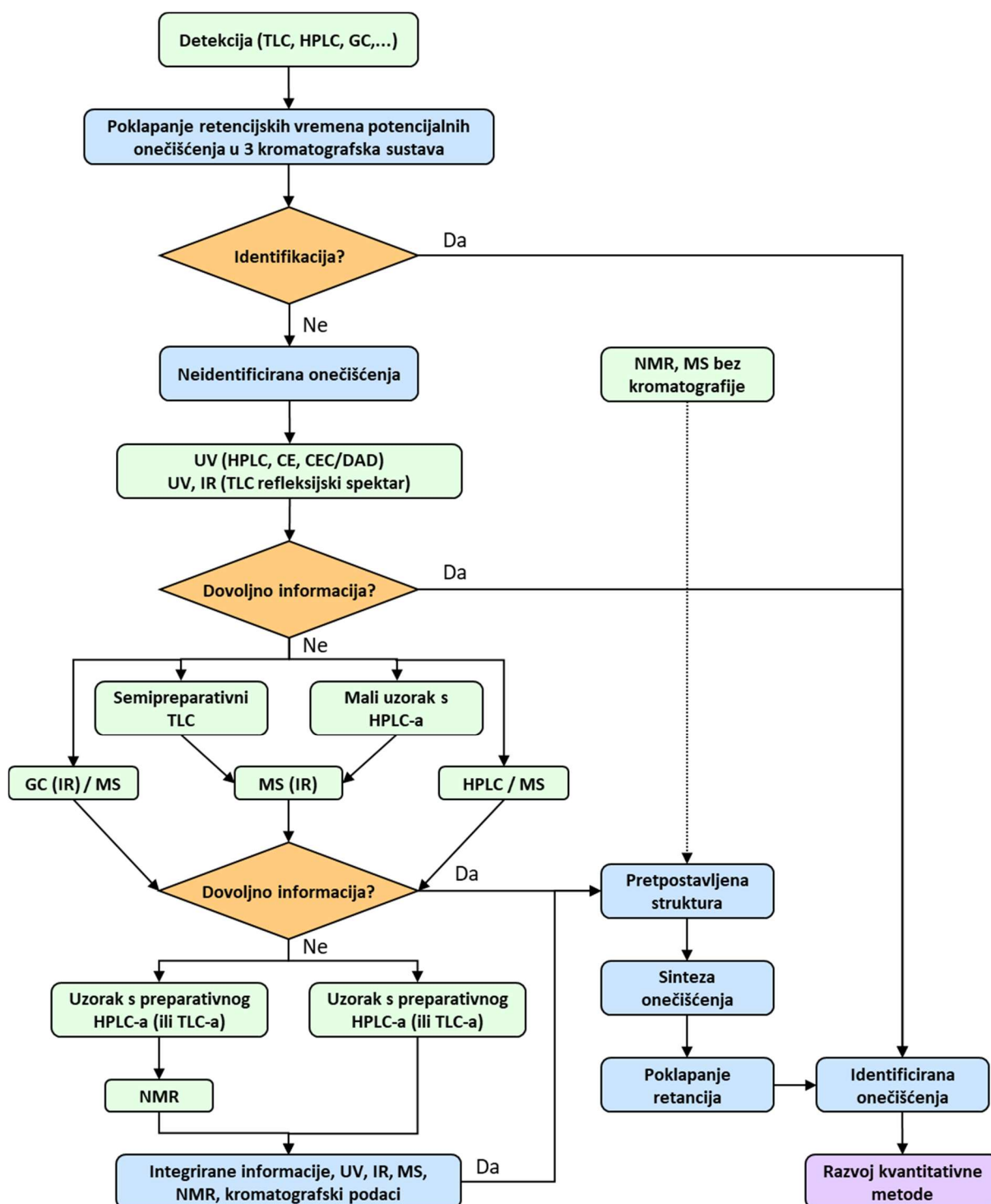
Profil onečišćenja podložan je promjenama koje su zapravo posljedica promjene puta sinteze, reakcijskih uvjeta, izvora polaznih materijala, reagensa i otapala korištenima u sintezi. Stoga se profili onečišćenja moraju provjeravati redovito, ne samo za vrijeme faze istraživanja i razvoja, već svaki puta kada se uvodi promjena jednog od navedenih čimbenika. Kada se uzme u obzir vrijeme potrebno za takva istraživanja iznimno je bitno pronaći pravu strategiju koja će omogućiti ostvarenje rezultata u najkraćem mogućem roku.

### 2.2.4.1. Strategije i metode korištene u određivanju onečišćenja

Vrlo je teško prikazati opću sliku o strategijama korištenima u laboratorijima prilikom profiliranja onečišćenja (Slika 5). Iako su metode manje-više slične u svim laboratorijima, redoslijed i način korištenja metoda se razlikuju od laboratorija do laboratorija. Razlozi za ove razlike i probleme mogu se svesti u nekoliko točaka:

- velika većina istraživanja profila onečišćenja provodi se u laboratorijima industrijskih kompanija. Informacije o načinu rada te sami rezultati istraživanja smatraju se poslovnom tajnom te se uglavnom ne objavljuju u znanstvenim radovima ili publikacijama
- metodologija profiliranja onečišćenja brzo se mijenja. Ona ovisi o razvoju te uvođenju novih metoda u primjenu. Prije četrdesetak godina identifikacija onečišćenja bila je dugotrajan proces na koji se trošilo puno resursa. Razdvajanja su se uglavnom radila na kromatografskim kolonama nakon čega je uslijedila spektroskopska karakterizacija razdvojenih materijala. Već početkom 60-tih godina 20. stoljeća uvode se spregnute metode, HPLC-MS-(MS), te kasnije početkom 90-tih godina i HPLC-NMR-(MS) što je uvelike olakšalo posao farmaceutskim kompanijama te otvorilo nove mogućnosti u profiliranju onečišćenja.
- strategija profiliranja onečišćenja uvelike ovisi o laboratoriju u kojem se istraživanje provodi te o financijskim mogućnostima. Prilikom sinteze i razvoja novog proizvoda, potrebna je najnovija oprema da bi se bez većih problema definirala sva onečišćenja.
- u većini slučajeva u procesu profiliranja onečišćenja postoji nekoliko načina da se dođe do istog cilja – strukture onečišćenja. Stoga, ovisno o dogovorenoj strategiji, instrumentaciji te potrebama, definirat će se put kojim će se onečišćenja identificirati.





Slika 5. Strategija u određivanju strukture nepoznatog onečišćenja.

Prvi korak u profiliranju onečišćenja je detekcija samog onečišćenja. Iako nuklearna magnetska rezonancija (NMR) visoke rezolucije i spektrometrija masa (MS) imaju važnu ulogu u dobivanju spektra 'otiska prsta' (engl. *finger print*), u čistoći djelatne tvari one se ipak koriste u

kasnijim stupnjevima karakterizacije onečišćenja. U detekciji samih onečišćenja uglavnom se koriste kromatografske ili elektroforetske metode. Fizikalno-kemijske karakteristike analita uvjetuju odabir metode odvajanja (separacije) te način detekcije. Budući da se često ne može predvidjeti kakva onečišćenja će biti prisutna, preporuka je koristiti više separacijskih metoda i više metoda detekcije kako bi bili sigurni da su uočena sva prisutna onečišćenja.

Često korištena metoda zbog svoje jednostavnosti i male cijene je tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*; TLC). Kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) je metoda koja je u odnosu na TLC osjetljivija i selektivnija te je najzastupljenija u određivanju onečišćenja. Opremljeniji laboratoriji za analizu onečišćenja koriste i kromatografiju superkritičnim fluidom (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*; SFC), kapilarnu elektroforezu (engl. *Capillary Electrophoresis*; CE) i za toplinski stabilne, a lako hlapljive spojeve plinsku kromatografiju (engl. *Gas Chromatography*; GC).<sup>45, 46</sup>

Drugi bitan faktor u uspjehu detekcije svih onečišćenja jest osjetljivost metode. Uobičajeno je da se navedenim metodama detektiraju onečišćenja do granice od 0,01 %. U slučaju da to nije moguće, postoje različite metode povećanja osjetljivosti.<sup>47</sup>

Nakon što se definira točan broj prisutnih onečišćenja te razvije prikladna kromatografska metoda za njihovo razdvajanje, slijedi identifikacija te pokušaj smanjenja sadržaja pojedinih i ukupnih onečišćenja.

#### 2.2.4.2. Najčešća onečišćenja u djelatnim tvarima

Potencijalna onečišćenja su međuprodukti u sintezi, produkti nezavršenih reakcija (primjerice monoacetat dihidroksi spoja, dok je željena supstanca diacetat), produkti naknadnih reakcija (primjerice diacetat dihidroksi spoja, ako je željeni produkt monoacetat), nusprodukti, degradacijski produkti itd.

Tijekom identifikacije potencijalnih onečišćenja uvelike pomaže ako su onečišćenja poznate i dostupne supstance. Prisutnost potencijalnih onečišćenja kromatografski se potvrđuje preklapanjem vremena zadržavanja signala čiste supstance i signala prisutnog u uzorku. Identifikacija bazirana na kromatografskim vremenima zadržavanja može se smatrati uspješnom u slučaju pozitivnog rezultata na barem dva ili čak tri različita sustava bazirana na različitim metodama razdvajanja. Dodatna potvrda identifikacije onečišćenja je analiza uzorka s dodanim potencijalnim onečišćenjem te preklapanje vremena zadržavanja signala s uzorkom u kojem je onečišćenje prisutno.

### 2.2.4.3. *Sinteza onečišćenja*

Nije neobično da je sinteza onečišćenja predložene strukture puno teži zadatak od sinteze same djelatne tvari te će u tom slučaju sinteza trajati dugo uz intenzivan rad. Prilikom sinteze onečišćenja definira se i količina potrebnog spoja. Uglavnom se govori o gramskoj skali iz nekoliko razloga:

- nakon uspješne sinteze i kompletne spektroskopske analize, sintetizirani materijal mora proći kroz kromatografsku i spektralnu usporedbu s onečišćenjem nađenim u djelatnoj tvari.
- kvaliteta spektara onečišćenja dobivenih sintezom u pravilu je bolja od spektara dobivenih na maloj količini izoliranog onečišćenja. Nakon potvrde strukture, spektri bolje kvalitete mogu poslužiti u svrhu registracije ili publikacije.
- gramske količine sintetiziranog onečišćenja smogu se koristiti kao standardi. To znači da je moguće razviti selektivne analitičke metode za kvantitativno određivanje onečišćenja što može postati dio protokola za svaku proizvedenu seriju pri čemu se prilikom svake analize onečišćenje koristi kao standard. To također znači da će u tom slučaju biti potrebno poslati određenu količinu uzorka regulatornim agencijama te isto tako i kupcima djelatnih tvari.
- sintetizirano onečišćenje može se podvrgnuti toksikološkim ispitivanjima što je za glavna onečišćenja obavezno. Za onečišćenja za koje se postavlja veća granica od one propisane ICH smjernicama, potrebno je opravdati neškodljivost te količine toksikološkim studijama.

Sinteza onečišćenja u nekim slučajevima može biti neizvediva ili teško izvediva. U takvim slučajevima sinteza se može izuzeti iz protokola profiliranja onečišćenja te će se standard onečišćenja izolirati preparativnom tekućinskom kromatografijom.<sup>48</sup>

### 2.2.5. *Analitičke metode za praćenje onečišćenja u API-ima*

#### 2.2.5.1. *Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti*

Ubrzo nakon razvoja prvog uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*; HPLC) krajem 60-tih godina 20. stoljeća metoda je uvedena i u farmaceutsku industriju. Danas je HPLC analiza (uglavnom reverzno-fazna) zbog mogućnosti pouzdanog određivanja analita iz smjese najraširenija metoda analize koja daje brze i raznovrsne mogućnosti razdvajanja. S obzirom na sve veće zahtjeve za analizom čistoće

djelatnih tvari i gotovih oblika farmaceutskih proizvoda, HPLC je metoda koja može ispuniti sve te zahtjeve.

U početku, razvoj HPLC-a je bio usredotočen na razvoj tehnologije kolona za razdvajanje. Razvijene su kolone s mikročestičnim punjenjima što je dovelo do male disperzije signala na koloni te time poboljšalo selektivnost metode. Razvoj stacionarnih faza nastavljen je u smjeru sinteze visokoselektivnih stacionarnih faza. Dodatna poboljšanja su razvijena i na samom instrumentu na području selektivnosti razdvajanja, detekciji i učinkovitosti. Danas HPLC, što se tiče brzine, točnosti, preciznosti i pouzdanosti, zadovoljava sve posebne zahtjeve u analizi čistoće u farmaceutskoj industriji.

#### 2.2.5.2. Nuklearna magnetska rezonancija

Od prvih klasičnih pokusa koje su proveli 1946. godine Edward M. Purcell i Felix Bloch (dobitnici Nobelove nagrade 1952. godine), nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*; NMR) doživjela je nevjerojatan razvoj, neusporediv s bilo kojom drugom spektroskopskom metodom.

Unatoč širokoj upotrebi, većina NMR sustava namijenjena je određivanju strukture kapljevitih uzoraka sintetiziranih malih organskih molekula ( $M_r < 1000 \text{ g mol}^{-1}$ ) ili molekula spojeva izoliranih iz prirodnih materijala. U posljednjih desetak godina, snažan razvoj NMR spektroskopije pridonio je razvoju novih načina mjerenja i iskorištavanja samog fenomena magnetske rezonancije. S tehnološke strane, supravodički magneti (danas najjači komercijalno dostupan magnet radi na 900 MHz), stabilnost i homogenost, unaprijeđena elektronika te računalna tehnologija, doprinose povećanju osjetljivosti i razlučivosti, te dramatično smanjuju vremena mjerenja. U slučaju malih organskih molekula, rješavanje strukture uglavnom se odvija koristeći  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopiju, međutim u nekim slučajevima  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  te  $^{31}\text{P}$  NMR također mogu biti snažni alati.<sup>49</sup>

#### 2.2.5.3. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija temelji se na činjenici da molekula apsorbira specifične frekvencije zračenja koje su karakteristika svake molekule. Frekvencija apsorbiranog zračenja poklapa se s vibracijskim energijama prijelaza atoma ili skupine koja vibrira. Da bi vibracija bila vidljiva u IR području mora biti povezana s promjenom dipolnog momenta u molekuli.

Infracrvena spektroskopija promatra vibracijske promjene u molekulama prilikom izlaganja infracrvenom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja. Infracrveni dio spektra može se podijeliti na visoko energijski bliži IR (valne duljine od 14000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), srednji IR (4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ) te daleki IR (400 – 10  $\text{cm}^{-1}$ ).

U posljednje vrijeme dogodio se značajan razvoj u selektivnosti i osjetljivosti kromatografskih metoda, kao i metoda za određivanje strukture kao što je NMR i MS. S razvojem ovih metoda, zamijenjene su neke druge metode kao što je vibracijska i UV/VIS spektroskopija. Ipak, vibracijska spektroskopija ostala je u upotrebi zbog jednostavne primjene u morfološkoj analizi djelatnih tvari. Vibracijska spektroskopija je metoda koja daje spektralni 'otisak prsta' molekule, a osjetljiva je na morfološke razlike koje potječu iz razlika u vodikovim vezama ili rotacijskim smetnjama određene skupine. Unatoč tome, postoje i iznimke u kojima se razlike u polimorfima ne vide u vibracijskim spektrima.<sup>50</sup>

#### 2.2.5.4. Razlikovna pretražna kalorimetrija

Razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*; DSC) je termoanalitička metoda u kojoj se mjeri tok topline prema uzorku u odnosu na referentni uzorak. I uzorak i referentni uzorak su tijekom cijelog snimanja na identičnoj temperaturi, a temperaturni program za analizu uglavnom je podešen tako da se temperatura povećava linearno s vremenom.

Iako su termoanalitičke metode, a posebno DSC, široko upotrebljavane metode u identifikaciji i karakterizaciji polimorfnih promjena djelatnih tvari, prilikom kvantitativnog određivanja različitih onečišćenja postoje određene poteškoće. Za razliku od NMR spektroskopije u čvrstom stanju ili XRPD-a, tijekom kalorimetrijskog snimanja uzorak ne ostaje nepromijenjen. Pod utjecajem topline uzorak prolazi kroz faznu transformaciju (taljenje ili kristalizacija) ili kemijsku degradaciju. Do promjena može doći zbog različitih kinetičkih faktora koji su teško predvidljivi tijekom analize.

Unatoč nedostacima, u slučajevima u kojima se može primijeniti DSC je moćna metoda za detekciju malih količina polimorfnih onečišćenja (0,2 %), a metodom „cijepljenja“ može poslužiti i za kvantitativno određivanje prisutnosti drugog polimorfa.<sup>51, 52</sup>

#### 2.2.5.5. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza (TG) je termoanalitička metoda u kojoj se mjeri promjena mase (rast ili gubitak) supstance u ovisnosti o temperaturi. TG se u pravilu koristi u kombinaciji s drugim termoanalitičkim metodama kao što je primjerice DSC. TG mjerenja prvenstveno se koriste u određivanju sastava materijala i predviđanju njihove toplinske stabilnosti. Ovom metodom karakteriziraju se materijali koji prolaze kroz promjenu mase bilo zbog adsorpcije ili otpuštanja otapala/vode, ili zbog oksidacije/redukcije ili samog raspada te se time dobivaju vrijedne informacije o stabilnosti koje mogu biti korištene u odabiru materijala željenih svojstava čime se može poboljšati kvaliteta finalnih proizvoda.<sup>51</sup>

#### 2.2.5.6. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku

Ubrzo nakon otkrića rentgenskih zraka (1895., Wilhelm Conrad Röntgen), ovaj fenomen je primijenjen u analizi kristala (1912., Max von Laue) čime je nastala nova grana znanosti, kristalografija. Danas je difrakcija rentgenskih zraka široko primijenjena metoda u farmaceutskoj industriji u analizi polimorfije djelatnih tvari te u praćenju promjena koje se mogu dogoditi ovisno o uvjetima čuvanja ili prilikom razvoja formulacije. Difrakcija rentgenskih zraka može se podijeliti na dvije osnovne metode: difrakcija na monokristalnom uzorku te difrakcija na polikristalnom uzorku, tj. difrakcija praha (engl. *X-ray powder diffraction*; XRPD).

Difrakcijom rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku dobivaju se precizni podatci o kristalnoj strukturi djelatne tvari: dimenzije jedinične ćelije, slaganje molekula u kristalu, vodikove veze, konformacija. Zahvaljujući podacima dobivenima difrakcijom rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku, moguće je izračunati difraktogram praha za svaki snimljeni uzorak.

Kada djelatna tvar ima dvije ili više polimornih modifikacija, uglavnom je jedna od njih preferirana na temelju fizikalnih farmakoloških i formulacijskih svojstava. U tim slučajevima prisutnost drugog polimorfa također se smatra onečišćenjem. Jedna od najbitnijih metoda u analizi polimorfne čistoće je difrakcija rentgenskih zraka na prahu (XRPD) iz sljedećih razloga:

- posljednji korak proizvodnje djelatne tvari najčešće je kristalizacija. XRPD je ključna metoda u analizi polimorfne čistoće kada toplinske i spektroskopske metode ne mogu dovoljno kvalitetno razlikovati sve moguće polimorfe određene djelatne tvari.<sup>53, 54</sup>

- tijekom ispitivanja stabilnosti neki polimorfi djelatne tvari mogu proći kroz faznu promjenu pod utjecajem vlage ili temperature. Prisutnost neželjene forme čak i samo u tragovima može potaknuti neželjeni prijelaz koji se može dogoditi i spontano u slučaju prijelaza iz manje stabilne forme u termodinamički stabilniju.
- u raznim koracima formulacije suhih oralnih oblika može doći do neželjenih promjena zbog utjecaja tehnološkog procesa (mljevenje, izloženost tlaku, toplini, vlazi itd.)
- u posljednje vrijeme u farmaceutskoj industriji sve su češći sudski procesi zbog prisutnosti patentno štićenog polimorfa u formulaciji. Da bi se izbjegli nepotrebni troškovi te moguće izbacivanje s tržišta je bitno pratiti sve moguće promjene u polimorfiji djelatne tvari tijekom cijelog procesa pripreme gotovog oblika.

Za uspješno određivanje prisutnosti neželjenog polimorfa postoje dva bitna kriterija. Difrakcijski uzorak neželjene polimorfne forme trebao bi uključivati signal ili signale koji se u željenoj polimorfnoj formi ne vide. Nažalost, u nekim slučajevima ne postoji dovoljno dobra razlika između XRPD uzorka dva polimorfa, te se tada koriste različite matematičke metode. Drugi kriterij je precizno mjerenje intenziteta signala. Da bi se održao konstantan intenzitet zračenja, s difraktometrom se povezuje stabilizator napona. On omogućava identičan intenzitet istih signala pa je metoda reproducibilna.

Najbitniji faktor koji utječe na intenzitet signala je kvaliteta pripreme uzorka. Cilj je pripremiti nasumično orijentiran uzorak te time smanjiti preferiranu orijentaciju kristala na minimum. Danas je uz moderne instrumente, uz kvalitetnu pripremu uzorka moguće detektirati čak i manje od 1 % neželjenog polimorfa u uzorku. U praksi, difrakcijom rentgenskih zraka na prahu kvantitativno se s velikom preciznošću može odrediti 5 – 10 % polimorfnog onečišćenja. Ipak, preciznost kvantitativnog određivanja ovisi o količini ali i o prirodi komponente polimorfnog onečišćenja.

### 2.3. Kristalizacija

U farmaceutskoj industriji, kristalizacija je jedan od najbitnijih procesa proizvodnje djelatne tvari. Kristalizacija služi za izolaciju, ali i pročišćavanje proizvedene supstance te se stoga puno napora ulaže u istraživanje i razvoj kristalizacijskih procesa. U farmaceutskoj industriji iznimno

je bitna kontrola svih procesa pa tako i kristalizacije, što omogućava reproducibilnu proizvodnju materijala visoke kvalitete.

### 2.3.1. Nukleacija

Nukleacija je početak nastanka nove faze i igra bitnu ulogu u određivanju nastale kristalne forme i raspodjele veličine čestica (engl. *Crystal Size Distribution*; CSD) te je razumijevanje osnova nukleacije presudno u kontroli kristalizacijskog procesa. Osnovni problem u proučavanju nukleacije i razvoju preciznih opisa procesa leži u činjenici da se veličina kritičnih nukleusa kreće od 10 – 1000 molekula, dok se vrijeme nastanka proteže od nekoliko sekundi pa sve do nekoliko dana.

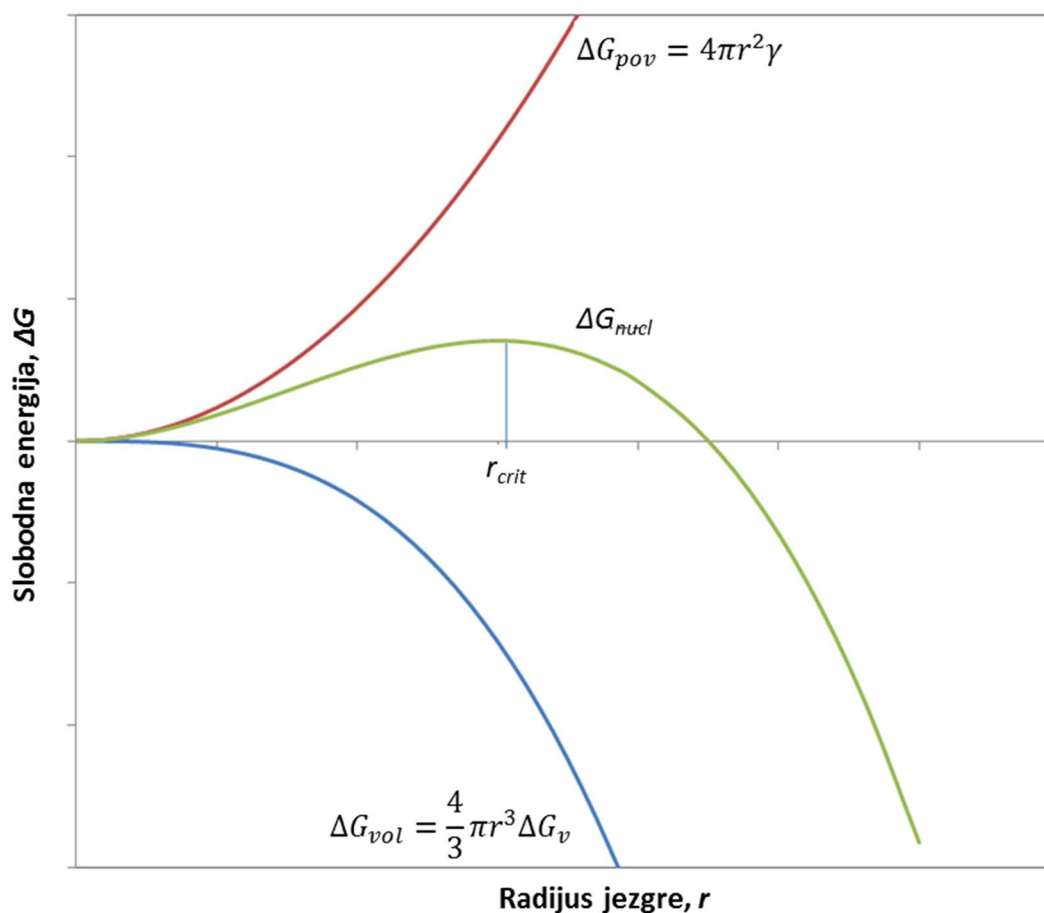
#### 2.3.1.1. Klasično razumijevanje procesa nukleacije

Klasična teorija nukleacije (engl. *Classical Nucleation Theory*; CNT), jednostavna i široko upotrebljavana, pretpostavlja nastanak malih nukleusa nove faze.<sup>55</sup> Iako nova faza ima nižu slobodnu energiju od početne faze, u pretpostavci postoji i slobodna energija povezana s nastankom nukleusa. Za sferičnu jezgru slobodna energija transformacije u drugu fazu,  $\Delta G$ , je zbroj negativnog volumenskog dijela i pozitivnog površinskog dijela definirana kao

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (1)$$

gdje je  $r$  polumjer nukleusa,  $\Delta G_v$  razlika u ukupnoj slobodnoj energiji po jedinici volumena između prve i druge faze,  $\gamma$  površinska slobodna energija druge faze po jedinici površine. Pozitivan dio površinske slobodne energije dominira pri malim polumjerima zbog čega raste ukupna slobodna energija. Kako se veličina klastera povećava, ukupna slobodna energija raste do maksimuma pri kritičnoj veličini klastera ( $r_c$ ) iznad kojeg se ukupna slobodna energija smanjuje kako nukleus postaje sve veći i rast kristala postaje energetski povoljan (Slika 6).



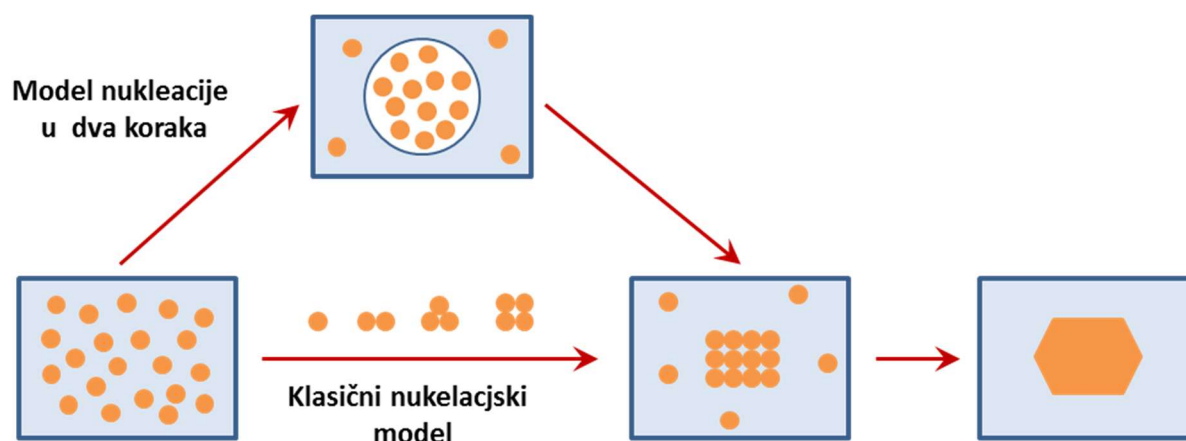


Slika 6. Dijagram slobodne energije prilikom nukleacije prema klasičnoj nukleacijskoj teoriji.<sup>56</sup>

Iako se u početku činilo da klasična teorija nukleacije dobro opisuje proces nukleacije, kasnijim istraživanjima je dokazano da postoje razna ograničenja ove teorije te je nastala potreba za novom teorijom koja bi preciznije opisala cijeli proces.

### 2.3.1.2. Nukleacija u dva koraka (engl. two-step nucleation)

Na temelju velikog broja simulacija, teorija i eksperimentalnih istraživanja, predložena je nova teorija, nukleacija u dva koraka (Slika 7).<sup>57, 58</sup>

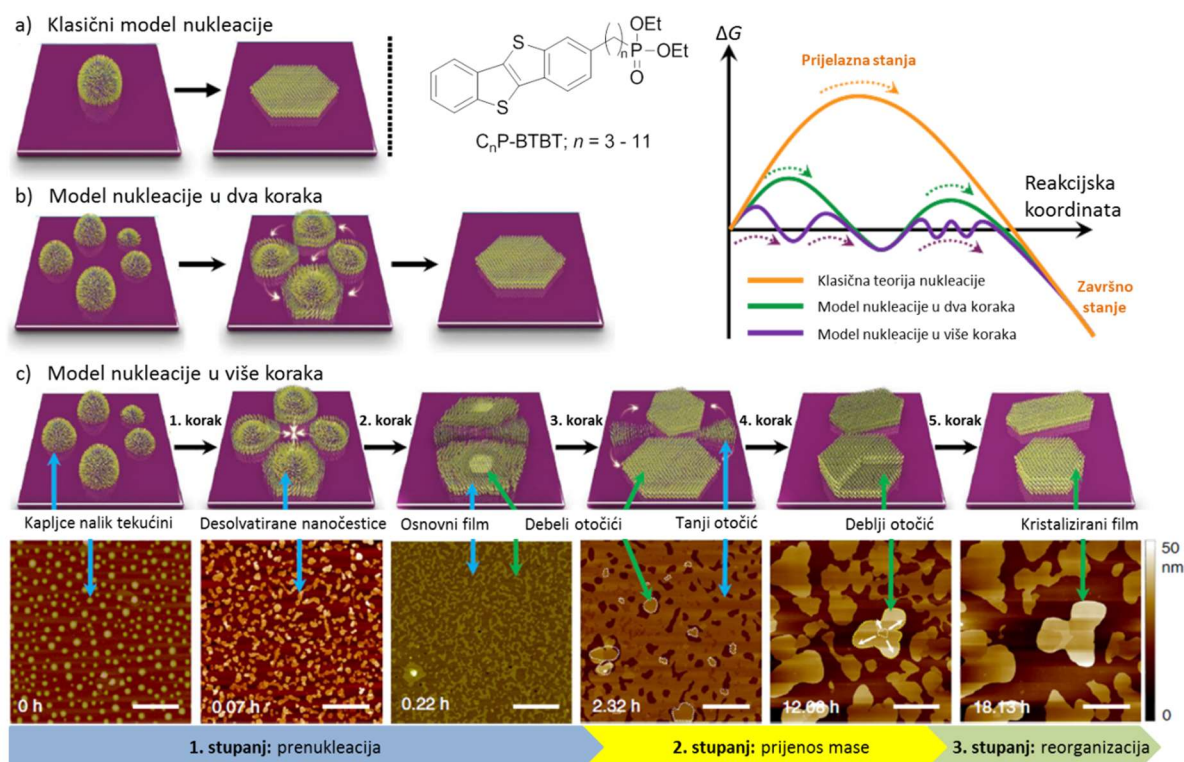


Slika 7. Usporedba klasične teorije nukleacije i nukleacije u dva koraka.<sup>58</sup>

Nukleacija u dva koraka početno je predložena na temelju istraživanja kristalizacije proteina u radu Galkin *et. al.*<sup>58</sup> Prilikom kristalizacije hemoglobina, uočene su guste tekuće faze s visokim koncentracijama hemoglobina u kojima je počinjao proces nukleacije. Daljnja istraživanja su pokazala da se isti mehanizam može primijeniti u nukleaciji proteina, koloidnih čestica, pa čak i malih organskih molekula.<sup>59</sup> Dodatna potvrda predloženog modela dobivena je računalnim simulacijama pri čemu je određena veličina i struktura kritičnog nukleusa koji može biti ili veći/manje uređen ili manji/više uređen.<sup>60</sup>

### 2.3.1.3. Buduća istraživanja

Iako se veliki broj istraživanja podudara s teorijom nukleacije u dva koraka, i dalje je mehanističko shvaćanje puta nukleacije, pogotovo drugog koraka, vrlo ograničeno. Malo je informacija o tome kako se molekule organiziraju u guste kapljice. Taj korak je predložen kao limitirajući što je u skladu s opaženim rezultatima u kojima se kompleksnije molekule puno sporije organiziraju u odgovarajuće strukturne motive. Najnovije istraživanje Chen *et. al.* predlaže nukleaciju organskih kristala u više koraka (engl. *multistep nucleation mechanism*) (Slika 8).<sup>61</sup>



**Slika 8.** Usporedba dosadašnjih teorija (klasične i nukleacije u dva koraka) i nove teorije nukleacije i rasta kristala.<sup>61</sup>

U radu je opisana nova teorija predložena na temelju *in situ* kombiniranih mjerenja mikroskopom atomskih sila i difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (AFM/PXRD) koja pokazuju da je nukleacija i kristalizacija usklađen proces niza složenih događaja koji uključuju nukleaciju 2D slojeva i širenje.

Razvoj robusnih kristalizacijskih procesa u kojima je moguće kontrolirati distribuciju veličine kristala i nastanak željene kristalne forme zahtjeva mehanističko razumijevanje kristalizacije. Iako se veliki napori i dalje ulažu u razvoj novih metoda praćenja nukleacije i kristalizacije, i dalje ne postoji teorija koja bi jednoznačno objasnila taj proces.

### 2.3.2. Proces kristalizacije

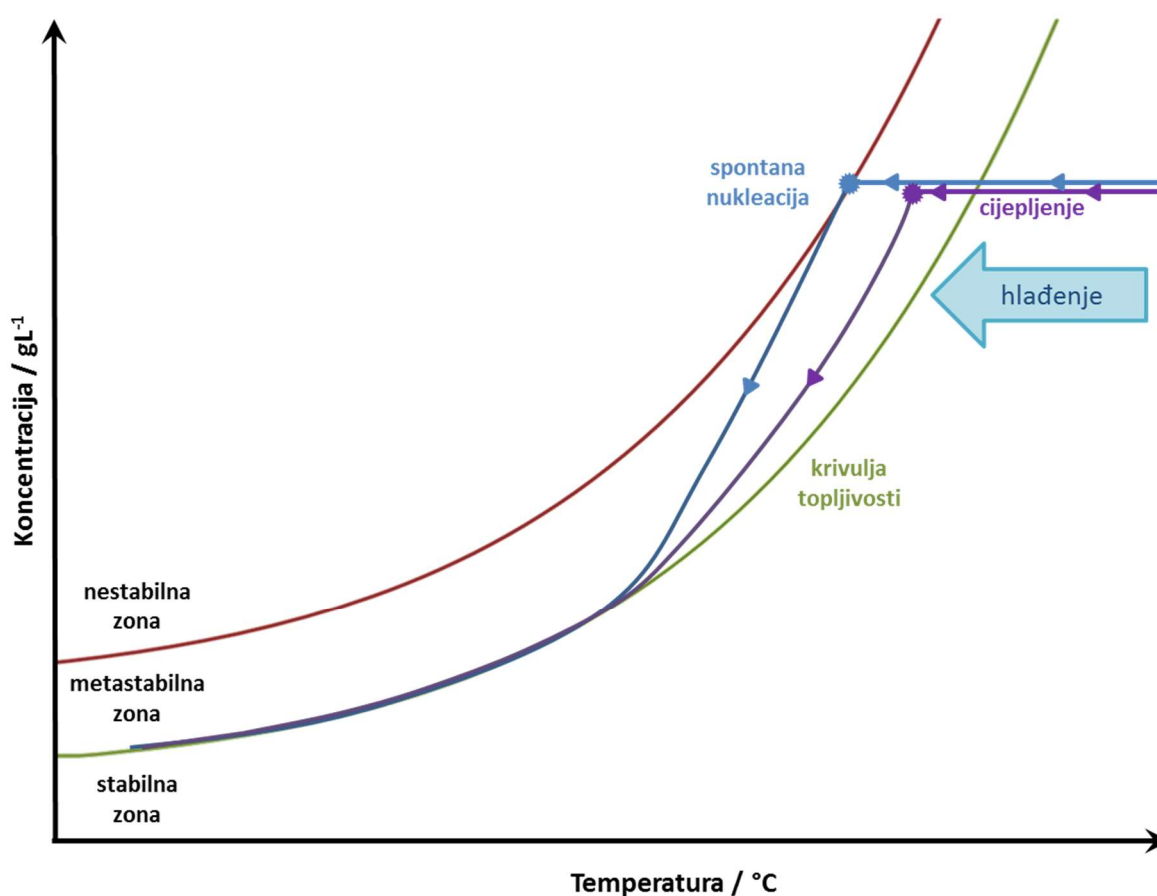
S termodinamičkog stajališta, glavna pokretačka snaga za kristalizaciju ili precipitaciju je promjena kemijskog potencijala između trenutnog i ravnotežnog stanja.<sup>62</sup> Kemijski potencijal teško je mjeriti, ali se može izraziti preko koncentracija te se njegova promjena može prikazati sljedećom aproksimacijom:

$$\Delta\mu = \ln\left(\frac{c}{c^*}\right) \cong \frac{c}{c^*} - 1 = \frac{\Delta c}{c^*} = S - 1 = \sigma \quad (2)$$

gdje je  $\Delta\mu$  promjena kemijskog potencijala,  $c$  trenutna, a  $c^*$  ravnotežna koncentracija.  $S$  predstavlja stupanj prezasićenja, a  $\sigma$  relativno ili apsolutno prezasićenje. Iz praktičnih razloga, prezasićenje se u pravilu izražava kao razlika između trenutne i ravnotežne koncentracije:

$$\Delta c = c - c^* \quad (3)$$

Kao što je ranije objašnjeno, nakon procesa nukleacije slijedi proces rasta kristala koji je energetski favoriziran zbog promjene veličine čestica. Ostwald-Miersov dijagram (Slika 9) prikazuje proces kristalizacije iz otopine.<sup>63</sup>



Slika 9. Ostwald-Miersov dijagram.<sup>63</sup>

Ostwald-Miersov dijagram sastoji se od tri bitne krivulje (zone):

- stabilna (nezasićena) zona u kojoj je kristalizacija nemoguća
- metastabilna (prezasićena) zona u kojoj je spontana kristalizacija malo vjerojatna, ali će se odvijati rast kristala
- nestabilna (prezasićena) zona u kojoj je vrlo vjerojatna spontana nukleacija i u kojoj će se također odvijati rast kristala

Kristalizacija iz otopine može se podijeliti na dva procesa: prvi je nastanak novih kristala (nukleacija) dok je drugi rast postojećih kristala. Oba procesa utječu na distribuciju veličine čestica i na morfologiju dobivenih kristala. Brzina rasta kristala može se izraziti kao brzina pomaka određene površine kristala u smjeru okomitom na plohu kristala. Različiti kristalografski smjerovi kristala u pravilu imaju različite linearne brzine rasta kristala. Rast kristala uključuje dva glavna procesa:

- prijenos molekula iz otopine na površinu kristala procesom difuzije
- integraciju i prostornu orijentaciju molekula u kristalnu rešetku

Brzina rasta kristala ovisi o relativnom prezasićenju, pa tako što je prezasićenje veće, tako će i brzina rasta kristala biti veća a time se povećava i vjerojatnost ulaska raznih onečišćenja u kristalnu rešetku.

Prisutnost onečišćenja (koja je uobičajena prilikom kristalizacije API-a) u kristalizacijskom sustavu u pravilu smanjuje brzinu rasta kristala blokirajući mjesta vezanja molekula na postojeći kristal zbog čega nastaju manji kristali. Ipak, u nekim slučajevima onečišćenja mogu čak i ubrzati rast kristala. Oba slučaja mogu imati veliki utjecaj na morfologiju, ali i nastanak određenog polimorfa.

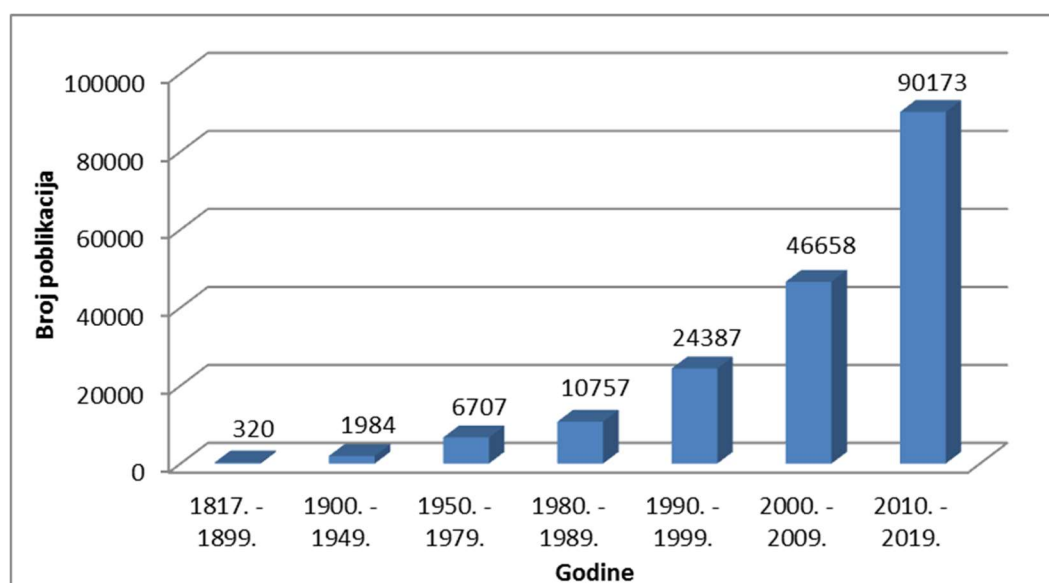
## 2.4. Entakapon

### 2.4.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) progresivni je neurodegenerativni poremećaj koji je prvi puta opisao James Parkinson 1817. godine, a nastaje zbog gubitka ili degeneracije živčanih stanica koje su zadužene za proizvodnju neuroprijenosnika dopamina u dijelu mozga koje se naziva "crna tvar".<sup>64</sup> PB karakterizira poremećaj motoričkih i nemotoričkih funkcija čime se znatno smanjuje kvaliteta života oboljelih (Tablica 6). Trenutno u svijetu živi oko pet milijuna ljudi oboljelih od ove bolesti, te se procjenjuje da će se taj broj do 2030. godine udvostručiti. Zbog sve većeg porasta oboljelih od PB, ulažu se i sve veći naponi u istraživanjima što i prikazuje eksponencijalni rast u broju objavljenih publikacija (Slika 10).<sup>65</sup>

**Tablica 6.** Prikaz motoričkih i nemotoričkih poremećaja uzrokovanih PB.

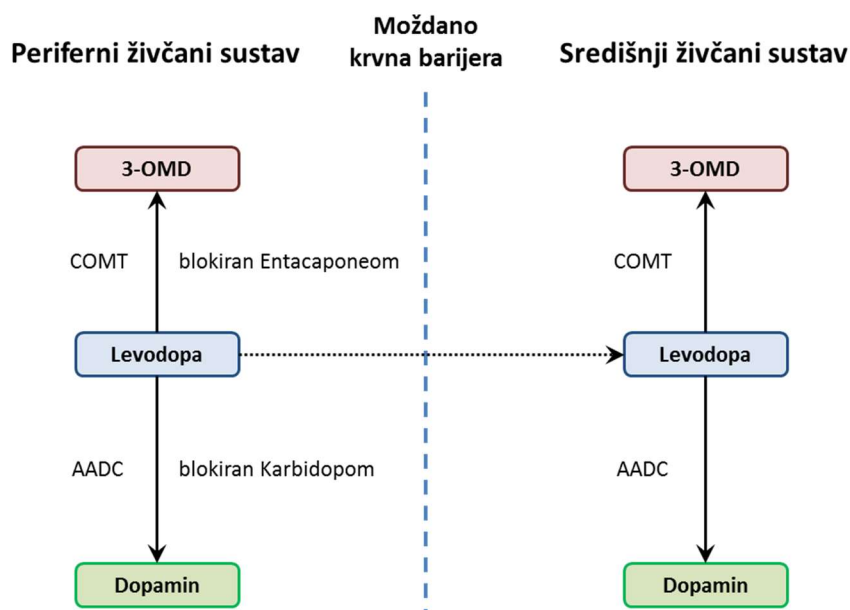
| Motorički poremećaji   | Nemotorički poremećaji   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>bradikinezija</u> (usporene radnje, otežano započinjanje pokreta, blokiranje kretnji, osiromašenje spontanih pokreta, oslabljena mimika lica)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>oštećenje autonomnih funkcija</u> (mokraćna urgencija i inkontinencija, opstipacija, konstipacija, erektilna disfunkcija)</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>rigor</u> (povišen tonus, ukočenost mišića, odnosno povišen otpor mišića pri izvođenju pasivnih kretnji)</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>tegobe sa spavanjem</u> (produljeno dnevno spavanje, nesanica, otežano održavanje sna)</li> </ul>                                    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>akinetički tremor</u> (drhtanje u mirovanju i to najčešće ruku)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>oštećenje njuha</u></li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>gubitak posturalnih refleksa</u> (nemogućnost održavanja posture tijela, nestabilnost u hodu)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>depresija i anksioznost</u></li> </ul>   |
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>oštećenje pažnje i kognitivnih funkcija</u></li> </ul>   |
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>demencija</u></li> </ul>   |
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>halucinacije</u></li> </ul>  |
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>smetnje vida</u></li> </ul>  |

**Slika 10.** Prikaz broja objavljenih publikacija na temu PB u Science Direct online bazi podataka.<sup>65</sup>

### 2.4.2. Liječenje PB i entakapon

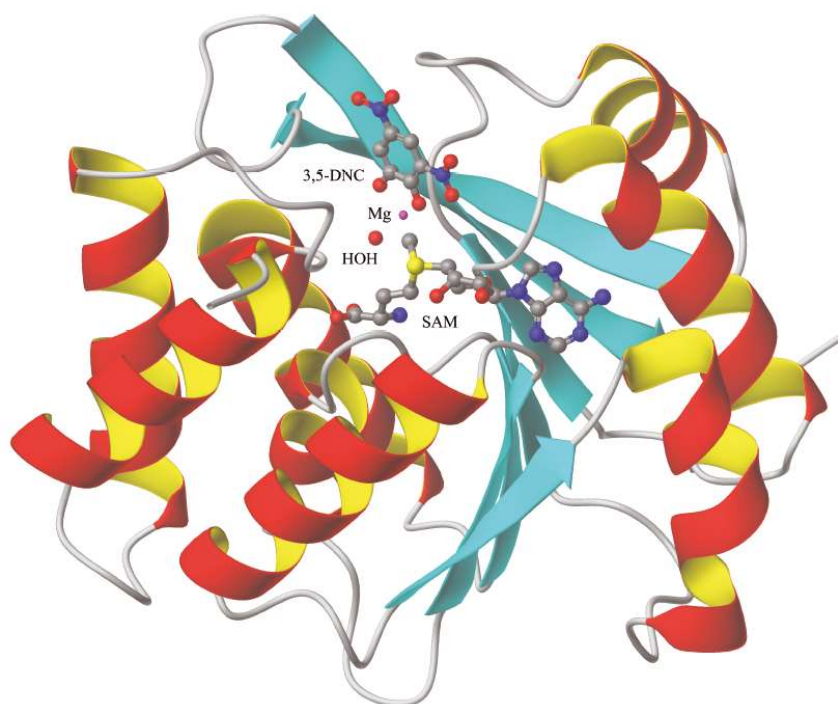
Iako je PB progresivna i još uvijek neizlječiva neurološka bolest, pacijenti ipak reagiraju na terapiju lijekovima koji utječu uglavnom samo na simptome. Levodopa (L-3,4-dihidroksifenilalanin) koristi se kao sredstvo za zamjenu dopamina u liječenju PB, a služi za suzbijanje bradikinetskih simptoma koji su vidljivi u PB. Najnoviji podaci pokazuju da levodopa može usporiti napredovanje PB čak i nakon prestanka primjene lijeka.

Za razliku od dopamina, levodopa prolazi barijeru između mozga i krvi. Jednom kad je levodopa ušla u središnji živčani sustav, enzim dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (AADC) prevodi levodopu u dopamin. Kod ljudi ta transformacija se ne odvija samo u središnjem živčanom sustavu, već i u perifernom pri čemu može doći do ozbiljnih nuspojava prilikom uzimanja levodope. Da se suzbije taj efekt uz levodopu se uzima inhibitor AADC, karbidopa. Uz DOPA dekarboksilazu, u tijelu je prisutan enzim katehol-*O*-metil-transferaza (COMT.) koji prevodi levodopu u 3-*O*-metildopu (3-OMD) što uvelike smanjuje njezinu bioraspodjeljivost (Slika 11).<sup>66–68</sup>



**Slika 11.** Metabolizam dopamina u perifernom i središnjem živčanom sustavu.<sup>66–68</sup>

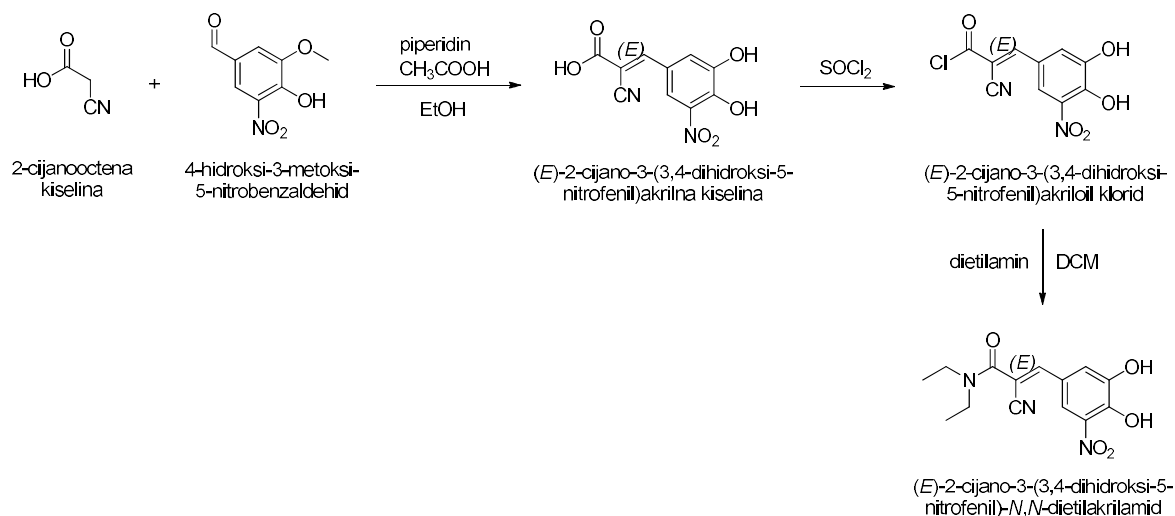
Entakapon ((*E*)-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietilakrilamid) je inhibitor katehol-*O*-metil-transferaze (Slika 12) te se zajedno s kombinacijom levodope i karbidope koristi u liječenju simptoma PB. Entakapon, kao ni karbidopa, nema utjecaja na liječenje simptoma PB nego omogućuje duže zadržavanje levodope u organizmu koja uvelike pomaže u smanjenju utjecaja bolesti na motoričke i misaone sposobnosti oboljelih pacijenata.<sup>69</sup>



Slika 12. Model strukture ljudskog COMT enzima.<sup>70</sup>

### 2.4.3. Sinteza entakapona

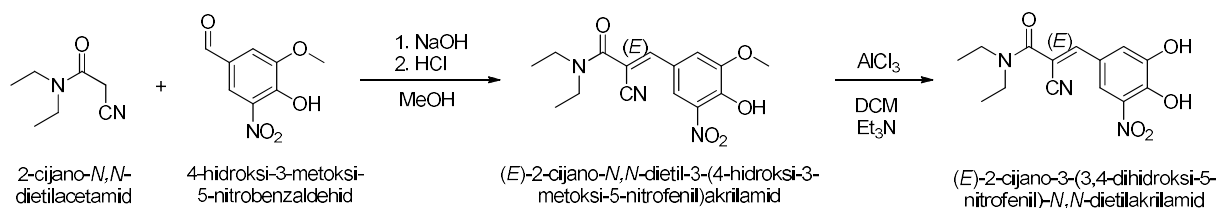
Proces pripreve entakapona je objavljen u nekoliko bitnijih patentnih prijava te u par znanstvenih radova. Srikanth i suradnici<sup>71</sup> predložili su sintezu entakapona polazeći iz 2-cijanooctene kiseline i 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehida pri čemu nakon Knoevenagelove kondenzacije nastaje (*E*)-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilna kiselina koja se pomoću tionil-klorida prevodi u kiselinski klorid. U posljednjem stupnju kiselinski klorid reagira s dietilaminom pri čemu se dobiva entakapon (Shema 1).



Shema 1. Sinteza entakapona prema radu Srikanth *et al.*<sup>71</sup>

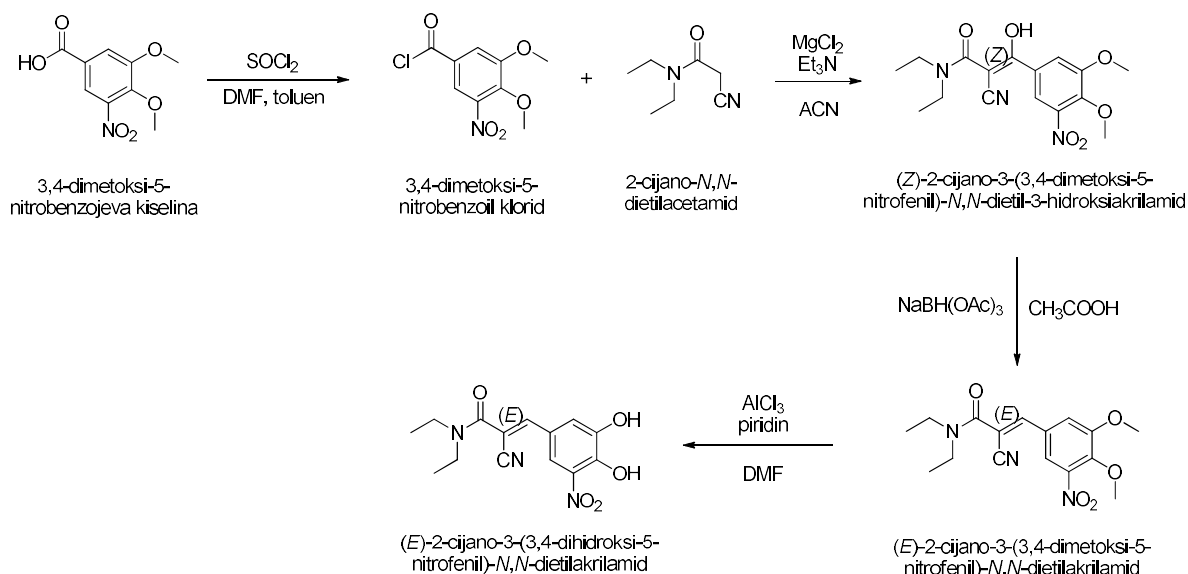


Sinteza entakapona prema patentima Mantegazze i suradnika, Chittora i suradnika te Chinnapillaja i suradnika<sup>72-74</sup> sastoji se od dva koraka, polazeći od 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehida i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida koji u Knoevenagelovoj kondenzaciji daju (*E*)-2-cijano-*N,N*-dietil-3-(4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrofenil)akrilamid. U posljednjem se koraku *O*-demetiliranjem 3-metoksi-skupine s aluminijevim(III)-kloridom ( $\text{AlCl}_3$ ) dobiva entakapon (Shema 2) u iskorištenju od 84 %.

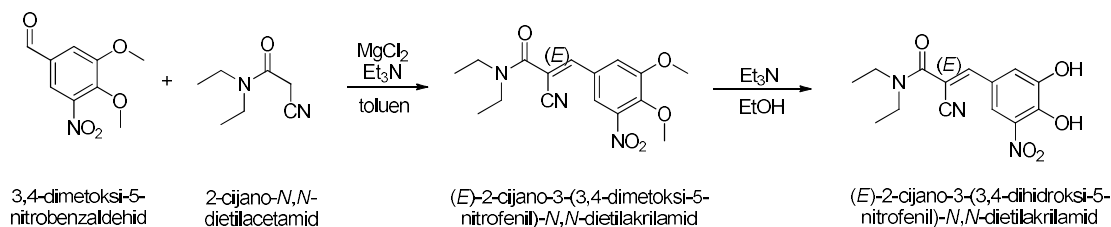


**Shema 2.** Sinteza entakapona prema patentima Mantegazza *et. al.*, Chittor *et. al.*, Chinnapillai *et al.*<sup>72-74</sup>

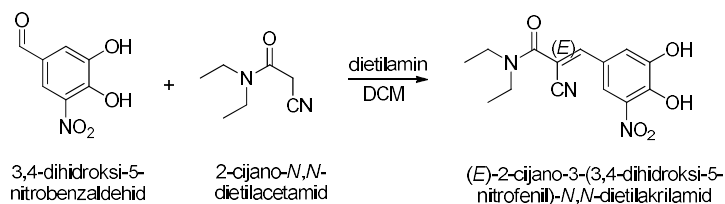
U patentu Sanmartija i suradnika<sup>75</sup>, sinteza entakapona je opisana u četiri koraka polazeći od 3,4-dimetoksi-5-nitrobenzojeve kiseline koja se uz tionil-klorid prevodi u kiselinski klorid koji u Knoevenagelovoj kondenzaciji s 2-cijano-*N,N*-dietilacetamidom daje (*Z*)-2-cijano-3-(3,4-dimetoksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietil-3-hidroksiakrilamid. U sljedećem koraku, redukcijom s natrijevim acetoksiborhidridom dobiva se (*E*)-2-cijano-3-(3,4-dimetoksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietilakrilamid. U posljednjem koraku *O*-demetiliranjem dviju metoksi-skupina pomoću aluminijevog(III) klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) nastaje entakapon (Shema 3). Navedeno ukupno iskorištenje kroz 4 koraka iznosi 66 %.

Shema 3. Sinteza entakapona prema Sanmarti *et al.*<sup>75</sup>

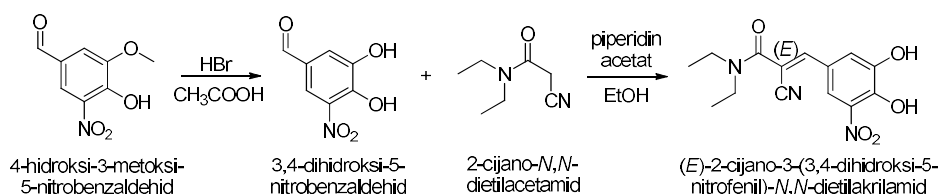
Harisha i suradnici<sup>76</sup> opisuju sintezu entakapona u dva koraka polazeći iz 3,4-dimetoksi-5-nitrobenzaldehida i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida pri čemu se Knoevenagelovom kondenzacijom dobiva (E)-2-cijano-3-(3,4-dimetoksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietilakrilamid. U posljednjem koraku *O*-demetiliranjem dviju metoksi-skupina s trietilaminom ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) nastaje entakapon (Shema 4) u ukupnom iskorištenju od 63 %.

Shema 4. Sinteza entakapona prema radu Harisha *et al.*<sup>74</sup>

U patentima Chittora i suradnika te Hytönera i suradnika,<sup>73, 77</sup> sinteza entakapona je opisana u samo jednom koraku (Shema 5), Knoevenagelovom kondenzacijom 3,4-dihidroksibenaldehida i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida uz iskorištenje od 90 %.

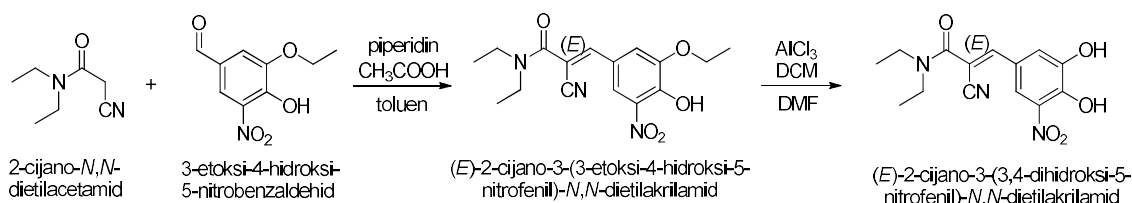
Shema 5. Sinteza entakapona prema patentima Chittor *et al.*, Hytönen *et al.*<sup>73, 77</sup>

Patenti Backstorma i suradnika te Deshpanda i suradnika<sup>78, 79</sup> opisuju sintezu iz 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehida koji se *O*-demetiliranjem 3-metoksi-skupine pomoću bromovodične kiseline (HBr) prevodi u 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyd. Posljednji korak je Knoevenagelova kondenzacija s 2-cijano-*N,N*-dietilacetamidom pri čemu je dobiven entakapon (Shema 6) uz ukupno iskorištenje od 73 %.



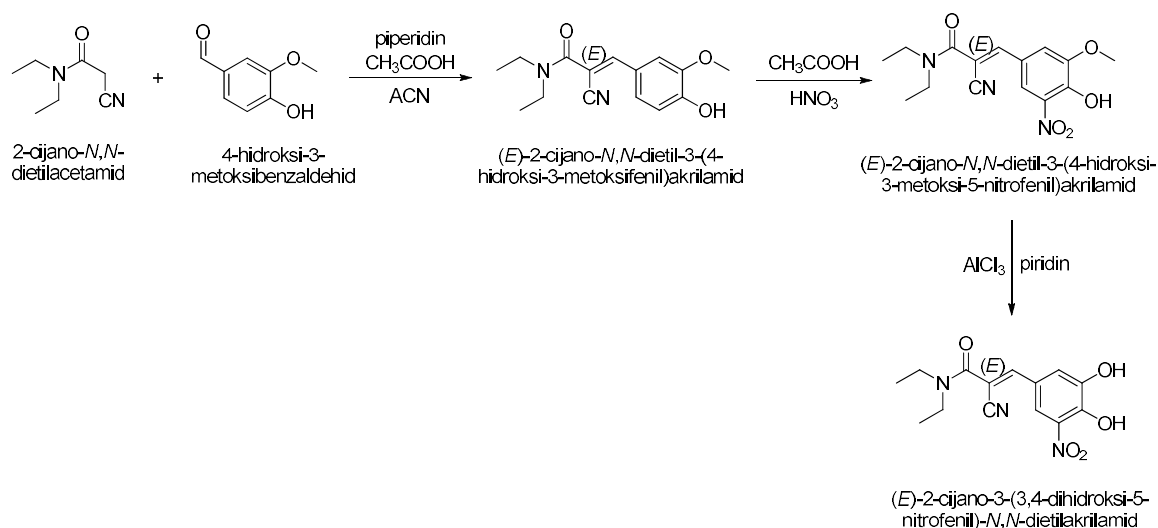
**Shema 6.** Sinteza entakapona prema patentima Backstorm *et al.*, Deshpande *et al.*<sup>78, 79</sup>

Sinteza entakapona prema patentu Arave i suradnika predložena je u dva koraka, polazeći od 3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrobenzaldehida i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida koji u Knoevenagelovoj kondenzaciji daju (*E*)-2-cijano-*N,N*-dietil-3-(3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrofenil)akrilamid.<sup>80</sup> U posljednjem koraku *O*-deetiliranjem 3-etoksi-skupine s aluminijev(III)-kloridom ( $\text{AlCl}_3$ ) dobiva se entakapon (Shema 7) u ukupnom iskorištenju od 72 %.



**Shema 7.** Sinteza entakapona prema patentu Arava *et al.*<sup>80</sup>

Prema patentu Cziakya entakapon je sintetiziran u tri koraka.<sup>81</sup> Prvi korak uključuje Knoevenagelovu kondenzaciju 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehyda i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida pri čemu se dobiva (*E*)-2-cijano-*N,N*-dietil-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamid koji se u sljedećem koraku nitriranjem prevodi u (*E*)-2-cijano-*N,N*-dietil-3-(4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrofenil)akrilamid. U posljednjem koraku *O*-demetiliranjem 3-metoksi-skupine dobiven je entakapon (Shema 8) u iskorištenju od 48,4 %.



Shema 8. Sinteza entakapona prema patentu Cziaky.<sup>81</sup>

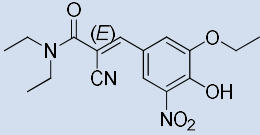
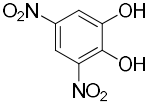
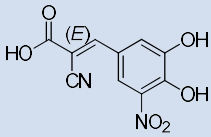
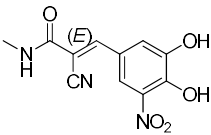
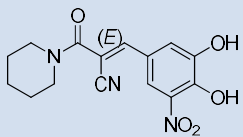
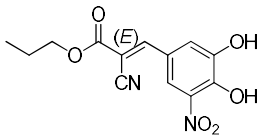
#### 2.4.4. Onečišćenja prisutna u entakaponu

Na temelju različitih puteva sinteze i mogućih paralelnih reakcija američka i europska organizacija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*; EMEA i engl. *U.S. Food and Drug Administration*; FDA) u svojim su farmakopejama (engl. *European Pharmacopeia*; Eu.Ph. i engl. *United States Pharmacopeia*; USP) definirale najčešća onečišćenja koja mogu biti prisutna u finalnom obliku entakapona (Tablica 7).<sup>82, 83</sup>

Tablica 7. Prikaz definiranih onečišćenja entakapona prema Eu. Ph i USP.<sup>82, 83</sup>

| Struktura | Ime  | Onečišćenje prema Eu. Ph. <sup>82</sup> | Onečišćenje prema USP <sup>83</sup> |
|-----------|--|---|-------------------------------------|
|           | ( <i>Z</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dietilakrilamid | Onečišćenje A                           | Onečišćenje A                       |
|           | ( <i>E</i> )-etil-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilat                  | Onečišćenje B                           | -                                   |
|           | 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyd  | Onečišćenje C                           | -                                   |

Tablica 7. (nastavak) Prikaz definiranih onečišćenja entakapona prema Eu. Ph i USP.<sup>82, 83</sup>

| Struktura   | Ime   | Onečišćenje prema Eu. Ph. <sup>82</sup> | Onečišćenje prema USP <sup>83</sup> |
|---|---|---|-------------------------------------|
|    | ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dietilakrilamid | Onečišćenje D                           | -                                   |
|    | 3,5-dinitrobenzen-1,2-diol  | Onečišćenje E                           | -                                   |
|    | ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilna kiselina                   | Onečišćenje F                           | -                                   |
|   | ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)- <i>N</i> -metilakrilamid         | Onečišćenje G                           | -                                   |
|  | ( <i>E</i> )-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-2-(piperidin-1-karbonil)akrilonitril       | Onečišćenje H                           | -                                   |
|  | ( <i>E</i> )-propan-1-il-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilat                | Onečišćenje I                           | -                                   |

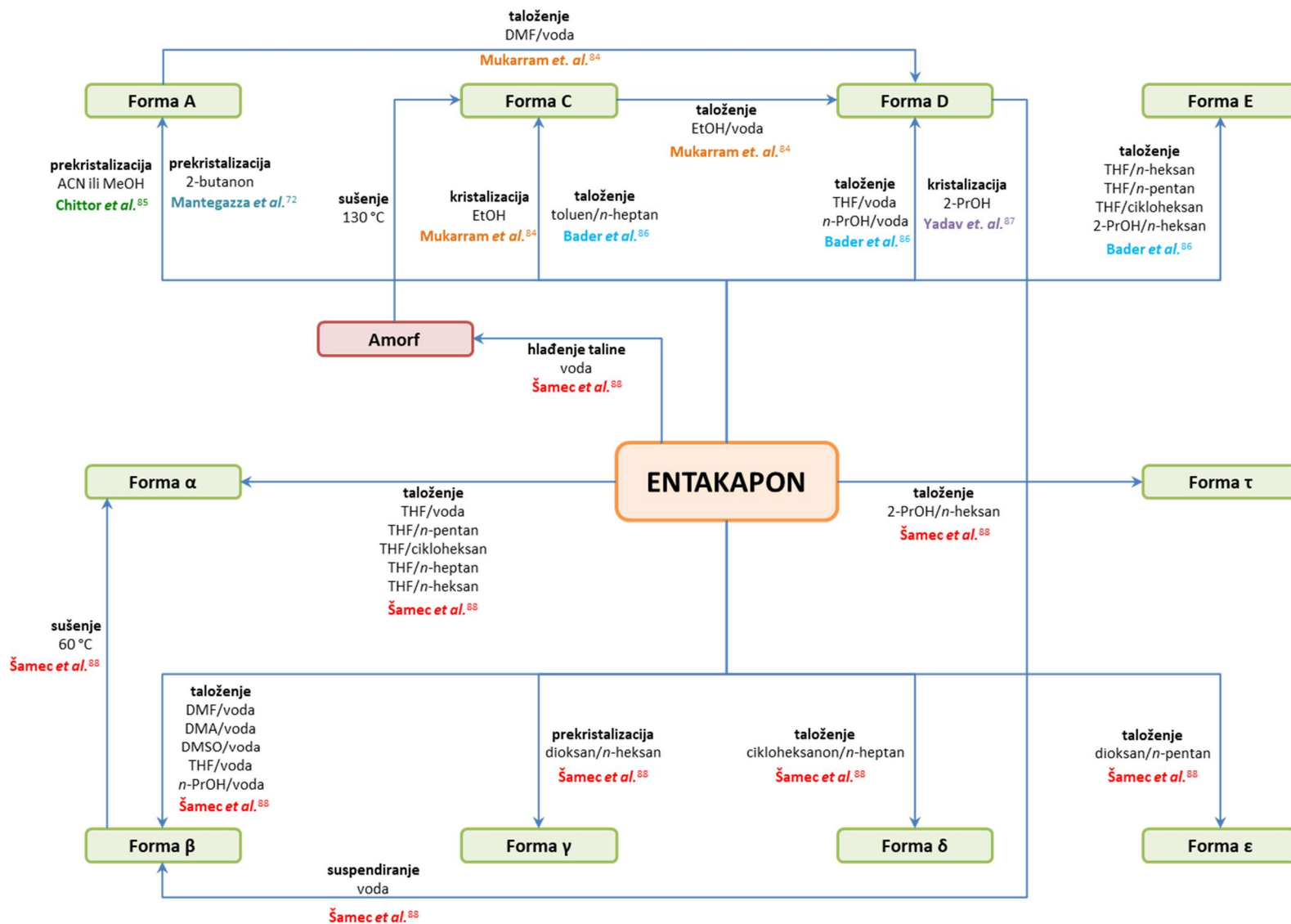
Farmaceutske kompanije dužne su pratiti navedena onečišćenja ili dokazati da ne mogu biti prisutna kako u djelatnoj tvari tako i u gotovom obliku lijeka.

#### 2.4.5. Poznate kristalne forme entakapona

U literaturi je do sada poznato 10 različitih kristalnih formi entakapona te je dobiven i amorf (Tablica 8, Slika 13).<sup>72, 84 – 88</sup>

Tablica 8. Prikaz i karakterizacija poznatih formi entakapona.<sup>70, 82 – 86</sup>

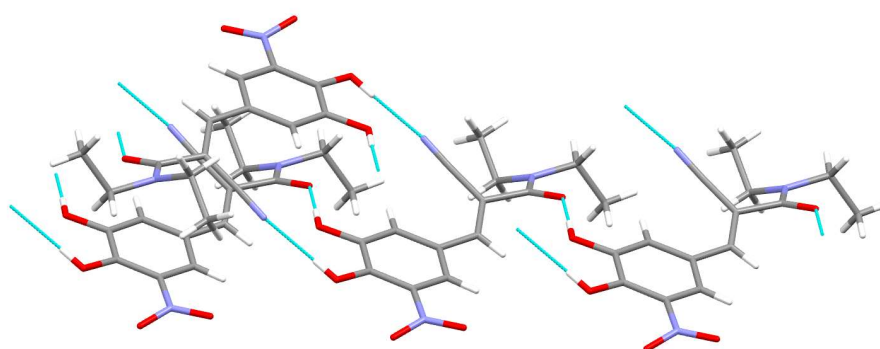
| Forma      | Literatura                              | Karakterizacija   |           |
|------------|---|---|-----------|
|            |   | XRD / $2\theta$ °   | DSC / °C  |
| A          | Mukarram <i>et. al.</i> <sup>84</sup>   | 3,7, 9,0, 11,8, 13,5, 14,1, 15,8, 16,3, 18,2,                       | -         |
|            | Chittor <i>et. al.</i> <sup>85</sup>    | 18,5, 18,7, 18,9, 20,0, 20,4, 21,1, 21,9,                           |           |
|            | Mantegazza <i>et. al.</i> <sup>72</sup> | 22,9, 23,3, 24,0, 24,5, 26,3  |           |
| C          | Mukarram <i>et. al.</i> <sup>84</sup>   | 5,6, 11,4, 14,8, 17,2, 18,8, 20,9, 23,1, 25,2,                      | 156 – 160 |
|            | Bader <i>et. al.</i> <sup>86</sup>      | 26,9, 29,0, 32,2  |           |
| D          | Mukarram <i>et. al.</i> <sup>84</sup>   | 6,8, 11,8, 12,1, 13,5, 14,8, 15,6, 16,5, 16,9,                      | 158 – 162 |
|            | Bader <i>et. al.</i> <sup>86</sup>      | 18,0, 18,8, 19,1, 20,7, 21,4, 22,2, 23,4,                           |           |
|            | Yadav <i>et. al.</i> <sup>87</sup>      | 24,0, 24,6, 25,3, 26,5, 27,4, 28,1, 29,2,<br>30,0                   |           |
| E          | Bader <i>et. al.</i> <sup>86</sup>      | 6,6, 8,9, 12,4, 12,9, 13,4, 14,4, 15,5, 17,9,                       | -         |
|            |   | 18,3, 19,2, 20,5, 21,1, 21,9, 22,5, 22,9,<br>24,0, 24,6, 25,9, 27,3 |           |
| $\alpha$   | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | 6,7, 12,5, 13,1, 13,6, 13,8, 15,7, 18,0, 18,4,<br>24,7, 26,1        | 164       |
| $\beta$    | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | 6,5, 12,9, 15,8, 16,6, 17,2, 19,5, 20,1, 21,9,<br>24,0, 27,5        | 163       |
| $\gamma$   | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | 6,2, 10,2, 12,2, 12,5, 16,4, 16,9, 19,4, 21,3,<br>21,7, 23,4        | 164       |
| $\delta$   | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | 5,9, 13,5, 13,8, 14,1, 14,7, 15,0, 17,8, 18,2,<br>20,3, 21,5        | 163       |
| $\epsilon$ | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | 10,5, 14,2, 14,4, 19,2, 24,3  | -         |
| $\tau$     | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | -   | -         |
| amorf      | Šamec <i>et. al.</i> <sup>88</sup>      | -   | -         |



Slika 13. Prikaz poznatih formi entakapona i načini njihovih priprava poznatih iz patentne literature.<sup>72, 84 – 88</sup>

### 2.4.5.1. Entakapon forma A

Priprava i kristalna struktura termodinamički najstabilnije forme entakapona, forme A, opisana je u radu Leppänen *et al.*<sup>89</sup> Ova forma kristalizira u triklinskom sustavu, u centrosimetričnoj prostornoj grupi  $P1\bar{1}$ . U asimetričnoj jedinici nalazi se jedna molekula entakapona. Dvije hidroksilne skupine djeluju kao donori za  $O-H\cdots O_{\text{karbonil}}$  i  $O-H\cdots N_{\text{cijano}}$  intermolekulske vodikove veze s dvije susjedne molekule, a cijano- i karbonilna skupina djeluju kao akceptori vodikovih veza s također dvije susjedne molekule. Na ovaj način jedna je molekula entakapona povezana s tri susjedne molekule (Slika 14) te se povezuju u beskonačni 1D lanac. Između lanaca djeluju slabe disperzne interakcije i slabe  $C-H\cdots O_{\text{nitro}}$  vodikove veze.



Slika 14. Prikaz povezivanja molekula entakapona u kristalnoj strukturi forme A.<sup>89</sup>

## 2.5. Utjecaj onečišćenja na ishod kristalizacije

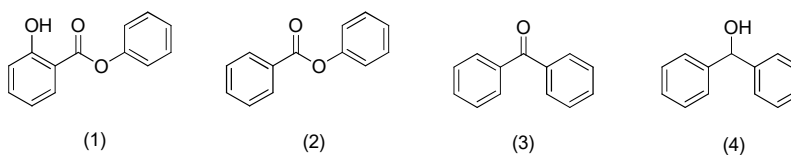
Postupci kristalizacije iz otopine u pravilu se razmatraju kao binarni sustavi koji se sastoje od otapala i otopljenih molekula. U realnim sustavima, različite komponente kao što su aditivi i onečišćenja mogu biti prisutne u malim količinama. Te komponente mogu značajno utjecati na procese kristalizacije, pa čak i kad su prisutne u niskim udjelima u kristalizacijskim sustavima.<sup>90</sup> –<sup>94</sup> Razumijevanje mehanizama kojima će onečišćenja i aditivi utjecati na rast kristala osnova je za dizajn i kontrolu procesa kristalizacije. Kontrola onečišćenja u farmaceutskoj industriji osobito je važna jer takvi spojevi mogu biti toksični ili mogu nepovoljno utjecati na kristalizaciju željenog proizvoda.<sup>95, 96</sup>

Onečišćenja mogu utjecati na kristalizacijski proces na nekoliko načina. Na primjer, topljivost produkta se zbog prisutnosti drugih tvari može promijeniti zbog promjene energije na granici otopljene tvari i otapala. Zahvaljujući tome, topljivost produkta može se smanjiti ili povećati zbog prisutnosti različitih iona.<sup>90</sup> Isto tako, onečišćenja mogu utjecati na proces



nukleacije mijenjajući površinsku energiju, i/ili različite kinetičke faktore ili jednostavno mogu poslužiti kao centri kristalizacije.

U literaturi se većina radova temelji na utjecaju različitih onečišćenja, iona ili aditiva, na procese kristalizacije anorganskih i organskih kristala te na morfologiju dok tek manji broj radova opisuje utjecaj na polimorfiju API-a. U radu Fiebig *et al.* praćen je utjecaj aditiva i strukturno sličnih spojeva (Slika 15) na morfologiju dobivenih kristala fenil-salicilata.<sup>97</sup>



**Slika 15.** Strukturne formule molekula fenil-salicilata (1) te strukturno sličnih spojeva, fenil-benzoata (2), benzofenona (3) i benzohidrola (4).

Na temelju dobivenih podataka, pronađen je vrlo veliki utjecaj fenil-benzoata na morfologiju tj. dobiveni su izduženi kristali uzduž c-kristalografske osi zahvaljujući ubrzanom rastu koji s porastom udjela fenil-benzoata (1 – 16 mol %) postaju sve izduženiji. Iz provedenih mjerenja, postavljen je model kojim je moguće predvidjeti morfologiju kristala fenil-salicilata u prisutnosti fenil-benzoata, benzofenona i benzohidrola.

Capellades *et al.* opisuju utjecaj onečišćenja na kinetičke parametre nukleacije i rasta kristala u MSMPR kristalizaciji sirovog i pročišćenog ciprofloksacin hidroklorida.<sup>98</sup> Rezultati su pokazali povećanje topljivosti i smanjenje ovisnosti distribucije veličine čestica kod sirovog materijala koji sadrži oko 60 nepoznatih onečišćenja. Procjena kinetičkih parametara otkrila je da, iako prisutna onečišćenja nisu utjecala na brzinu sekundarne nukleacije, koeficijent brzine rasta i energija aktivacije rasta su značajno inhibirani. Utjecaj prisutnosti onečišćenja na iskorištenje je minimalan, ali unatoč tome, srednja vrijednost veličine čestica jako ovisi o preciznom predviđanju ustaljenog stanja te je usko povezana sa određivanjem kinetičkih parametara za sirovi API.

Utjecaj prisutnosti različitih aminokiselina (L-Asp, L-Glu, D-Asp, D-Glu, DL-Asp i DL-Glu) na ishod kristalizacije glicina promatran je u radu Poornachary *et al.*<sup>99</sup> U otopinu glicina su dodane različite količine navedenih aminokiselina (u rasponu masenih udjela od 0,5 – 6 %) pri različitim prezasićenjima u uvjetima nastanka metastabilne forme, forme  $\alpha$ . Dok pri niskim masenim udjelima dodanih onečišćenja (0,5 %) nije uočen utjecaj na nastanak forme  $\alpha$ , pri

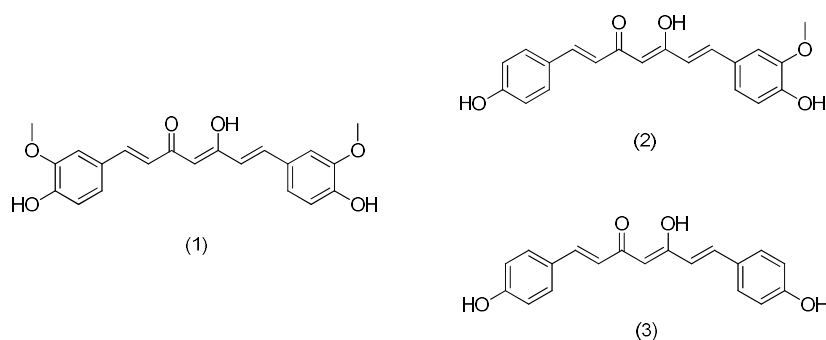
većim količinama dodanih onečišćenja, dobivena je termodinamički najstabilnija forma, forma  $\gamma$  ili smjesa formi  $\alpha$  i  $\gamma$  (Tablica 9).

**Tablica 9.** Utjecaj prisutnosti različitih količina onečišćenja na ishod kristalizacije glicina.<sup>99</sup>

| Onečišćenje | Maseni udio onečišćenja ( <i>w</i> ) | Dobiveni polimorf   |
|-------------|--------------------------------------|---------------------|
| L-Asp       | 0,5 %                                | $\alpha$            |
| L-Glu       | 2 %                                  | $\alpha$ i $\gamma$ |
| D-Glu       | 4 %                                  | $\gamma$            |
| L-Asp       | 4 %                                  | $\alpha$ i $\gamma$ |
| L-Asp       | 6 %                                  | $\gamma$            |

Utjecaj onečišćenja postaje izraženiji što je stupanj prezasićenja veći, pa tako pri nižim prezasićenjima u prisutnosti L-Glu nastaje ili čista metastabilna forma  $\alpha$  ili smjesa formi  $\alpha$  i  $\gamma$  dok pri višim prezasićenjima nije moguće dobiti čistu formu  $\alpha$ , već smjesu formi  $\alpha$  i  $\gamma$  ili čistu formu  $\gamma$ . Utjecaj onečišćenja je objašnjen inhibicijom nukleacije i inhibicijom rasta kristala pri čemu su onečišćenja uglavnom utjecala na brzinu rasta uzduž najbrže rastuće plohe.

U radu Heffernana i suradnika promatran je utjecaj strukturno sličnih onečišćenja, demetoksikurkumina i bis(demetoksi)kurkumina (Slika 16) na primarnu nukleaciju kurkumina ((1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion)) u prisutnosti različitih količina navedenih onečišćenja.<sup>100</sup>

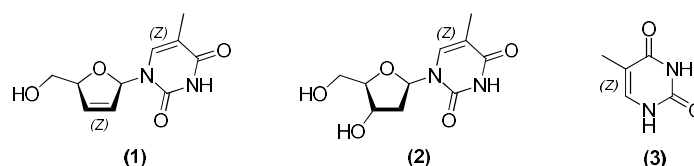


**Slika 16.** Strukturna formula molekula kurkumina (1) i strukturno sličnih onečišćenja, demetoksikurkumina (2) i bis(demetoksi)kurkumina (3).

Eksperimentalni podaci pokazuju da oba onečišćenja produžuju vrijeme nukleacije, pogotovo pri nižim stupnjevima prezasićenja. Iako su ispitivanja provedena u prisutnosti različitih količina onečišćenja, nije opažen pravilan trend utjecaja na brzinu nukleacije. Dodatnom

analizom utvrđeno je da su interakcije između molekula demetoksikurkumin-kurkumin i bis(demetoksi)kurkumin-kurkumin jače nego interakcije između dvije molekule kurkumina. Prema tome, u početku nukleacijskog procesa, vjerojatno je da se molekule kurkumina vežu na onečišćenje te je potrebno prevladati određenu energetska barijeru da se uklone molekule onečišćenja čime se produžuje vrijeme nukleacije.

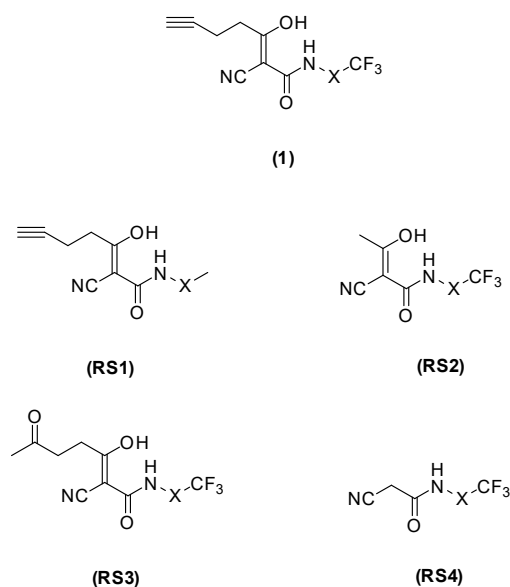
Mirmehrabi i suradnici u svojem radu opisuju utjecaj otapala, onečišćenja, prezasićenja i miješanja na ishod kristalizacije antivirusnog lijeka stavuidina koji se koristi u liječenju bolesnika oboljelih od HIV-a.<sup>101</sup> U literaturi su poznata dva polimorfa, stabilnija forma 1 i metastabilna forma, forma 2. Ispitan je utjecaj dva glavna onečišćenja (timina i timidina, Slika 17) na rast kristala i polimorfiju stavuidina pri masenim udjelima od 0,25 – 1 %.



**Slika 17.** Strukturne formule molekula stavuidina (1) i glavnih onečišćenja, timidina (2) i timina (3).

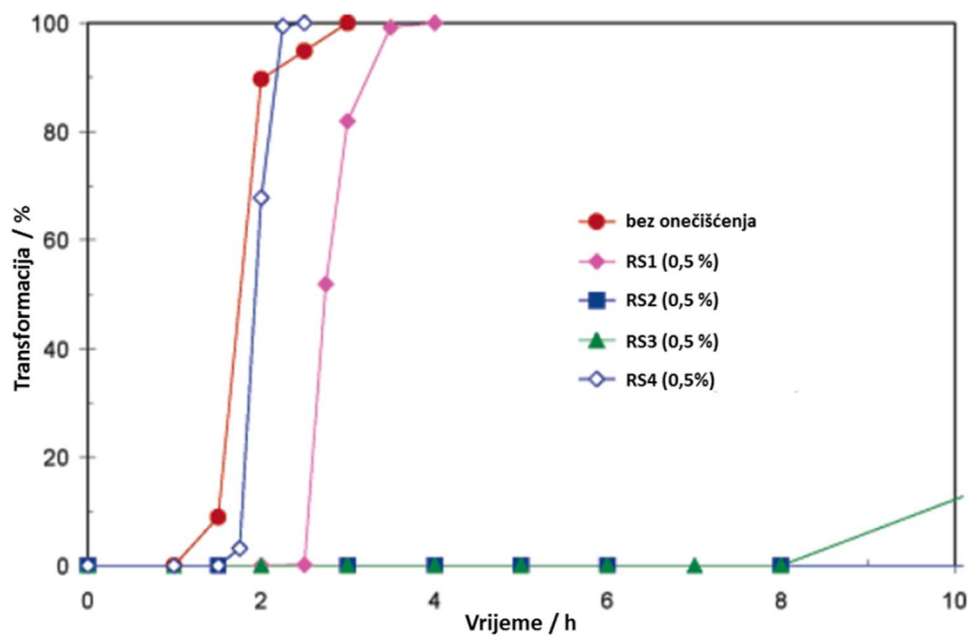
Iako u radu nije opažen utjecaj onečišćenja na polimorfiju, opažen je znatan utjecaj timina na morfologiju kristala. Interakcija između timina i stavuidina inhibira rast najbrže rastuće plohe što ima izravan utjecaj na mješljivost i filtrabilnost dobivene suspenzije.

U radu Mukute i suradnika. ispitivan je utjecaj strukturno sličnih onečišćenja na faznu transformaciju iz metastabilne forme A API-a u stabilniju formu B u masenim udjelima onečišćenja od 1 – 5 % (Slika 18).<sup>102</sup>



**Slika 18.** Strukturne formule molekula ispitivanog API-a (1) i strukturno sličnih onečišćenja (RS1 – 4).

Rezultati pokazuju velik utjecaj onečišćenja RS2 na transformaciju iz metastabilne forme A u stabilniju formu B. Dok onečišćenja RS1 i RS4 imaju vrlo mali utjecaj na brzinu transformacije, RS3 snažno inhibira prijelaz, a RS2 ga potpuno zaustavlja (Slika 19).



**Slika 19.** Utjecaj onečišćenja na fazni prijelaz API-a pri 30 °C.<sup>102</sup>

Prijelaz iz forme A u formu B moguć je zahvaljujući razlici u topljivostima između navedenih formi i to već pri masenim udjelima od 0,1 %. Kinetička stabilizacija metastabilne forme u prisutnosti onečišćenja rezultat je poremećene nukleacije i kristalnog rasta i povećane topljivosti forme B čime se znatno smanjuje razlika u topljivostima a time i mogućnost samog prijelaza. Taj se efekt može objasniti usporedbom struktura molekula API-a i onečišćenja RS-2 i RS-3 koje su slične te mogu ući u strukturu kristalne rešetke.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

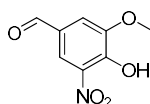
### 3.1. Materijali

Prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela ovog rada, korišteni su sljedeći materijali:

- Tetrahidrofuran (THF, min. 99,5 %), Kemika.
- *n*-heksan (min. 99,0 %), Kemika.
- Aceton (min. 99,5 %), Kemika.
- Metanol (MeOH, min. 99,8 %), Kemika.
- Apsolutni etanol (aps. EtOH, min. 99,8 %), Kemika.
- Diizopropil eter (min. 99,0 %), Kemika.
- Toluen (min. 99,5 %), Kemika.
- Dietil eter (min. 99,8 %), Kemika.
- *N,N*-dimetilformamid (DMF, min. 99,5 %), Kemika.
- Cikloheksanon (min. 99,5 %), Kemika.
- *n*-heptan (min. 99,0 %), Kemika.
- 2-propanol (2-PrOH, min. 99,8 %), Kemika.
- Octena kiselina, otporna prema kromnoj kiselini (HOAc, min. 99,5 %), Kemika.
- Dušična kiselina (HNO<sub>3</sub>, min. 65,0 %), Kemika.
- Klorovodična kiselina (HCl, min. 36,5 %), Kemika.
- Bromovodična kiselina (HBr, min. 47,0 %), Kemika.
- Cinkov klorid, suhi (ZnCl<sub>2</sub>, min 98,0 %), Kemika.
- Amonijev acetat (min. 98,0 %), Kemika.
- Cijanooctena kiselina (min 97,0 %), Acros Organics.
- Piperidin (min. 99,0 %), Aldrich.
- Tionil-klorid (min. 99,0 %), Aldrich.
- 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid (min. 99,0 %), Aldrich.
- 3-etoksi-4-hidroksibenzaldehid (min 99,0 %), Aldrich.
- 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyd (min. 98,0 %), Ramdev Chemical
- 2-metoksifenol (min. 98,0 %), Aldrich.
- *N,N*-dietilcijanoacetamid (min. 97,0 %), Ramdev Chemical

Čistoća sintetiziranih spojeva određena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti prema metodi opisanoj u odjeljku 3.22. i izražena je kao udio površine signala u postotcima.

### 3.2. Postupak pripreve 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehyda (1)



#### 3.2.1. Priprava spoja 1

4-hidroksi-3-metoksibenzaldehyd (20 g; 131,4 mmol) je otopljen u octenoj kiselini (200 mL). Otopina je ohlađena na 10 – 15 °C te je dokapana 65 % dušična kiselina (10,5 mL; 152,7 mmol) kroz 30 min. Reakcijska smjesa je miješana 30 min na 10 – 15 °C, zatim je zagrijana na 20 – 25 °C te miješana još 30 min. Dobivena suspenzija je profiltrirana, vlažni kristali su isprani s vodom (3 × 20 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C i tlaku od 10 mbar 16 h (20,28 g; iskorištenje 78,3 %; kromatografska čistoća: 100,00 A%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 9,87 (s, 1H, H-C-10), 8,09 (d, 1H, *J*=1,8 Hz, H-C5), 7,62 (d, 1H, *J*=1,6 Hz, H-C3), 3,96 (s, 3H, H-C9).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 190,42 (s, C-10), 150,03 (s, C-2), 147,73 (s, C-1), 137,04 (s, C-6), 126,81 (s, C-4), 120,87 (s, C-5), 112,52 (s, C-3), 56,78 (s, C-9).

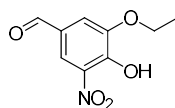
IR  $\nu_{\max}$ /cm<sup>-1</sup>: 3192, 2984, 1683, 1610, 1575, 1548, 1464, 1399, 1366, 1334, 1266, 1229, 1189, 1162, 1099, 1046, 916, 872, 817, 782, 751, 698, 624, 587, 544, 497, 449, 434, 428, 419.

DSC *t*/°C: 176,08

#### 3.2.2. Priprava monokristala spoja 1

Spoj 1 (200 mg) je otopljen u acetonu (10 mL) te je otopina ostavljena stajati na sobnoj temperaturi u zatvorenoj bočici da otapalo polagano hlapi. Nakon 10 dana u bočici je nađen monokristal čija je struktura snimljena metodom difrakcije rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.

### 3.3. Postupak pripreve 3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrobenzaldehida (2)



#### 3.3.1. Priprava spoja 2

3-etoksi-4-hidroksibenzaldehyd (20 g; 120,4 mmol) je otopljen u octenoj kiselini (200 mL). Otopina je ohlađena na 10 – 15 °C te je dokapana 65 % dušična kiselina (10,4 mL; 151,3 mmol) kroz 30 min. Reakcijska smjesa je miješana 30 min na 10 – 15 °C, zatim je zagrijana na 20 – 25 °C te miješana još 30 min. Dobivena suspenzija je profiltrirana, vlažni kristali su isprani s vodom (3 × 20 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C i tlaku od 10 mbar 16 h (20,41 g; iskorištenje: 80,3 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 9,86 (s, 1H, H-C-11), 8,08 (d, 1H, *J*=1,8 Hz, H-C5), 7,60 (d, 1H, *J*=1,5 Hz, H-C3), 4,20 (q, 2H, *J*=6,9 Hz, H-C9), 1,38 (t, 3H, *J*=6,9 Hz, H-C10).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 190,46 (s, C-11), 149,21 (s, C-2), 147,83 (s, C-1), 137,03 (s, C-6), 126,90 (s, C-4), 120,55 (s, C-5), 113,52 (s, C-3), 65,21 (s, C-9), 14,29 (s, C-10).

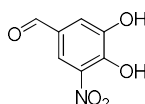
IR  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3213, 1685, 1613, 1576, 1548, 1473, 1395, 1360, 1337, 1268, 1231, 1101, 1047, 945, 878, 843, 816, 749, 704, 665, 636, 581, 498, 440, 421

DSC *t*/°C: 160,10

#### 3.3.2. Priprava monokristala spoja 2

Spoj 2 (200 mg) je otopljen u acetonu (12 mL) te je otopina ostavljena stajati na sobnoj temperaturi u zatvorenoj bočici da otapalo polagano hlapi. Nakon 10 dana u bočici je nađen monokristal čija je struktura snimljena metodom difrakcije rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.

### 3.4. Postupak pripreve 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehida (3)





### 3.4.1. Priprava spoja 3

Spoj 2 (5,0 g; 23,7 mmol) je otopljen u 36,5 %-tnoj klorovodičnoj kiselini (5 mL) te je dodan cinkov klorid (10,0 g; 73,4 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijana na 90 – 100 °C te je miješana 24 h. Reakcijska smjesa je ohlađena na 70 – 75 °C te je kroz 1 h dokapana voda (25 mL). Dobivena suspenzija je ohlađena na 0 – 5 °C i miješana 1 h. Suspenzija je profiltrirana te su vlažni kristali isprani s vodom (3 × 5 mL). Sirovi produkt je sušen u vakuum sušnici na 60 °C i tlaku od 10 mbar 16 h (4,1 g; iskorištenje: 95,5 %).

### 3.4.2. Prekristalizacija spoja 3

Sirovi spoj 3 (4,04 g) je suspendiran u smjesi metanol/voda (8:2, *V/V*; 8 mL). Suspenzija je zagrijana na 50 – 55 °C te miješana do potpunog otapanja. Otopina je kroz 1 h ohlađena na 0 – 5 °C te je miješana 1 h. Dobivena suspenzija je profiltrirana te su vlažni kristali isprani s vodom (2 × 4 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 45 °C i tlaku od 10 mbar 16 h (3,25 g; iskorištenje 81,2 %; kromatografska čistoća: 100,00 A%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ /ppm: 9,79 (s, 1H, H-C-9), 7,96 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H-C5), 7,45 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H-C3).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ /ppm: 190,60 (s, C-9), 148,32 (s, C-2), 147,28 (s, C-1), 137,24 (s, C-6), 126,94 (s, C-4), 119,67 (s, C-5), 115,72 (s, C-3).

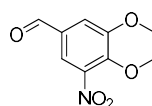
IR  $\nu_{\max}$ /cm<sup>-1</sup>: 3205, 1670, 1613, 1591, 1537, 1493, 1417, 1363, 1306, 1273, 1204, 1122, 1017, 943, 894, 868, 785, 767, 693, 603, 584, 490, 407

DSC *t*/°C: 142,28

### 3.4.3. Priprava monokristala spoja 3

Spoj 3 (200 mg) je otopljen u smjesi metanol/voda (6:4) (5 mL) te je otopina ostavljena stajati na sobnoj temperaturi u zatvorenoj bočici da otapalo polagano hlapi. Nakon 10 dana u bočici je nađen monokristal čija je struktura snimljena metodom difrakcije rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.

## 3.5. Postupak pripreve 3,4-dimetoksi-5-nitrobenzaldehyda (4)



Spoj **3** (20 g; 109,22 mmol) je suspendiran u metanolu (50 mL). Suspenzija je zagrijana na 50 – 55 °C te je miješana 2 h. Dobivena otopina je ohlađena na 0 – 5 °C kroz 2 h te je miješana 1 h. Dobivena suspenzija je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s hladnim metanolom (2 × 10 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 30 °C, i tlaku od 10 mbar 12 h (18,33 g; iskorištenje 91,7 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

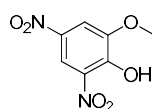
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 10,26 (s, 1H, H-C-11), 7,32 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H-C5), 7,08 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H-C3), 3,22 (s, 6H, H-C8, H-C10).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 190,53 (s, C-11), 147,59 (s, C-2), 141,87 (s, C-1), 136,59 (s, C-6), 128,87 (s, C-4), 117,64 (s, C-5), 112,72 (s, C-3), 52,50 (d, C-8, C-10).

IR  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3159, 1627, 1545, 1407, 1376, 1339, 1313, 1243, 1195, 1133, 1101, 1026, 989, 894, 858, 824, 802, 765, 703, 655, 625, 594, 520, 493, 453, 429, 420, 408

DSC *t*/°C: 105,17

### 3.6. Postupak pripreve 2-metoksi-4,6-dinitrofenola (**5**)



#### 3.6.1. Priprava spoja **5**

2-metoksifenol (10 g; 80,6 mmol) je otopljen u diizopropil-eteru (200 mL) te je dodana voda (20 mL). Otopina je ohlađena na 0 – 5 °C te je dokapana 65 % dušična kiselina (20 mL; 290,9 mmol) kroz 30 min. Reakcijska smjesa je miješana 1 h na 0 – 5 °C, a zatim je zagrijana na 20 – 25 °C te je miješana još 16 h. Diizopropil-eter je otparen vakuum destilacijom uz održavanje temperature ispod 25 °C. Dobivena suspenzija je profiltrirana te su vlažni kristali isprani s vodom (3 × 15 mL). Sirovi produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C i tlaku od 10 mbar 16 h. (11,5 g; Iskorištenje 66,6 %).

#### 3.6.2. Prekristalizacija spoja **5**

Sirovi spoj **5** (11,4 g) je suspendiran u smjesi metanol/voda (55:45 *V/V*; 180 mL). Suspenzija je zagrijana na reflux te miješana do potpunog otapanja. Otopina je ohlađena na 0 – 5 °C kroz 2 h te je miješana 1 h na 0 – 5 °C. Dobivena suspenzija je profiltrirana te su vlažni kristali

isprani s vodom (3 x 15 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C i tlaku od 10 mbar 16 h (10,1 g; Iskorištenje 88,8 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

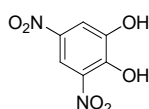
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 8,34 (d, 1H,  $J=2,6$  Hz, H-C5), 7,93 (d, 1H,  $J=2,7$  Hz, H-C3), 4,00 (s, 3H, H-C9).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 149,74 (s, C-2), 148,49 (s, C-1), 137,60 (s, C-6), 136,13 (s, C-4), 113,24 (s, C-5), 109,31 (s, C-3), 57,25 (s, C-9).

IR  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3235, 3104, 1611, 1541, 1525, 1449, 1381, 1334, 1256, 1222, 1243, 1084, 1047, 942, 918, 896, 876, 804, 727, 708, 678, 440, 417, 405

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 121,09

### 3.7. Postupak pripreve 3,5-dinitrobenzen-1,2-diola (6)



#### 3.7.1. Priprava spoja 6

Spoj 5 (25 g; 116,7 mmol) je suspendiran u 47 % bromovodičnoj kiselini (300 mL). Suspenzija je zagrijana na refluks te je miješana 5 h. Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 – 5 °C kroz 2 h te je miješana još 30 min. Suspenzija je profiltrirana, vlažni kristali su isprani s hladnom vodom (2 x 30 mL). Sirovi produkt je sušen na zraku na sobnoj temperaturi 16 h (20,78 g; Iskorištenje 88,9 %).

#### 3.7.2. Prekristalizacija spoja 6

Sirovi spoj 6 (20,32 g) je suspendiran u smjesi metanola (120 mL) i vode (120 mL). Suspenzija je zagrijana na refluks. Nakon potpunog otapanja, dodan je aktivni ugljen Norit SX plus (1 g). Smjesa je miješana 1 h na refluksu, a zatim je vruća profiltrirana preko zagrijanog lijevka i boce za odsisavanje. Otopina je kroz 2 h ohlađena na 0 – 5 °C, miješana 30 min te je dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s vodom (2 x 15 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 30 °C i tlaku od 10 mbar 16 h (14,63 g; Iskorištenje 72,0 %; kromatografska čistoća: 100,00 A%).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 8,18 (d, 1H,  $J=2,8$  Hz, H-C5), 7,75 (d, 1H,  $J=2,7$  Hz, H-C3).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 148,20 (s, C-2), 148,04 (s, C-1), 137,52 (s, C-6), 136,32 (s, C-4), 112,04 (s, C-3), 111,70 (s, C-5).

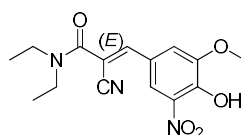
IR  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3432, 3289, 3101, 1619, 1548, 1515, 1447, 1336, 1276, 1225, 1122, 1072, 983, 935, 893, 807, 737, 708, 665, 534, 479, 430

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 166,40

### 3.7.3. Priprava monokristala spoja 6

Spoj 6 (200 mg) je otopljen u smjesi metanol/voda (8:2; *V/V*) (2 mL) te je otopina ostavljena stajati na sobnoj temperaturi u zatvorenoj bočici da otapalo polagano hlapi. Nakon 10 dana u bočici je nađen monokristal čija je struktura snimljena metodom difrakcije rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku.

## 3.8. Postupak priprave (*E*)-2-cijano-*N,N*-dietil-3-(4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrofenil)akrilamida (7)



### 3.8.1. Priprava spoja 7

Spoj 1 (7 g; 35,5 mmol) je otopljen u apsolutnom etanolu (200 mL). Dodani su *N,N*-dietilcijanoacetamid (5,39 mL; 39,0 mmol) i amonijev acetat (6,02 g; 78,1 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijana na refluks te je miješana 15 h. Nakon završetka reakcije, smjesa je ohlađena na 0 – 5 °C, miješana 1 h te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s hladnim etanolom (3 × 5 mL). Sirovi produkt je sušen u vakuum sušnici na 30 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (10,35 g; iskorištenje 91,3 %).

### 3.8.2. Prekristalizacija spoja 7

Sirovi spoj 7 (10,0 g) je suspendiran u metanolu (100 mL). Suspenzija je zagrijana na refluks. Nakon potpunog otapanja, dodan je aktivni ugljen Acticarbon S (0,7 g). Smjesa je miješana 20 min na refluksu, a zatim je vruća profiltrirana preko zagrijanog lijevka i boce za odsisavanje. Otopina je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana 3 h te je dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1, *V/V*; 2 × 20 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 30 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (8,67 g; iskorištenje 86,7 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

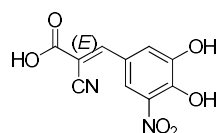
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 7,98 (d, 1H,  $J=2,4$  Hz, H-C5), 7,46 (s, 2H, H-C3, H-C10), 3,69 (s, 1H, H-C9), 3,38 (q, 4H,  $J=6,9$  Hz, H-C19, H-C22), 1,13 (t, 6H,  $J=7,1$  Hz, H-C20, H-C23).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 164,52 (s, C-12), 162,32 (s, C-1), 154,66 (s, C-2), 150,44 (s, C-10), 135,87 (s, C-6), 126,71 (s, C-5), 118,62 (s, C-4), 111,39 (s, C-16), 108,40 (s, C-3), 94,77 (s, C-11), 55,23 (s, C-9), 41,99 (s, C-19, C-22), 13,09 (s, C-20, C-23).

IR  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3045, 2193, 1632, 1600, 1532, 1489, 1423, 1357, 1275, 1248, 1219, 1158, 1093, 1062, 979, 945, 916, 878, 859, 823, 783, 762, 741, 628, 603, 570, 500, 438

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 155,38

### 3.9. Postupak priprave (*E*)-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilne kiseline (8)



#### 3.9.1. Priprava spoja 8

Spoj 3 (30 g; 164,7 mmol) je suspendiran u toluenu (300 mL). Dodana je cijanooctena kiselina (12,9 g; 151,5 mmol) i amonijev acetat (11,7 g; 151,5 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijana na refluxu te je miješana 16 h uz azeotropno odvajanje vode preko Dean-Stark aparature. Po završetku reakcije, smjesa je ohlađena na 0 – 5 °C, miješana 1 h te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s toluenom (2 × 20 mL) i dietil-eterom (2 × 20 mL). Sirovi produkt je sušen u vakuum sušnici na 45 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (38,65 g; iskorištenje: 94,3 %).

#### 3.9.2. Prekristalizacija spoja 8

Sirovi spoj 8 (35,0 g) je suspendiran u metanolu (350 mL). Suspenzija je zagrijana na refluxu. Nakon potpunog otapanja, dodan je aktivni ugljen Acticarbon S (2,45 g). Smjesa je miješana 20 min na refluxu, a zatim je vruća profiltrirana preko zagrijanog lijevka i boce za odsisavanje. Otopina je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana 3 h te je dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1,  $V/V$ ; 2 × 70 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 45 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (18,11 g; iskorištenje 51,7 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

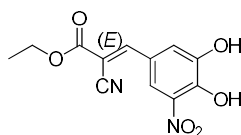
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 8,21 (d, 2H,  $J=3,9$  Hz, H-C5, H-C9), 7,88 (d, 1H, H-C3).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 168,93 (s, C-11), 158,33 (s, C-9), 154,13 (s, C-2), 149,39 (s, C-1), 137,55 (s, C-6), 126,03 (s, C-4), 124,43 (s, C-5), 123,65 (s, C-3), 116,41 (s, C-15), 104,22 (s, C-10).

IR  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3407, 3138, 1744, 1699, 1601, 1540, 1486, 1406, 1354, 1259, 1202, 1132, 1073, 1019, 946, 800, 764, 743, 622, 536, 450, 413

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 130,92

### 3.10. Postupak priprave (*E*)-etil-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilata (9)



#### 3.10.1. Priprava spoja 9

Spoj 8 (5 g; 20,0 mmol) je suspendiran u toluenu (50 mL) te je dodan DMF (0,265 mL; 3,42 mmol). Suspenzija je zagrijana na 50 – 55 °C te je dokapan tionil-klorid (3,6 mL; 49,63 mmol). Smjesa je zagrijana na refluks i miješana 5 h. Suspenzija je ohlađena na 20 – 25 °C te je dodan apsolutni etanol (50 mL). Suspenzija je miješana 24 h na 20 – 25 °C te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s hladnim etanolom (2 × 5 mL). Sirovi produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (4,0 g; iskorištenje 71,9 %).

#### 3.10.2. Prekristalizacija spoja 9

Sirovi spoj 9 (3,5 g) je suspendiran u metanolu (35 mL). Suspenzija je zagrijana na refluks. Nakon potpunog otapanja, dodan je aktivni ugljen Acticarbon S (0,25 g). Smjesa je miješana 20 min na refluksu, a zatim je vruća profiltrirana preko zagrijanog lijevka i boce za odsisavanje. Otopina je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana 3 h te je dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1,  $V/V$ ; 2 × 7 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (2,81 g; iskorištenje 80,3 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

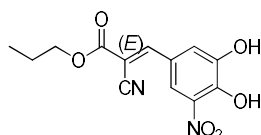
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 8,20 (d, 2H,  $J=3,8$  Hz, H-C5, H-C9), 7,88 (d, 1H,  $J=2,1$  Hz, H-C3), 4,35 (q, 2H,  $J=7,2$  Hz, H-C13), 1,37 (t, 3H,  $J=7,0$  Hz, H-C14).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 162,57 (s, C-11), 155,41 (s, C-2), 151,46 (s, C-9), 149,28 (s, C-1), 137,62 (s, C-6), 131,39 (s, C-4), 119,65 (s, C-5), 117,18 (s, C-3), 115,24 (s, C-17), 99,23 (s, C-10), 67,75 (s, C-13), 10,19 (s, C-14).

IR  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3133, 3044, 1744, 1704, 1605, 1541, 1484, 1404, 1354, 1260, 1202, 1131, 1057, 1018, 945, 895, 873, 799, 764, 742, 648, 620, 503, 483, 453, 413

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 144,01

### 3.11. Postupak priprave (*E*)-propan-1-il-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilata (10)



#### 3.11.1. Priprava spoja 10

Spoj **8** (5 g; 20,0 mmol) je suspendiran u toluenu (50 mL) te je dodan DMF (0,265 mL; 3,42 mmol). Suspenzija je zagrijana na 50 – 55 °C te je dokapan tionil-klorid (3,6 mL; 49,63 mmol). Smjesa je zagrijana na refluks i miješana 5 h. Suspenzija je ohlađena na 20 – 25 °C te je dodan *n*-propanol (50 mL). Suspenzija je miješana 24 h na 20 – 25 °C te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s hladnim *n*-propanolom (2 × 5 mL). Sirovi produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (3,7 g; iskorištenje 63,3 %).

#### 3.11.2. Prekristalizacija spoja 10

Sirovi spoj **10** (3,5 g) je suspendiran u metanolu (35 mL). Suspenzija je zagrijana na refluks. Nakon potpunog otapanja, dodan je aktivni ugljen Acticarbon S (0,25 g). Smjesa je miješana 20 min na refluksu, a zatim je vruća profiltrirana preko zagrijanog lijevka i boce za odsisavanje. Otopina je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana 3 h te je dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1, *V/V*; 2 × 7 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (2,75 g; iskorištenje 78,6 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

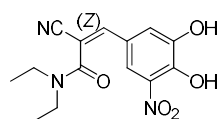
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 8,10 (d, 2H,  $J=2,6$  Hz, H-C5, H-C9), 7,78 (d, 1H,  $J=2,0$  Hz, H-C3), 4,17 (t, 2H,  $J=6,4$  Hz, H-C13), 1,65 (m, 2H,  $J=6,9$  Hz, H-C14), 0,93 (t, 3H,  $J=7,5$  Hz, H-C15).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 162,22 (s, C-11), 152,58 (s, C-9), 148,35 (s, C-2), 146,99 (s, C-1), 135,39 (s, C-6), 122,41 (s, C-4), 119,85 (s, C-5), 119,65 (s, C-3), 114,87 (s, C-18), 101,50 (s, C-10), 67,71 (s, C-13), 21,49 (s, C-14), 9,15 (s, C-15).

IR  $\nu_{\text{max}}$ /cm $^{-1}$ : 3133, 3043, 1744, 1700, 1606, 1403, 1356, 1275, 1211, 1131, 1057, 945, 872, 764, 742, 622, 453

DSC  $t$ /°C: 148,74

### 3.12. Postupak pripreve (Z)-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietilakrilamida (11)



#### 3.12.1. Priprava spoja 11

Pomiješani su toluen (3120 mL) i octena kiselina (83 mL; 1,45 mol). U smjesu je kroz 30 min dokapan piperidin (144 mL; 1,46 mol) uz održavanje temperature na 20 – 25 °C. Reakcijska smjesa je miješana 1 h na 20 – 25 °C, a zatim je dodan spoj 3 (240 g; 1,31 mol) i toluen (600 mL). U reakcijsku smjesu je dokapan *N,N*-dietilcijanoacetamid (195 mL; 1,41 mol) kroz 10 min te je dodan toluen (360 mL). Reakcijska smjesa je zagrijana na refluks te je miješana 1,5 h uz azeotropno odvajanje vode preko Dean-Stark aparature. Reakcijska smjesa je zatim ohlađena na 30 – 35 °C te je dodan metanol (600 mL). U otopinu je dokapana klorovodična kiselina (36,5 %; 155 mL) kroz 45 min uz održavanje temperature na 30 – 35 °C. Reakcijska smjesa je miješana 1 h, a zatim je dokapan drugi obrok klorovodične kiseline (36,5 %; 114 mL) kroz 30 min uz održavanje temperature na 30 – 35 °C. Suspenzija je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana još 1,5 h te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1, *V/V*; 2 × 300 mL) i vodom (600 mL). Dobivena matičnica je ostavljena otparavati na sobnoj temperaturi 7 dana. Dobiveni kristali su profiltrirani te isprani s toluenom (2 × 10 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 55 °C pri tlaku od 10 mbar 6 h (17,48 g; iskorištenje 4,4 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 7,73 (d, 1H,  $J=2,1$  Hz, H-C5), 7,43 (s, 1H, H-C9), 7,21 (d, 1H,  $J=2,1$  Hz, H-C3), 3,52 (q, 2H,  $J=7,0$  Hz, H-C18), 3,38 (q, 2H,  $J=7,0$  Hz, H-C21), 1,22 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, H-C19), 1,11 (t, 2H,  $J=7,1$  Hz, H-C22).

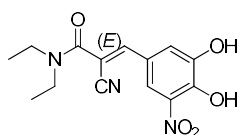


$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ /ppm: 163,98 (s, C-11), 149,83 (s, C-2), 146,96 (s, C-1), 146,13 (s, C-9), 136,63 (s, C-6), 124,95 (s, C-4), 121,52 (s, C-3), 118,28 (s, C-5), 117,81 (s, C-15), 109,12 (s, C-10), 44,78 (s, C-21), 41,31 (s, C-18) 14,17 (s, C-22), 14,14 (s, C-19).

IR  $\nu_{\text{max}}$ /cm $^{-1}$ : 2984, 2217, 2621, 1548, 1479, 1462, 1444, 1377, 1360, 1322, 1270, 1232, 1131, 1102, 1017, 946,913, 853, 792, 764, 660, 647, 626, 608, 561, 470, 439

DSC  $t$ /°C: 160,99

### 3.13. Postupak pripreve (*E*)-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-*N,N*-dietilakrilamida; entakapon (**12**)



#### 3.13.1. Priprava spoja **12**

Pomiješani su toluen (3120 mL) i octena kiselina (83 mL; 1,45 mol). U smjesu je kroz 30 min dokapan piperidin (144 mL; 1,46 mol) uz održavanje temperature na 20 – 25 °C. Reakcijska smjesa je miješana 1 h na 20 – 25 °C, a zatim je dodan spoj **3** (240 g; 1,31 mol) i toluen (600 mL). U reakcijsku smjesu je dokapan *N,N*-dietilcijanoacetamid (195 mL; 1,41 mol) kroz 10 min te je dodan toluen (360 mL). Reakcijska smjesa je zagrijana na reflux te je miješana 1,5 h uz azeotropno odvajanje vode preko Dean-Stark aparature. Reakcijska smjesa je zatim ohlađena na 30 – 35 °C te je dodan metanol (600 mL). U otopinu je dokapana klorovodična kiselina (36,5 %; 155 mL) kroz 45 min uz održavanje temperature na 30 – 35 °C. Reakcijska smjesa je miješana 1 h, a zatim je dokapan drugi obrok klorovodične kiseline (36,5 %; 114 mL) kroz 30 min uz održavanje temperature na 30 – 35 °C. Suspenzija je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana još 1,5 h te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1, *V/V*; 2 × 300 mL) i vodom (600 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 55 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (242,18 g; iskorištenje 60,0 %).

#### 3.13.2. Prekristalizacija spoja **12**

Sirovi spoj **12** (240 g) je suspendiran u metanolu (2400 mL). Suspenzija je zagrijana na reflux te miješana do potpunog otapanja. Dodan je aktivni ugljen Acticarbon S (16,8 g) te je smjesa miješana 20 min. Otopina je vruća profiltrirana preko zagrijanog lijevka i boce za odsisavanje. Dodan je metanol (120 mL) te je otopina kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana 3 h te je

dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1, *V/V*; 2 × 480 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 55 °C pri tlaku od 10 mbar 10 h (201,67 g; iskorištenje 84,0 %; kromatografska čistoća: 100 A%).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 7,92 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H-C5), 7,76 (d, 1H, *J*=2,2 Hz, H-C3), 7,64 (s, 1H, H-C9), 3,31 – 3,51 (br, 4H, H-C18, H-C21), 1,03 – 1,25 (br, 6H, H-C19, H-C22).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ/ppm: 162,61 (s, C-11), 148,00 (s, C-2), 147,14 (s, C-9), 144,87 (s, C-1), 137,23 (s, C-6), 122,71 (s, C-4), 118,47 (s, C-3), 117,66 (s, C-5), 116,20 (s, C-15), 104,70 (s, C-10), 43,16 (s, C-18), 39,78 (s, C-21) 13,73 (s, C-19), 12,30 (s, C-22).

IR  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3327, 2979, 2216, 1626, 1596, 1539, 1510, 1437, 1346, 1294, 1206, 1146, 1104, 1069, 1021, 996, 954, 873, 769, 740, 627, 561, 520, 444

DSC *t*/°C: 165,50

### 3.14. Postupak pripreme forme A spoja 12

Spoj 12 (2 g) je suspendiran u metanolu (24 mL) na magnetskoj miješalici. Suspenzija je zagrijan na refluks te miješana do potpunog otapanja. Otopina je kroz 1 h ohlađena na 20 – 25 °C, miješana 3 h te je dobivena suspenzija profiltrirana. Vlažni kristali su isprani sa smjesom metanol/voda (1:1, *V/V*; 2 × 4 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 55 °C pri tlaku od 10 mbar 10 h (1,61 g; iskorištenje 80,6 %).

DSC *t*/°C: 165,50

### 3.15. Postupak pripreme forme D spoja 12

Spoj 12 (2 g) je otopljen u THF-u (6,5 mL) uz zagrijavanje. Otopina je dodana u vodu (50 mL) ohlađenu na 0 – 5 °C, tikvica je isprana s toplim THF-om (1,8 mL). Dobivena suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici 10 min na 0 – 5 °C te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s vodom (6 mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 16 h (1,77 g; iskorištenje 88,5 %).

DSC *t*/°C: 159,64

### 3.16. Postupak pripreme forme E spoja 12

Spoj 12 (2 g) je otopljen u THF-u (6,3 mL) uz zagrijavanje. Vruća otopina je dodana u *n*-heksan (36 mL) ohlađen na 0 – 5 °C. Dobivena suspenzija je miješana na mehaničkoj miješalici 5 min

na 0 – 5 °C te je profiltrirana. Produkt je sušen u vakuum sušnici na 50 °C pri tlaku od 10 mbar 6 h (1,754 g; iskorištenje 88,5 %).

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 158,92

### 3.17. Postupak pripreve forme $\alpha$ spoja 12

Spoj 12 (2 g) je otopljen u THF-u (7 mL) uz zagrijavanje. Dobivena otopina je profiltrirana te ohlađena na sobnu temperaturu. Otopina je kroz 5 min dokapana u vodu (40 mL) ohlađenu na 0 – 5 °C. Dobivena suspenzija je snažno miješana na magnetskoj miješalici 2 h na 0 – 5 °C te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s vodom ( $2 \times 2$  mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 10 h (1,798 g; iskorištenje 89,9 %).

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 177,33

### 3.18. Postupak pripreve forme $\beta$ spoja 12

Spoj 12 (2 g) je otopljen u *n*-propanolu (4,8 mL) uz zagrijavanje do refluksa. Dobivena otopina je dodana u vodu (16 mL) ohlađenu na 0 – 5 °C. Dobivena suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici 10 min na 0 – 5 °C te je profiltrirana. Vlažni kristali su isprani s vodom ( $2 \times 2$  mL). Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 10 h (1,670 g; iskorištenje 83,5 %).

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 159,34

### 3.19. Postupak pripreve forme $\delta$ spoja 12

Spoj 12 (2 g) je otopljen u cikloheksanonu (24 mL) uz zagrijavanje do refluksa. Dobivena otopina je profiltrirana te ohlađena na sobnu temperaturu. Otopina je kroz 30 min dokapana u *n*-heptan (48 mL) na 20 – 25 °C. Dobivena suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici 5 min na 20 – 25 °C te je profiltrirana. Produkt je sušen u vakuum sušnici na 55 °C pri tlaku od 10 mbar 4 h (1,782 g; iskorištenje 89,1 %).

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 166,40

### 3.20. Postupak pripreve forme $\tau$ spoja 12

Spoj 12 (1 g) je otopljen u 2-propanolu (10,5 mL) uz zagrijavanje do refluksa. Dobivena otopina je kroz 5 min dokapana u *n*-heksan (36,8 mL) zagrijan na refluks (68 °C). Dobivena suspenzija je miješana 5 min na refluksu te je profiltrirana. Produkt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C pri tlaku od 10 mbar 6 h (0,854 g; iskorištenje 85,4 %).

DSC  $t/^\circ\text{C}$ : 165,41

### 3.21. Postupak pripreve amorfa spoja 12

Spoj 12 (1 g) je rastaljen uz zagrijavanje do 200 °C. Talina je naglo ohlađena u smjesi leda i acetona pri čemu se dobiva čvrsti produkt (0,988 g; iskorištenje 98,8 %).

### 3.22. Kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Kromatografske analize provedene su tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*; UHPLC) na instrumentu *Agilent UHPLC 1290 Infinity* s binarnom pumpom, termostatiranim modulom za automatsko uzorkovanje, termostatiranim odjeljkom za kromatografsku kolonu i s detektorom s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*; DAD).

Uzorci su analizirani pri sljedećim kromatografskim uvjetima:

- Kromatografska kolona: Waters Acquity CSH (100 mm × 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ )
- Mobilna faza:
  - A: fosfatni pufer (kalijev dihidrogen fosfat; pH 2,1; 10 mM);
  - B: acetonitril
- Diluent: A-B (1:1, *V/V*)
- Volumen injektiranja: 1  $\mu\text{L}$
- Protok: 0,4 mL  $\text{min}^{-1}$
- Gradijent: A-B (83:17, *V/V*), 0 min; A-B (40:60, *V/V*), 8,2 min; A-B (40:60, *V/V*), 8,2 – 10 min; A-B (83:17, *V/V*), 10,01 min; A-B (83:17, *V/V*), 10,01 – 13 min
- Temperatura modula za automatsko uzorkovanje: 25 °C
- Temperatura kolone: 45 °C
- Valna dužina detektora: 210 nm

Priprema uzoraka provedena je na način da je 1 mg spoja otopljeno u 1 mL diluenta. Obrada kromatograma odrađena je u programu ChemStation.

### 3.23. Razlikovna pretražna kalorimetrija

Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) za spojeve 1 – 12 te za sve dobivene kristalne forme (A, D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ ) je provedena na instrumentu TA Instruments Discovery DSC u zatvorenoj aluminijskoj posudici s jednom rupom uz protok dušika ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) i brzinom zagrijavanja od  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  u temperaturnom području od  $25 - 300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Obrada podataka je provedena u program TRIOS (TA Instruments).

### 3.24. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza (TG) za spojeve 1 – 12 te za sve dobivene kristalne forme (A, D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ ) je provedena na instrumentu TA Instruments Discovery TG u zatvorenoj aluminijskoj posudici uz protok dušika ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) i brzinom zagrijavanja od  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  u temperaturnom području od  $25 - 300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Obrada podataka je provedena u programu TRIOS (TA Instruments).

### 3.25. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku

Difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnim uzorcima izvedena je na Philips X'Pert PRO difraktometru za prah u Bragg-Brentano geometriji uz  $\text{CuK}\alpha$  zračenje ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ) pri sobnoj temperaturi na nosaču od silicija (PW1817-32). Difraktogrami su snimljeni u  $2\theta$  području  $3 - 40^\circ$ , uz korak pomicanja detektora od  $0,0167^\circ$  te vremenom mjerenja od 37 s po pojedinom koraku.

### 3.26. Difrakcija rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku

Difrakcija rentgenskih zraka na monokristalnom uzorku za spojeve **1, 2, 3 i 6** je provedena na Oxford Diffraction Xcalibur Nova R (microfocus Cu tube) uređaju opremljenim s uređajem za hlađenje pomoću tekućeg dušika Oxford Instruments CryoJet. Analiza dobivenih podataka je provedena u računalnom programu CrysAlis PRO. Strukture su riješene korištenjem SHELXS97 i utočnjene pomoću SHELXL-2017 računalnih paketa.

Proračuni molekularnih geometrija su provedeni u programu PLATON te su dobivene strukture vizualizirane pomoću programa ORTEP-3 i Mercury.

### 3.27. Spektroskopija NMR

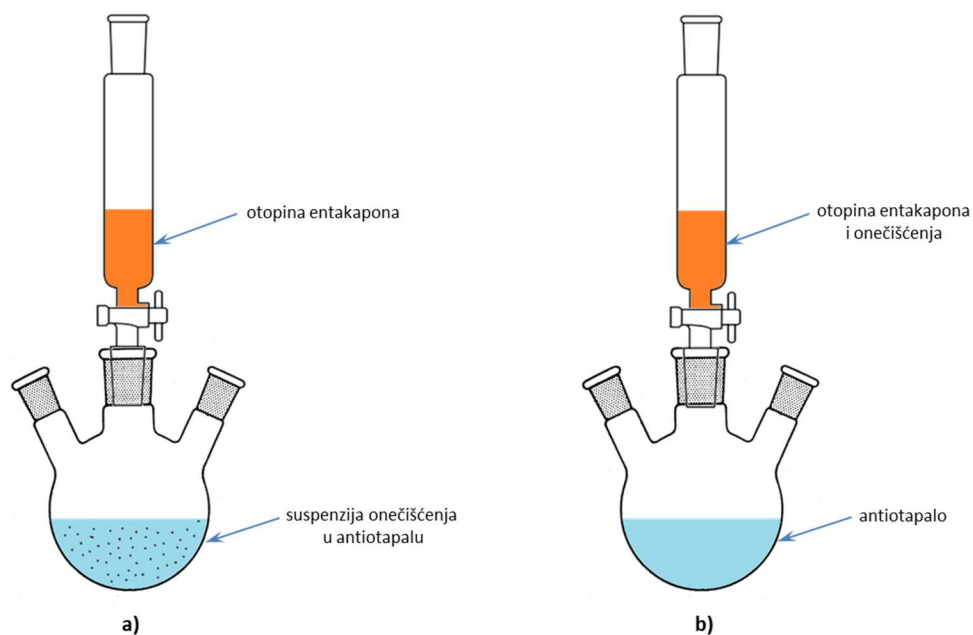
Spojevi 1 – 12 identificirani su  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT, COSY, HMBC i HSQC spektroskopijom NMR. Spektri su snimani na Bruker Avance DRX 500 na 500,1 MHz ( $^1\text{H}$ ) i 125,8 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) u deuteriranom otapalu (DMSO- $d_6$ ). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su na ppm (dijelova na milijun) skali, prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutrašnjem standardu. Obrada spektara je provedena u programu Spinworks 3.1.8.1.

### 3.28. Infracrvena spektroskopija

Infracrveni spektri za spojeve 1 – 12 te za sve dobivene kristalne forme (A, D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ ) su snimljeni na Thermo Scientific Nicolet instrumentu, ATR metodom (engl. *Attenuated Total Reflectance*) u području od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$ . Obrada podataka je provedena u programu Opus 7.2 (Bruker).

### 3.29. Postupak provedbe pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije

Ispitivanje je provedeno prema opisanim postupcima za svaku od izoliranih kristalnih formi (A, D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ ).<sup>84 – 88</sup> Onečišćenje je u različitim količinama ( $w=0,1 – 5 \%$ ) dodano ili u antiotapalo u koje je dokapana otopina entakapona (cijepljenje; engl. *seed*) ili je otopljeno zajedno s entakaponom te tako dodano u antiotapalo prilikom kristalizacije (obogaćeni uzorak; engl. *spike*) osim u pokusima pripreve forme A u kojima se ne koristi antiotapalo te u pokusima pripreve forme  $\tau$  u kojima je antiotapalo dodano u otopinu entakapona (Slika 20).



**Slika 20.** Prikaz izvedbe pokusa ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije entakapona: a) suspenzija onečišćenja u antiotapalu na koje se dokapava otopina entakapona (cijepljenje); b) čisto antiotapalo na koje se dokapava otopina entakapona i onečišćenja (obogaćeni uzorak).

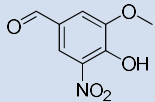
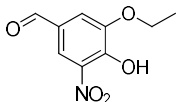
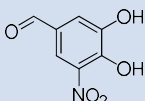
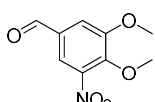
## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

Osnovna hipoteza ovog rada je da će strukturno slični spojevi prisutni u kristalizacijskom sustavu uzrokovati varijabilnost kristalne forme u standardnom procesu dobivanja željene kristalne forme. Sintetizirani su, izolirani i karakterizirani mogući međuprodukti i onečišćenja entakapona te je ispitan njihovo utjecaj na kristalizaciju i polimorfiju entakapona. Proučavan je utjecaj: (a) dodatka različitih količina onečišćenja ( $w=0,1 - 5 \%$ ) u antiotapalo ili u otopinu entakapona i (b) molekulske strukture onečišćenja kako bi se ispitalo i objasnilo njihovo djelovanje na promjene u polimorfnom ponašanju prilikom kristalizacije entakapona.

### 4.1. Sinteza i strukturna karakterizacija spojeva 1 - 12

Provedena je sinteza srodnih tj. strukturno sličnih spojeva entakapona (Tablica 10). Za sve pripravljene srodne spojeve napravljena je potpuna karakterizacija te su im snimljeni IR (ATR) i NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT, COSY, HMBC i HSQC) spektri, određena je čistoća UHPLC-om te su im snimljeni XRPD, DSC i TG.

**Tablica 10.** Strukturne formule, imena i podrijetlo pripremljenih spojeva srodnih entakaponu.

| Spoj | Struktura   | Ime                                     | Podrijetlo  |
|------|---|---|---|
| 1    |  | 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehyd | polazni spoj u sintezi entakapona prema nekoliko patenata <sup>69-72</sup>                |
| 2    |  | 3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrobenzaldehyd  | polazni spoj u sintezi entakapona prema patentu Arava <i>et.al.</i> <sup>78</sup>         |
| 3    |  | 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyd       | polazni spoj prema nekoliko patenata te onečišćenje C prema Eu. Ph. <sup>71, 75, 80</sup> |
| 4    |  | 3,4-dimetoksi-5-nitrobenzaldehyd        | polazni spoj u sintezi entakapona prema radu Harishe i suradnika <sup>74</sup>            |

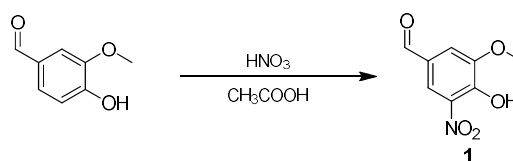


**Tablica 10.** (nastavak) Strukturne formule, imena i podrijetlo pripremljenih spojeva srodnih entakaponu.

| Spoj | Struktura | Ime  | Podrijetlo   |
|------|-----------|--|--|
| 5    |           | 2-metoksi-4,6-dinitrofenol   | moguće onečišćenje u polaznom materijalu u sintezi entakapona prema radovima Backstorm <i>et al.</i> , Deshpande <i>et al.</i> <sup>78, 79</sup> |
| 6    |           | 3,5-dinitrobenzen-1,2-diol   | onečišćenje E prema Eu. Ph. <sup>80</sup>  |
| 7    |           | ( <i>E</i> )-2-cijano- <i>N,N</i> -dietil-3-(4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrofenil)akrilamid | posljednji međuprodukt u sintezi entakapona prema nekoliko patenata <sup>70 – 72</sup>   |
| 8    |           | ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilna kiselina                    | međuprodukt u sintezi entakapona prema patentu Srikanth <i>et al.</i> te onečišćenje F prema Eu. Ph. <sup>69, 80</sup>                           |
| 9    |           | ( <i>E</i> )-etil-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilat                        | onečišćenje B prema Eu. Ph. <sup>80</sup>  |
| 10   |           | ( <i>E</i> )-propan-2-il-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)akrilat                 | onečišćenje I prema Eu. Ph. <sup>80</sup>  |
| 11   |           | ( <i>Z</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dietilakrilamid       | onečišćenje A prema Eu. Ph. i USP <sup>80, 81</sup>  |
| 12   |           | ( <i>E</i> )-2-cijano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dietilakrilamid       | entakapon  |

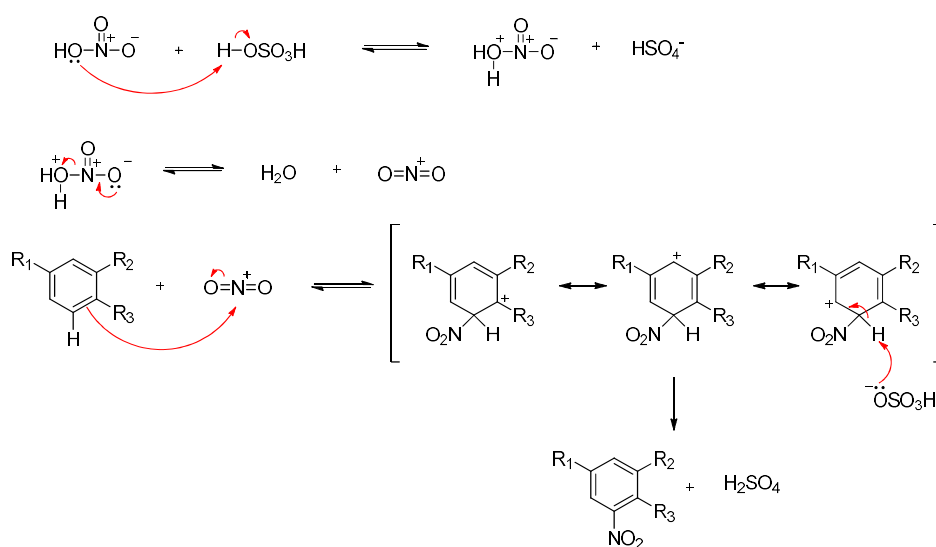
#### 4.1.1. Spoj 1

Spoj 1 pripremljen je reakcijom nitiranja 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida uz prisutnost octene kiseline (Shema 9).



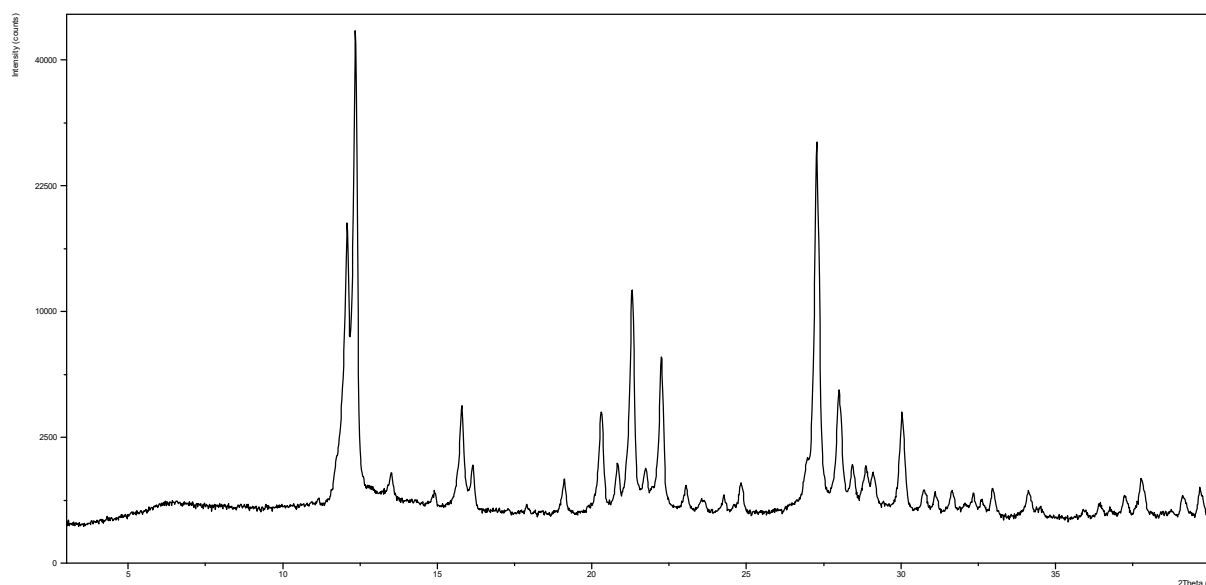
Shema 9. Priprava spoja 1.

Prema predloženom mehanizmu elektrofilne aromatske supstitucije (Shema 10), prvi korak je aktivacija dušične kiseline pri čemu nastaje elektrofilniji, nitronijev ion (nitrilov kation).



Shema 10. Predloženi mehanizam nitriranja elektrofilnom aromatskom supstitucijom.

Benzen napada jaki elektrofil (nitronijev ion) pri čemu nastaje nitro-derivat aromatskog spoja. Struktura ciljnog produkta potvrđena je NMR-om i IR-om te dodatno potvrđena usporedbom snimljenih spektara s podacima poznatima u literaturi.<sup>103</sup> Čistoća izoliranog spoja određena je UHPLC-om. Rezultati analize pretražnom kalorimetrijom također se poklapaju s rezultatima pronađenima u literaturi.<sup>104</sup> Snimljeni difraktogram praha uzorka (Slika 21) upućuje na kristalni uzorak gdje su difrakcijski maksimumi jasno definirani, a povišenje bazne linije koje bi upućivalo na znatnu prisutnost amorfne faze nije opaženo.

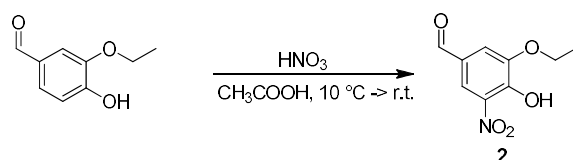


Slika 21. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 1.

Također, otapanjem u acetonu te sporim isparavanjem otapala dobiven je jedinični kristal spoja 1. Difrakcijskim metodama riješena je kristalna i molekulska struktura spoja 1. Rezultati su prikazani u poglavlju 4.2.<sup>105</sup>

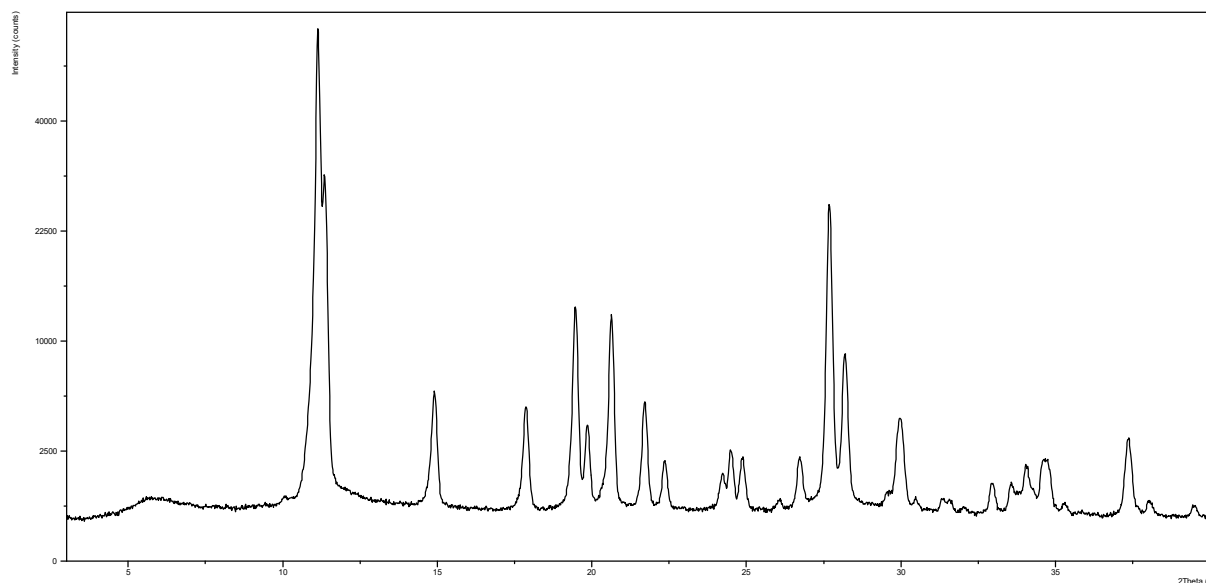
#### 4.1.2. Spoj 2

Spoj 2 pripremljen je na prethodno opisani način reakcijom nitiranja 3-etoksi-4-hidroksibenzaldehida. (Shema 11).



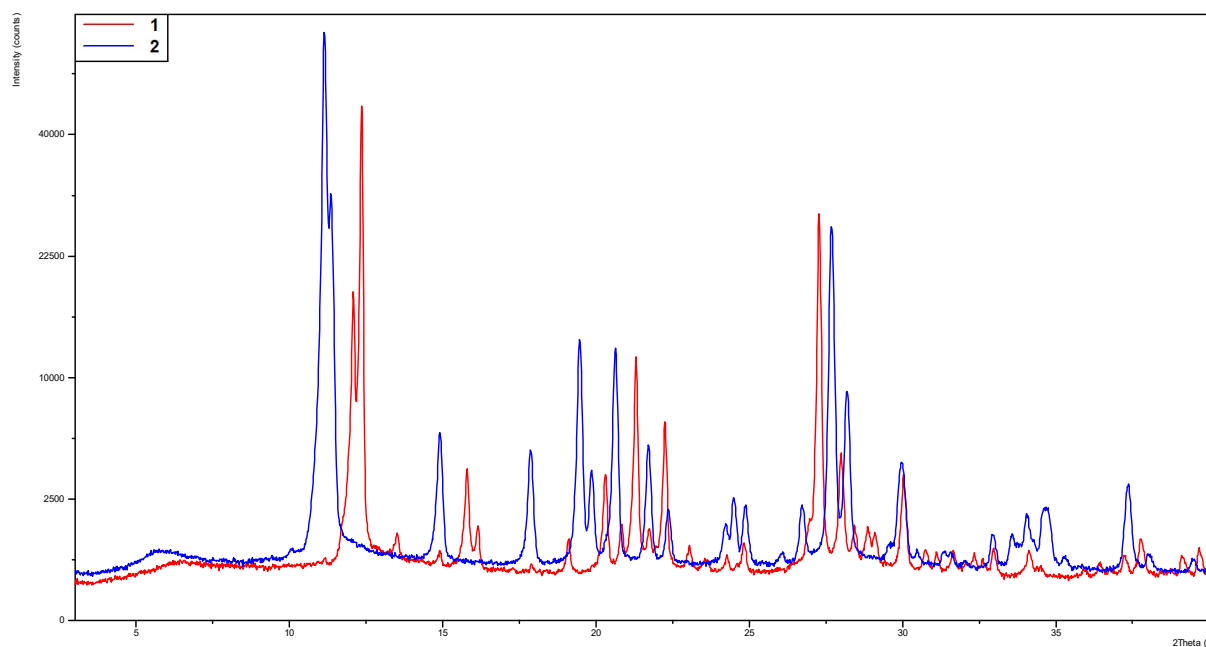
Shema 11. Priprava spoja 2.

Asignirani NMR spektri (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C) pripremljenog spoja 2 poklapaju se sa spektrima objavljenim u literaturi.<sup>106</sup> Dodatno, za pripremljeni spoj 2 snimljen je i njegov IR spektar dok mu je čistoća određena UHPLC-om. Kao i u slučaju spoja 1, njegov difraktogram pokazuje da se radi o kristalnom uzorku (Slika 22).



Slika 22. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 2.

Spojevi **1** i **2** razlikuju se samo prema strukturi supstituenata vezanih na aromatski prsten. U slučaju spoja **2** umjesto metoksi-skupine u položaju 3 benzenskog prstena, prisutna je etoksi-skupina. Navedena promjena u molekularnoj strukturi utjecala je i na promjenu u kristalnoj strukturi te se usporedbom difraktograma praha vidi da spojevi **1** i **2** nisu izostrukturalni (Slika 23).

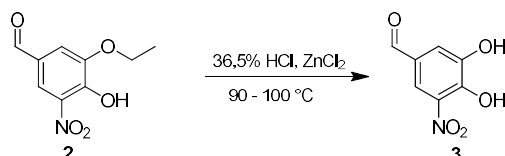


Slika 23. Usporedba difraktograma polikristalnih uzoraka spojeva **1** i **2**.

Također, otapanjem u acetonu i sporim isparavanjem otapala dobiven je monokristal spoja **2**, te je riješena njegova kristalna struktura. Podaci su dani u poglavlju 4.2.

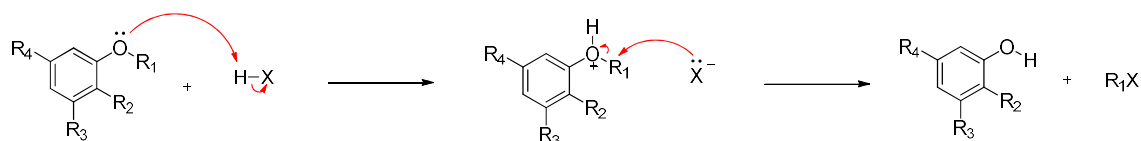
#### 4.1.3. Spoj **3**

Spoj **3** pripremljen je reakcijom hidrolize eterske veze spoja **2** u prisutnosti  $\text{ZnCl}_2$  i klorovodične kiseline pri čemu nastaje 3-etoksi-4-hidroksi-5-nitrobenzaldehyd **3** (Shema 12).



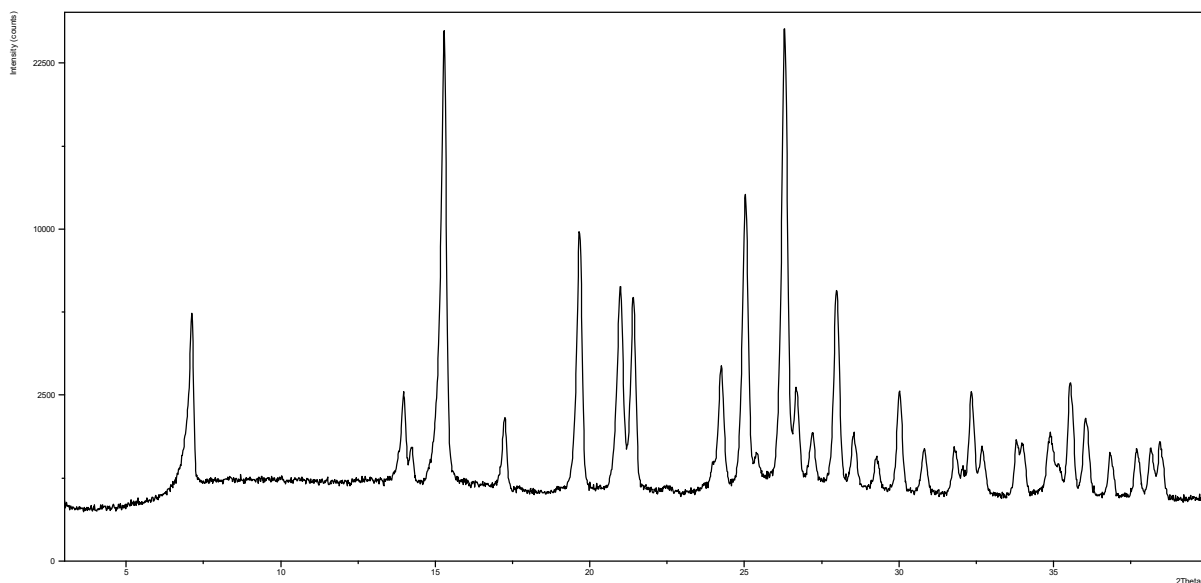
Shema 12. Priprava spoja **3**.

Prema predloženom mehanizmu (Shema 13) jaka kiselina u prisutnosti  $\text{ZnCl}_2$  protonira eterski kisik čime nastaje bolja izlazna skupina. Kloridni ion zatim napada atom ugljik u  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakciji pri čemu nastaje alkohol **3** i etil-klorid.



Shema 13. Predloženi mehanizam kisele hidrolize etera.

Struktura spoja **3** potvrđena je NMR-om i IR-om te uspoređena s podacima dostupnima u literaturi dok je čistoća napravljenog spoja određena UHPLC-om.<sup>106</sup> Polikristalni uzorak spoja **3** snimljen je metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 24) pri čemu je vidljivo kako je uzorak kristalan s jasno izraženim difrakcijskim maksimumima.

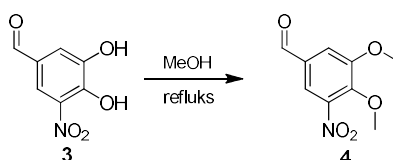


Slika 24. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 3.

Također, otapanjem u smjesi metanol/voda (6:4; *V/V*) te sporim hlapljenjem otapala dobiven je monokristal spoja 3. Riješena je kristalna struktura spoja 3 te su određeni položaji atoma u kristalnoj strukturi. Podaci su komentirani u poglavlju 4.2.

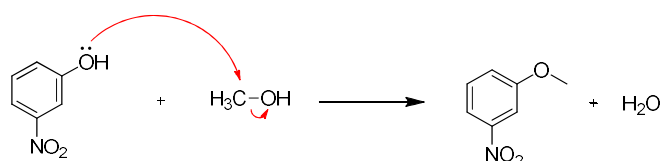
#### 4.1.4. Spoj 4

Spoj 4 pripremljen je miješanjem otopine spoja 3 na visokoj temperaturi u metanolu pri čemu su obje hidroksilne skupine 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehida metilirane (Shema 14).



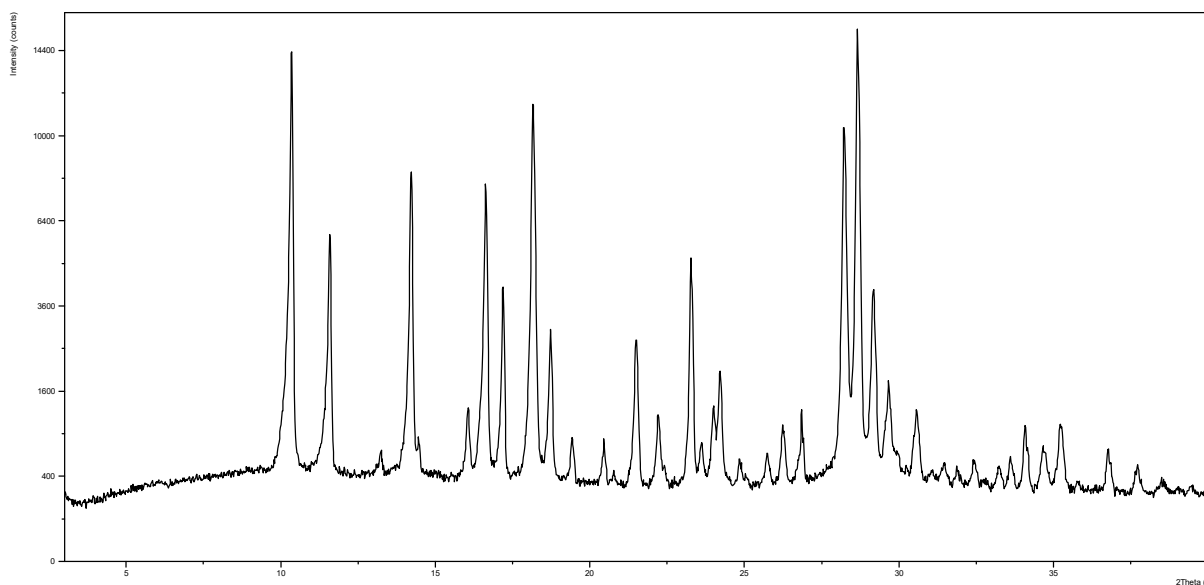
Shema 14. Priprava spoja 4.

Reakcija se odvija prema predloženom mehanizmu prikazanom na Shemi 15. Elektronski par atoma kisika nitrofenola napada ugljikov atom metanola pri čemu izlazi voda. Dodatnoj stabilizaciji sustava pridonosi elektron-odvlačeća nitro-skupina.



Shema 15. Predloženi mehanizam priprave spoja 4.

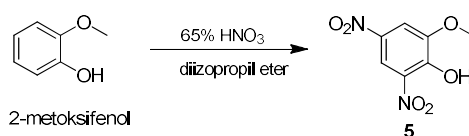
Riješeni NMR spektar izoliranog spoja uspoređen je s podacima dostupnima u literaturi.<sup>107</sup> Iako je objavljeni <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **4** sniman u drugom otapalu (kloroform-*d*), maksimumi se poklapaju uz manje razlike u kemijskim pomacima, koje se mogu pripisati drugom otapalu uporabljenom za snimanje spektra NMR. Za dobiveni spoj snimljen je i njegov IR spektar dok mu je čistoća određena UHPLC-om. Snimljeni difraktogram spoja **4** upućuje na kristalni uzorak (Slika 25).



Slika 25. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja **4**.

#### 4.1.5. Spoj **5**

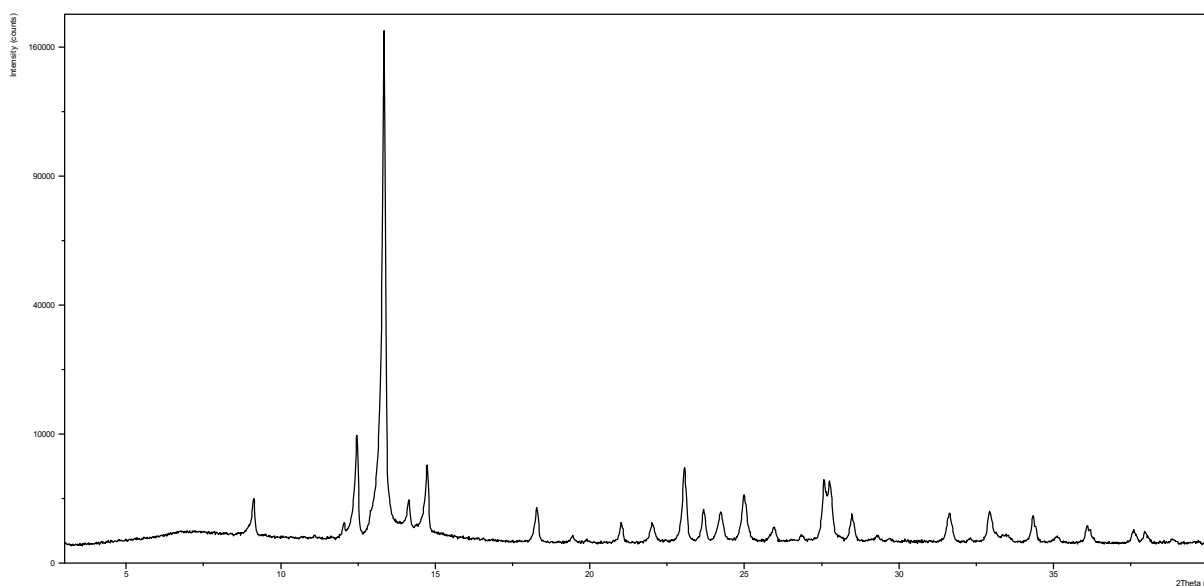
Spoj **5** pripremljen je reakcijom nitriranja 2-metoksifenola (Shema 16) prema prethodno opisanom mehanizmu (Shema 10) pri čemu dolazi do vezanja nitro-skupine na položaje 4 i 6 aromatskog prstena.



Shema 16. Priprava spoja **5**.

Struktura spoja **5** potvrđena je NMR-om i IR-om dok je čistoća uzorka određena UHPLC-om. Dobiveni NMR spektri uspoređeni su s literaturnim podacima te, iako su literaturni spektri snimljeni u drugom otapalu (kloroform-*d*), maksimumi se poklapaju uz manje razlike u kemijskim pomacima, što je dodatna potvrda strukture spoja **5**.<sup>108</sup> Iz snimljenog difraktograma

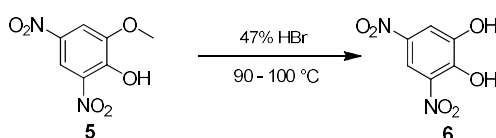
spoja **5** vidljivo je da se radi o kristalnom uzorku s jednim izraženim difrakcijskim maksimumom na  $2\theta = 13,4^\circ$  (Slika 26).



Slika 26. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja **5**.

#### 4.1.6. Spoj **6**

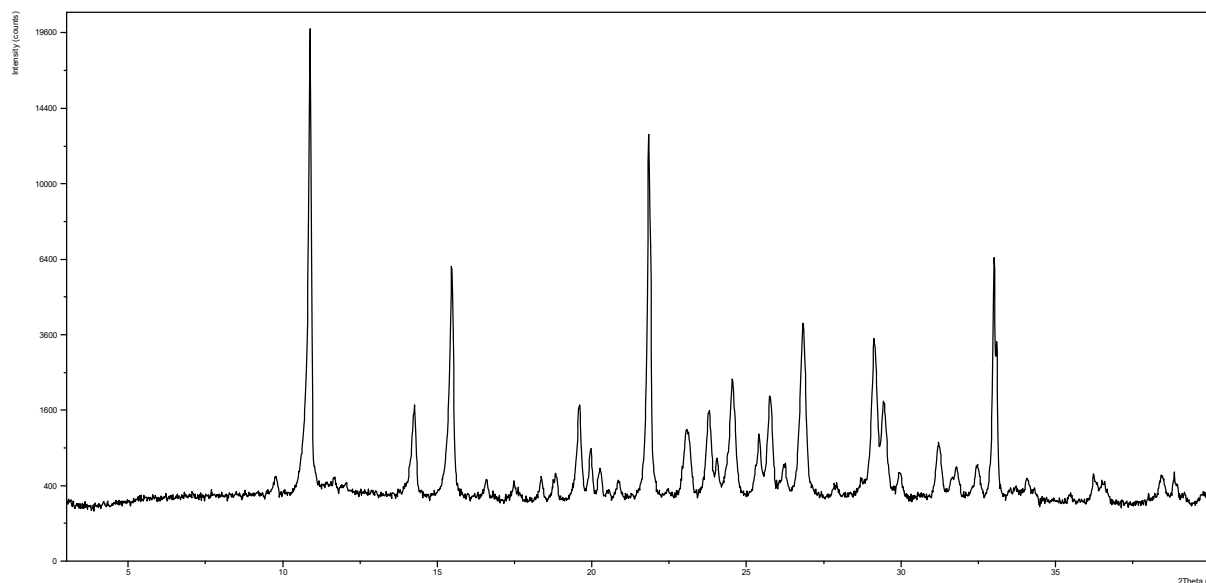
Spoj **6** pripremljen je reakcijom hidrolize eterske veze spoja **5** uz prisutnost bromovodične kiseline (Shema 17) prema prethodno opisanom mehanizmu (Shema 13).



Shema 17. Priprava spoja **6**.

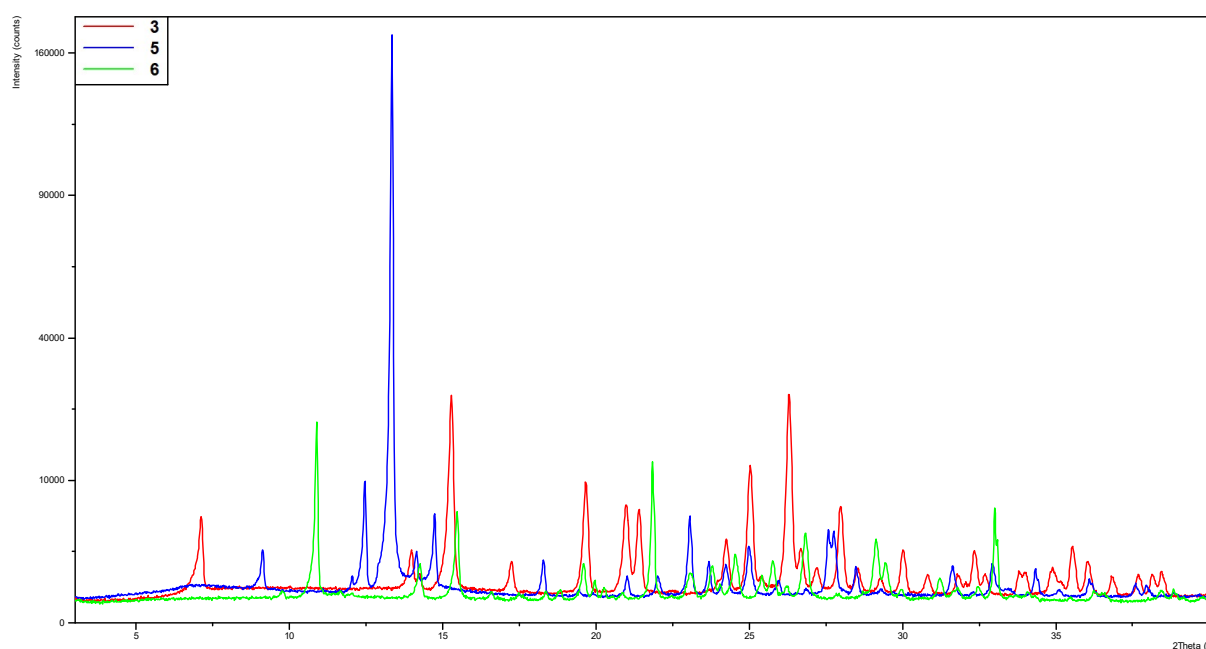
Struktura spoja **6** potvrđena je NMR-om te su riješeni NMR spektri uspoređeni s podacima dostupnim u literaturi.<sup>109</sup> Za dobiveni spoj **6** snimljen je i IR spektar, dok je čistoća određena UHPLC-om. Kao i u slučaju spoja **5**, snimljeni difraktogram upućuje na to da se radi o kristalnom uzorku (Slika 27).





Slika 27. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 6.

Spojevi 3, 5 i 6 razlikuju se samo prema strukturi jednog supstituenta: u slučaju spoja 6 na položaju dva benzenskog prstena nalazi se metoksi- skupina, a u spoju 5 na tom položaju je prisutna hidroksilna skupina, dok je u usporedbi sa spojem 3 u položaju pet benzenskog prstena umjesto aldehidne skupine prisutne u spoju 6, prisutna nitro-skupina. Navedene promjene u molekularnoj strukturi utjecale su i na promjenu u kristalnoj strukturi te se usporedbom difraktograma prahova vidi da spojevi 3, 5 i 6 nisu izostrukturani (Slika 28).

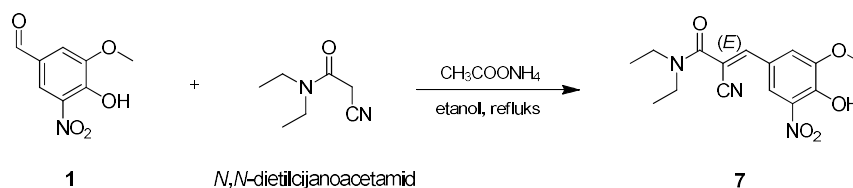


Slika 28. Usporedba difraktograma polikristalnih uzoraka spojeva 3, 5 i 6.

Također, otapanjem u sustavu otapala metanol/voda (8:2 *V/V*) te sporim hlapljenjem otapala dobiven je monokristal spoja **6**. Riješena je njezova kristalna struktura (određeni su položaji atoma u kristalnoj strukturi) te su podaci komentirani u poglavlju 4.2.

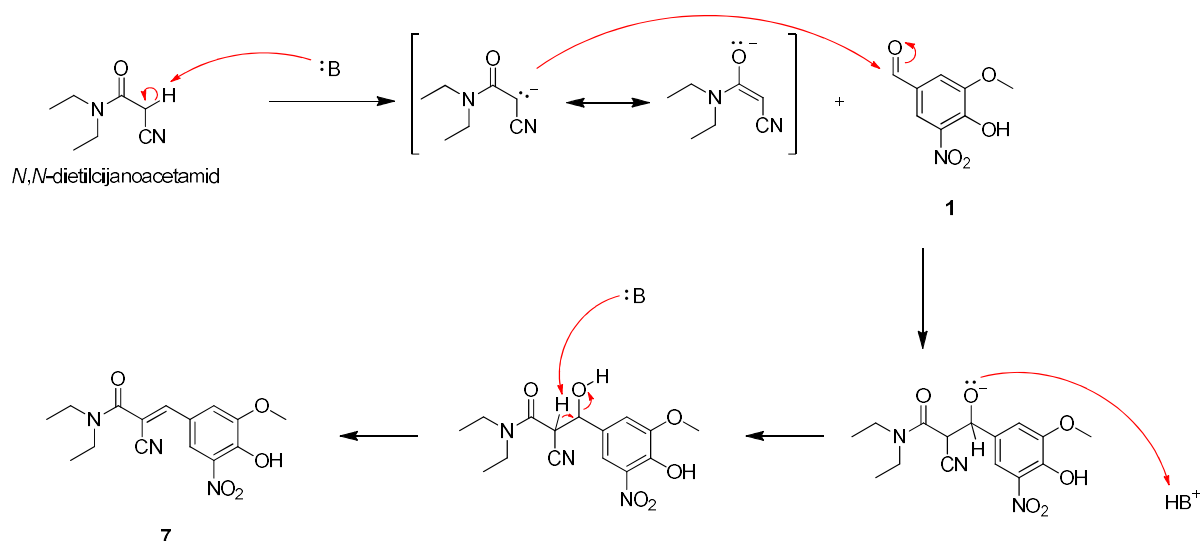
#### 4.1.7. Spoj 7

Spoj **7** pripremljen je Knoevenagelovom kondenzacijom 4-hidroksi-3-metoksi-5-nitrobenzaldehida i *N,N*-dietilcijanoacetamida uz prisutnost amonijevog acetata (Shema 18).



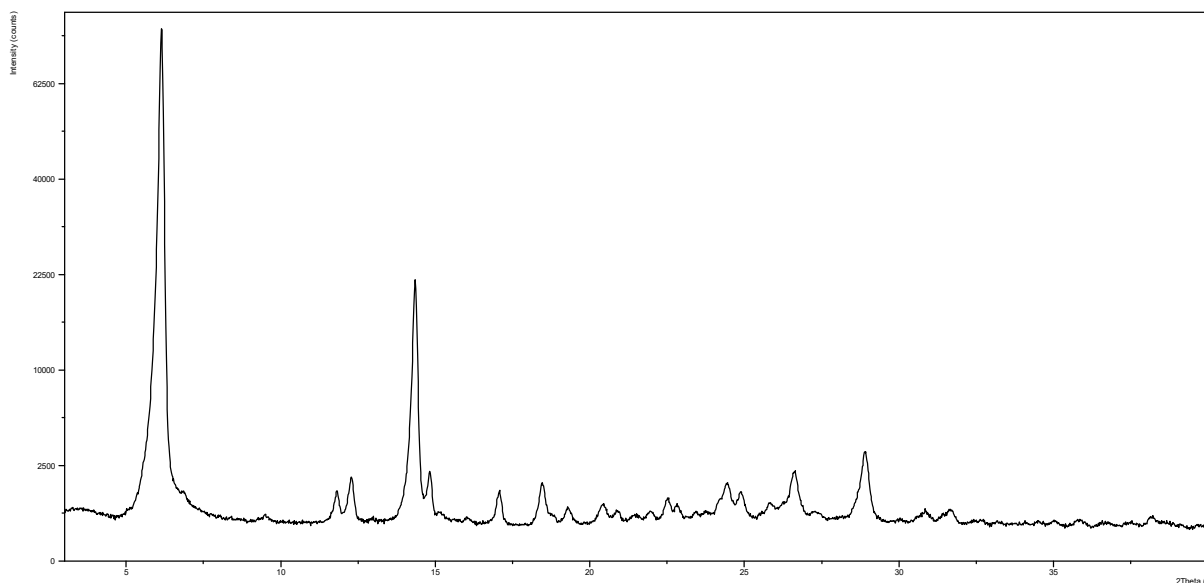
**Shema 18.** Priprava spoja **7**.

Reakcija se odvija prema predloženom mehanizmu (Shema 19).



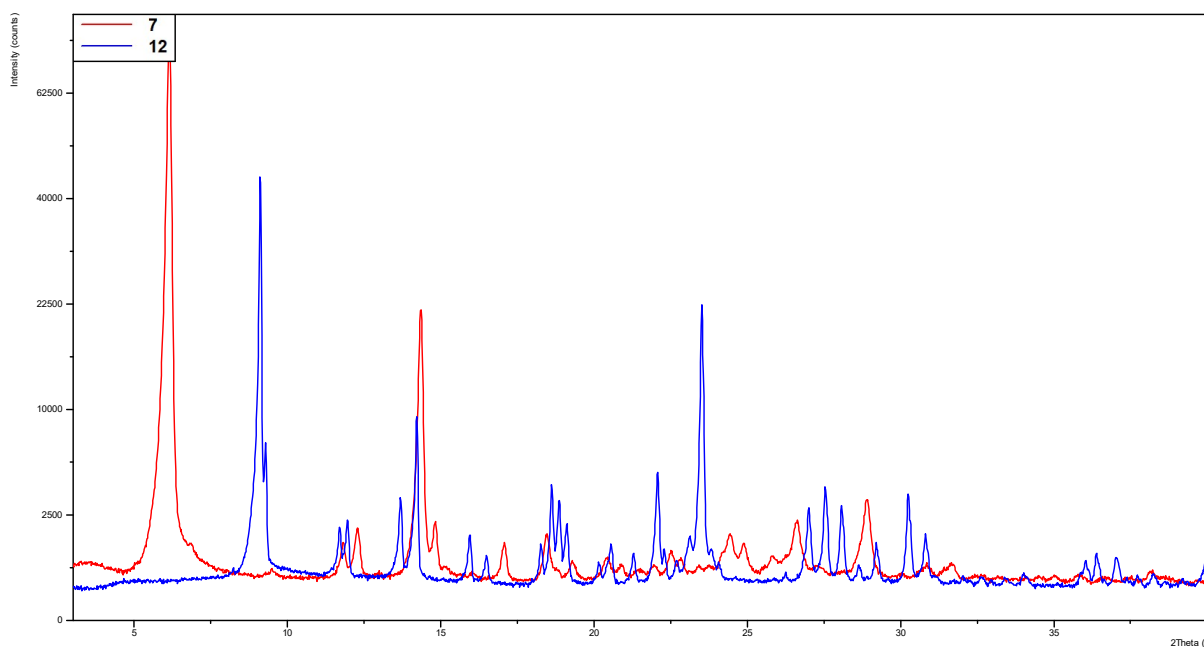
**Shema 19.** Predloženi mehanizam Knoevenagelove kondenzacije.

Knoevenagelovom reakcijom dolazi do kondenzacije između aldehida (ili ketona) sa spojem koji sadrži vodikov atom koji reagira u prisutnosti baze kao katalizatora pri čemu nastaje  $\alpha,\beta$ -nezasićeni spoj. Riješeni NMR spektri ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) pripremljenog spoja **7** poklapaju se sa spektrima objavljenim u literaturi.<sup>110</sup> Dodatno, za spoj **7** snimljen je i IR spektar te je čistoća uzorka određena UHPLC-om. Difraktogram spoja **7** ukazuje na kristalan spoj, međutim manje kristalan uz slabije izražene i šire difrakcijske maksimume (Slika 29).



Slika 29. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 7.

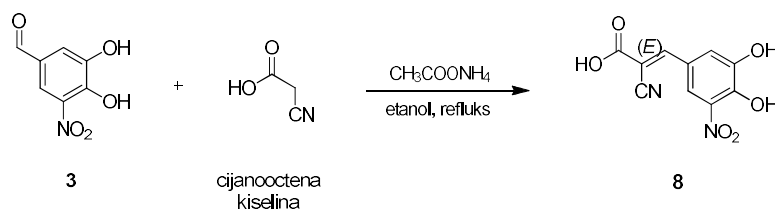
Spojevi 7 i 12 (entakapon) razlikuju se samo prema strukturi supstituenta u položaju 3 benzenskog prstena. Dok se u spoju 7 na položaju 3 benzenskog prstena nalazi metoksi-skupina, kod spoja 12 nalazi se hidroksilna skupina. Ta promjena u molekularnoj strukturi utjecala je i na promjenu u kristalnoj strukturi te se usporedbom njihovih difraktograma praha uočava da spojevi 7 i 12 nisu izostrukturalni (Slika 30).



Slika 30. Usporedba difraktograma polikristalnih uzoraka spojeva 7 i 12.

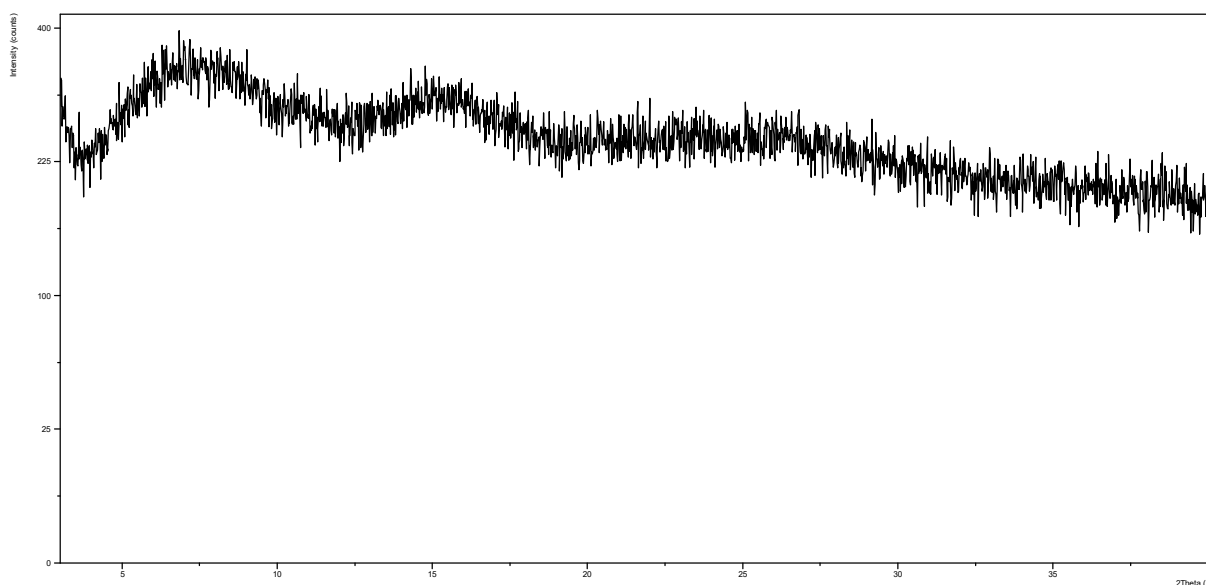
## 4.1.8. Spoj 8

Spoj 8 pripravljen je Knoevenagelovom kondenzacijom spoja 3 i cijanooctene kiseline uz prisutnost amonijevog acetata (Shema 20) prema prethodno predloženom i opisanom mehanizmu (Shema 19).



**Shema 20.** Priprava spoja 8.

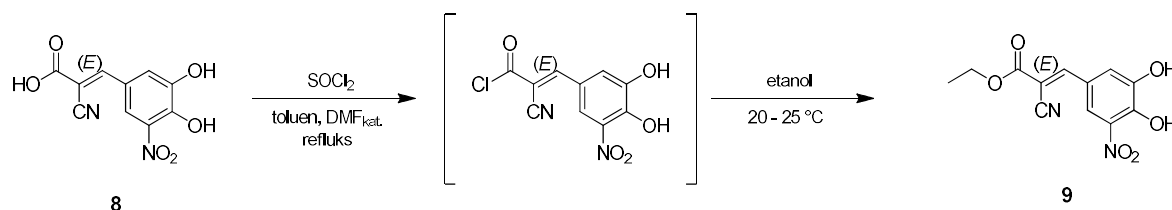
Struktura spoja 8 potvrđena je NMR-om i IR-om, a čistoća je određena UHPLC-om. Iz priloženog difraktograma vidljivo je da je spoj 8 amorfan (Slika 31).



**Slika 31.** Difraktogram uzorka spoja 8.

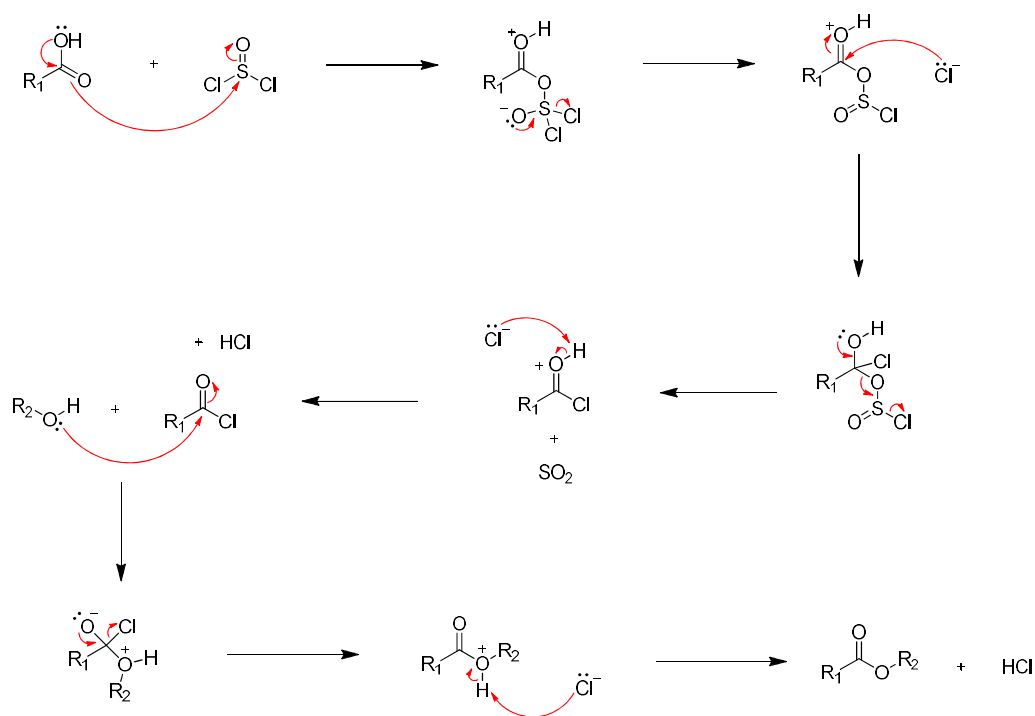
## 4.1.9. Spoj 9

Spoj 9 pripravljen je reakcijom karboksilne kiseline, spoja 8, s tionil-kloridom u toluenu uz prisutnost DMF-a kao katalizatora, nakon čega je, bez prethodne izolacije kiselinskog klorida, uslijedila nukleofilna supstitucija s etanolom (Shema 21).



Shema 21. Priprava spoja 9.

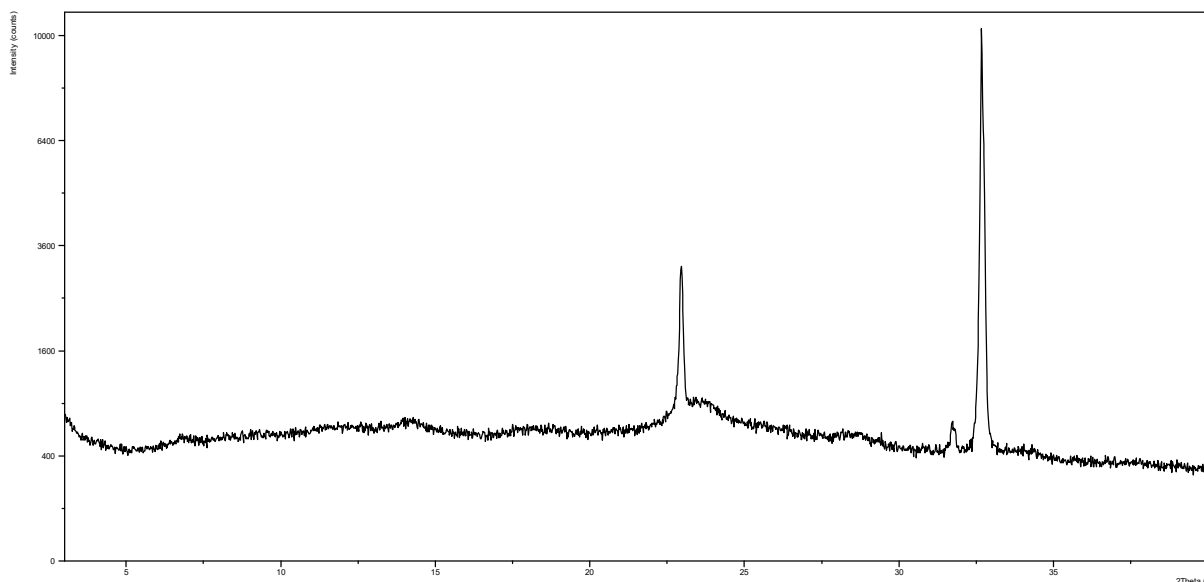
Reakcija se odvija prema predloženom mehanizmu prikazanom na Shemi 22. Priprava estera odvija se u dva stupnja. U prvome dolazi do adicije tionil-klorida na karboksilnu kiselinu nakon čega slijedi eliminacija i nastaje kiselinski klorid. U drugoj fazi dolazi do formiranja veze ugljik – kisik reakcijom esetrifikacije s alkoholom pri čemu kloridni ion izlazi iz strukture molekule. Posljednji korak je uklanjanje atoma vodika pri čemu nastaje ester i HCl. Mehanizam obje reakcije je mehanizam nukleofilne supstitucije.



Shema 22. Predloženi mehanizam pripreve kiselinskog klorida nakon čega slijedi esterifikacija.

Struktura spoja 9 potvrđena je NMR-om te je dodatna potvrda strukture usporedba s  $^1\text{H}$  NMR spektrom objavljenim u literaturi.<sup>76</sup> Pripravljenom spoju 9 snimljen je i IR spektar dok je čistoća određena UHPLC-om. Dobivena krutina spoja 9 je analizirana difrakcijom rentgenskih zraka (Slika 32). S obzirom da nije opažen znatan broj difrakcijskih maksimuma, vjerojatno se radi o

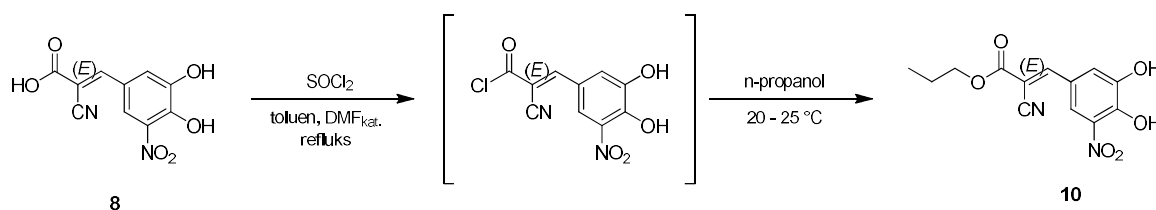
amorfnom stanju, dok su izraženi maksimumi posljedica možebitnih tragova anorganskih soli. Dodatna potvrda navede tvrdnje dobivena je usporedbom difraktograma uzoraka spojeva **9** i **10** (poglavlje 4.1.10, Slika 34), u kojima se javljaju isti snažno izraženi maksimumi pri kutovima iznad  $2\theta = 20^\circ$ .



Slika 32. Difraktogram uzorka spoja **9**.

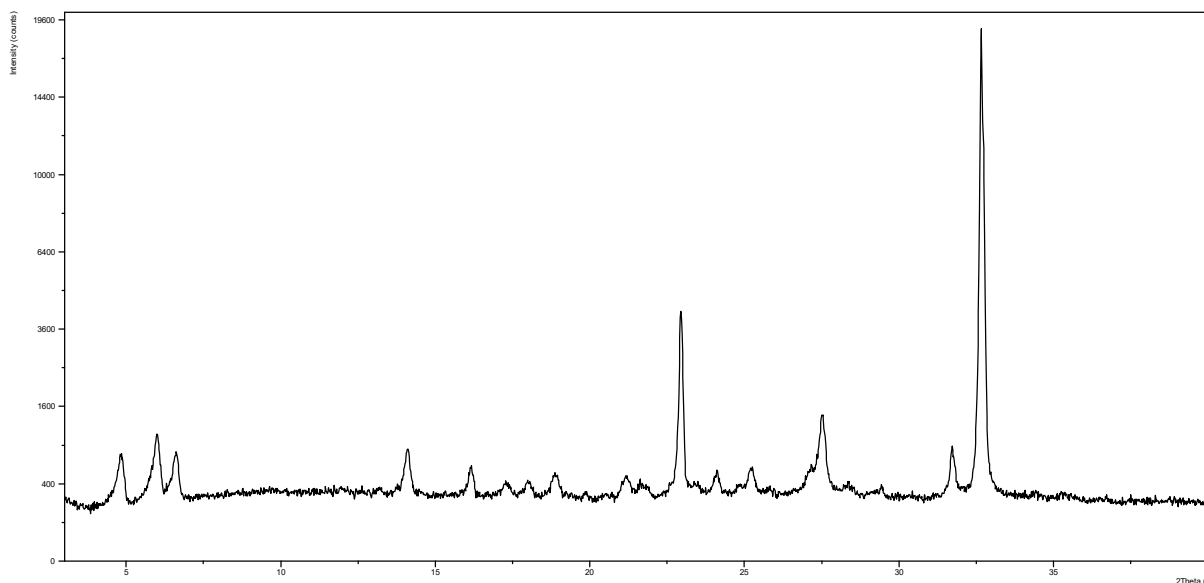
#### 4.1.10. Spoj **10**

Spoj **10** je kao i spoj **9** pripremljen sintezom kiselinskog klorida karboksilne kiseline (spoja **8**) s tionil-kloridom u toluenu uz prisutnost DMF-a kao katalizatora, nakon čega je uslijedila nukleofilna supstitucija s *n*-propanolom (Shema 23).



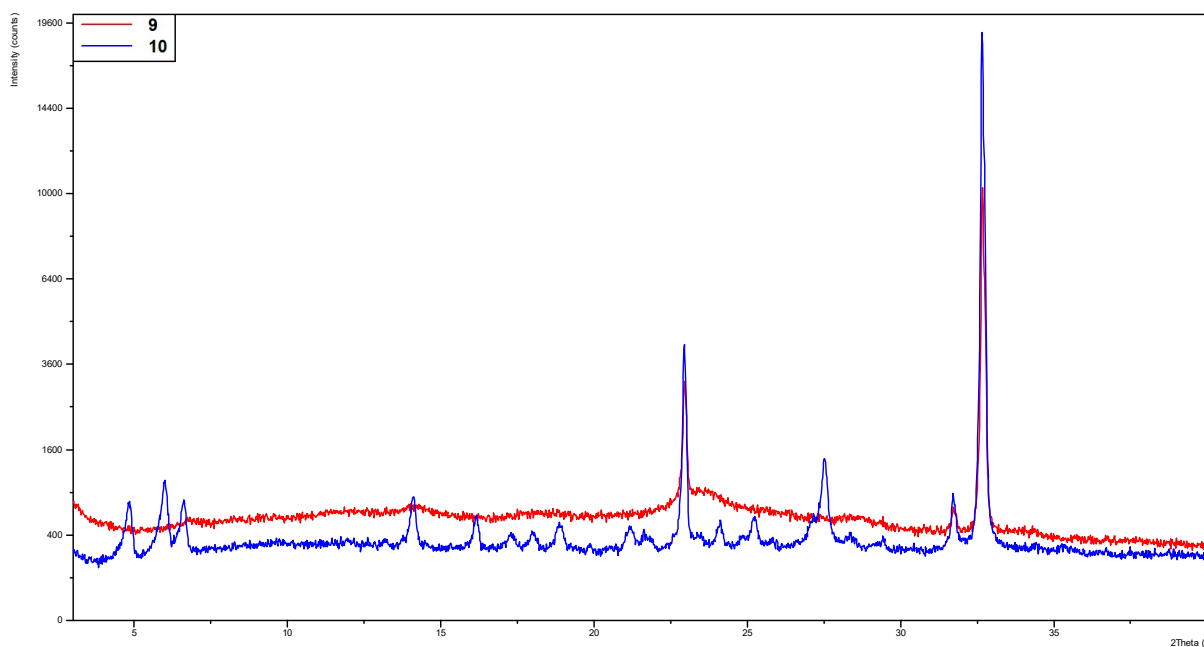
Shema 23. Priprava spoja **10**.

Reakcija se odvija prema prethodno predloženom mehanizmu prikazanom na Shemi 22. Struktura spoja **10** potvrđena je NMR-om i IR-om dok je čistoća određena UHPLC-om.<sup>71</sup> Difraktogram spoja **10** ukazuje na slabo kristalan spoj, s dva izražena maksimuma koji bi mogli biti posljedica tragova zaostalih anorganskih soli (Slika 33).



Slika 33. Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 10.

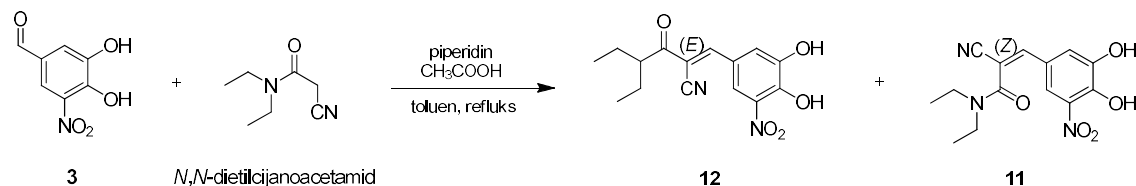
Spojevi 9 i 10 strukturno su slični pri čemu je jedina razlika u strukturi alkoksi-skupine esterskog dijela molekule. Kod spoja 9 prisutna je etoksi-skupina dok se u spoju 10 na istom položaju nalazi *n*-propoksi-skupina. Usporedba difraktograma spojeva 9 i 10 ukazuje na vjerojatnu prisutnost anorganskih soli (Slika 34) te je spoj 9 amorfni dok spoj 10 ima nekoliko slabih difrakcijskih maksimuma što bi upućivalo na djelomično kristalan uzorak.



Slika 34. Usporedba difraktograma uzorka spojeva 9 i 10.

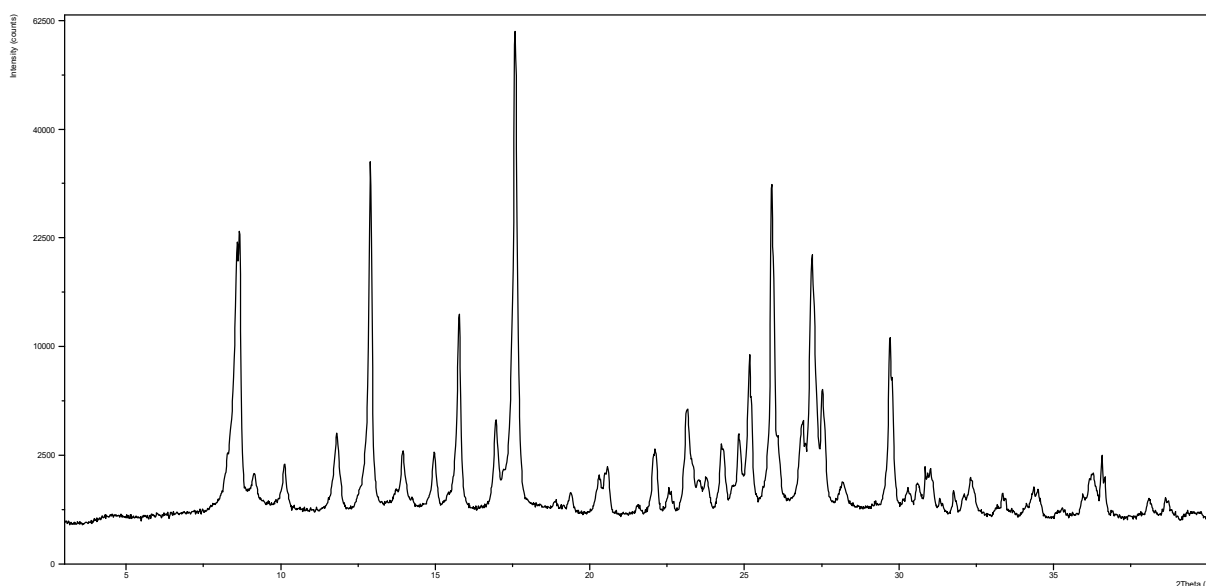
## 4.1.11. Spoj 11

Spoj 11 izoliran je iz matičnice nakon reakcije Knoevenagelove kondenzacije korištene za pripremu spoja 12 iz spoja 3 i *N,N*-dietilacijanoacetamida (Shema 24).



**Shema 24.** Priprava spojeva 11 i 12.

Prema predloženom mehanizmu (Shema 19) u reakciji nastaje *E*- i *Z*-izomer. Zahvaljujući uvjetima reakcije i izolacije, *Z*-izomer (spoj 11) koji nastaje u puno manjem postotku ostaje otopljen u matičnici te kristalizira njenim polaganim ukoncentriravanjem. Kristali spoja 11 izolirani su filtracijom nastalog taloga. Usporedbom pomaka riješenog NMR spektra spoja 11 s podacima iz literature dodatno je potvrđena struktura te *Z*-konfiguracija dobivenog spoja 11.<sup>71</sup> Čistoća spoja 11 određena je UHPLC-om te je istome snimljen i IR spektar. Za dobiveni spoj 11 napravljena je analiza difrakcijom rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 35).



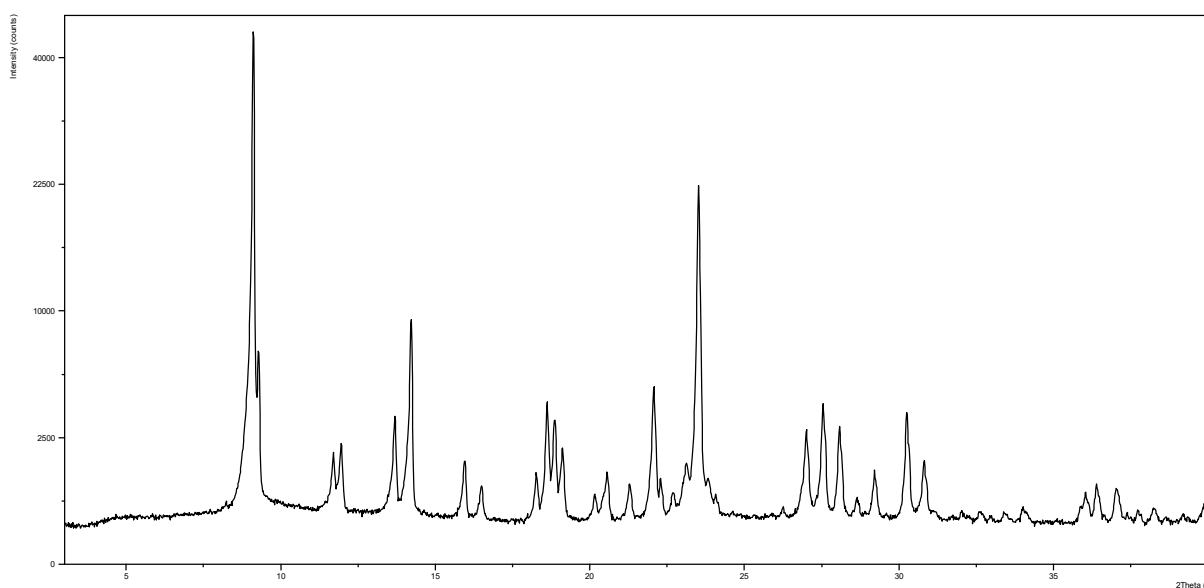
**Slika 35.** Difraktogram polikristalnog uzorka spoja 11.

## 4.1.12. Spoj 12 (entakapon)

Spoj 12 pripremljen je reakcijom Knoevenagelove kondenzacije spoja 3 s *N,N*-dietilacetamidom (Shema 24.). Reakcija se odvija prema ranije opisanom mehanizmu (Shema 19), a napreduje prema nastanku produkta zahvaljujući azeotropnom odvajanju vode koje pomiče ravnotežu

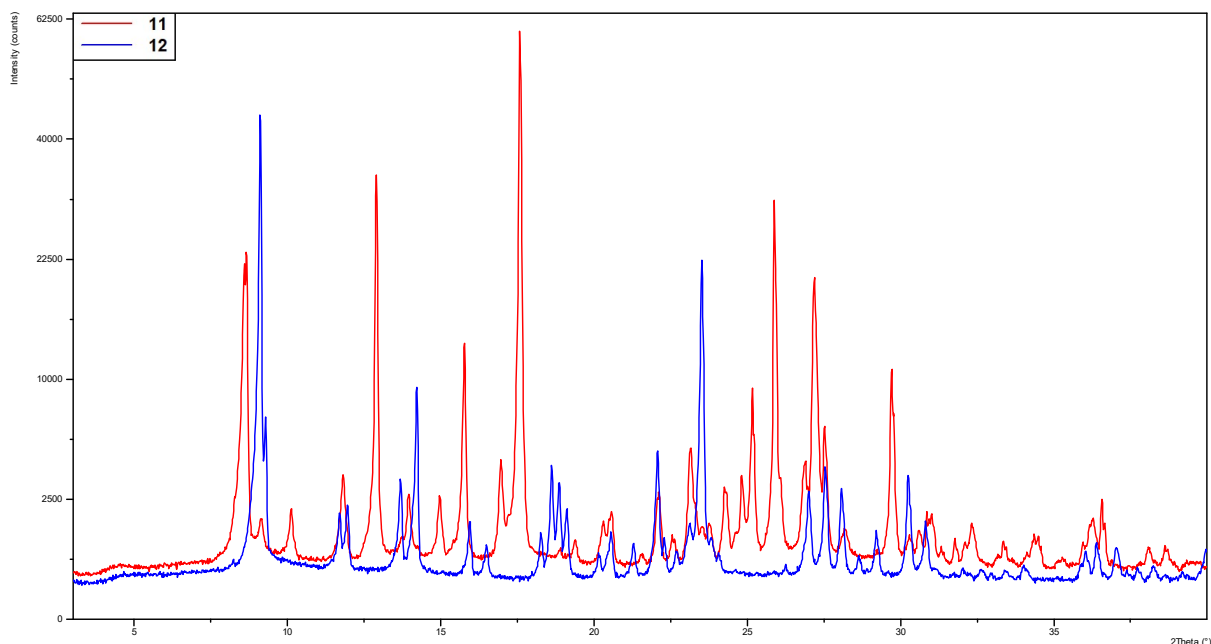


reakcije prema nastanku produkta. U reakciji nastaju dva izomera (*E* i *Z*), ali podešavanjem uvjeta reakcije i izolacije dolazi do kristalizacije *E*-izomera koji nastaje u većem postotku, dok *Z*-izomer ostaje otopljen u matičnici. Produkt **12** prekrizaliziran je iz metanola uz obradu aktivnim ugljenom nakon čega je izoliran potpuno čisti spoj **12**. Kao i za spoj **11**, *E*-konfiguracija je dodatno potvrđena usporedbom riješenog NMR spektra s literaturnim podacima.<sup>71</sup> Spoju **12** snimljen je i IR spektar, te je čistoća određena UHPLC-om. Također, spoj **12** je analiziran metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 36) te je usporedbom s rezultatima objavljenim u literaturi utvrđeno da se radi o formi A entakapona.<sup>72</sup>



**Slika 36.** Difraktogram polikristalnog uzorka spoja **12** (entakapon forma A).<sup>72, 84, 85</sup>

Spojivi **11** i **12** su izomeri te se razlikuju samo prema konfiguraciji oko dvostruke C=C veze. Difraktogrami oba spoja upućuju na različite kristalne strukture, što je dodatno potvrđeno činjenicom da su prilikom izolacije spoja **12** opažene razlike u topljivosti navedenih izomera te spoj **11** ostaje otopljen u matičnici (Slika 37).



Slika 37. Usporedba difraktograma polikristalnih uzoraka **11** i **12**.

Pripravljeno je ukupno 11 različitih spojeva srodnih entakaponu (prijavljena onečišćenja, međuprodukti ili polazni spojevi) te je napravljena potpuna karakterizacija svih načinjenih spojeva. Pripravljene spojevi su po potrebi prekrizalizirani kako bi se osigurala visoka čistoće te eliminirao mogući utjecaj drugih aditiva na ishod kristalizacije (Tablica 11, Slika 38). Isto tako, uspoređeni su i difraktogrami pripremljenih uzoraka. Iako su neki spojevi strukturno slični, nisu izostrukturalni te se svi difraktogrami razlikuju osim u slučaju spojeva **8** i **9** koji nisu dobiveni u kristalnoj već u amorfnoj formi.

Tablica 11. Pripremljeni srodni spojevi entakapona.

| Spoj     | Iskorištenje / % | UHPLC čistoća / A% | DSC / °C | Masa / g |
|----------|------------------|--------------------|----------|----------|
| <b>1</b> | 78,3             | 100,00             | 176,08   | 20,28    |
| <b>2</b> | 80,3             | 100,00             | 160,10   | 20,41    |
| <b>3</b> | 77,5*            | 100,00             | 142,28   | 3,25     |
| <b>4</b> | 91,7             | 100,00             | 150,17   | 18,33    |
| <b>5</b> | 59,1*            | 100,00             | 121,09   | 10,10    |
| <b>6</b> | 64,0*            | 100,00             | 166,40   | 14,63    |
| <b>7</b> | 79,2*            | 100,00             | 155,38   | 8,67     |

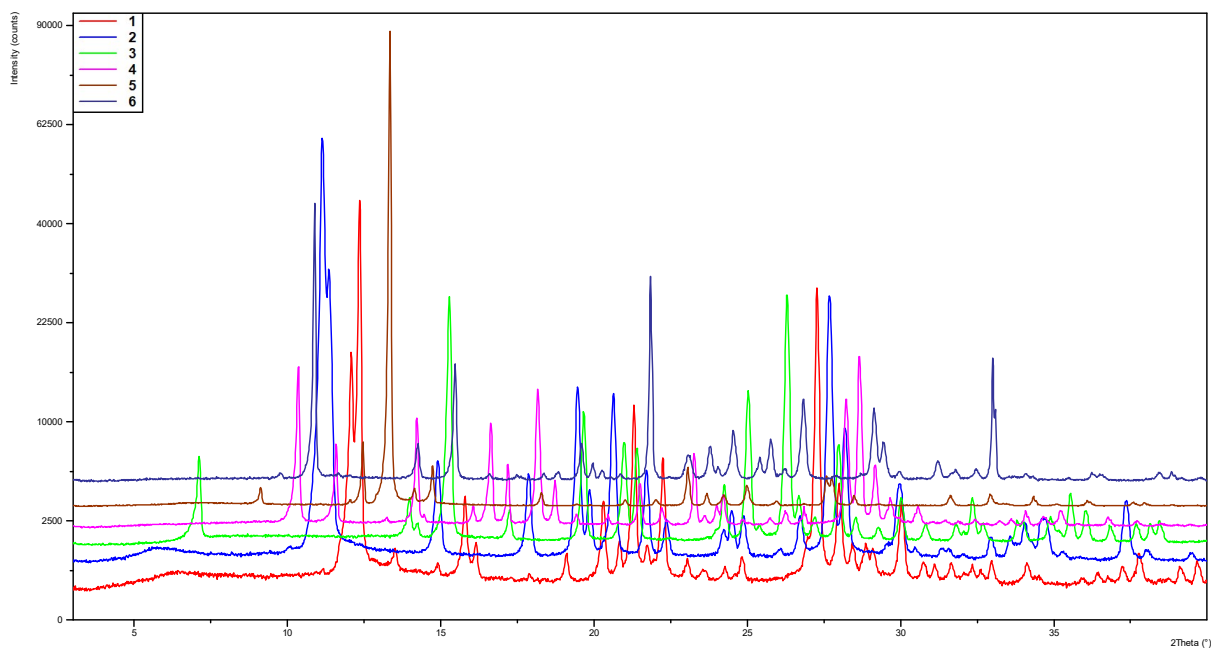
\* Iskorištenje nakon reakcije i prekrizalizacije

**Tablica 11.** (nastavak) Pripravljeni srodni spojevi entakapona.

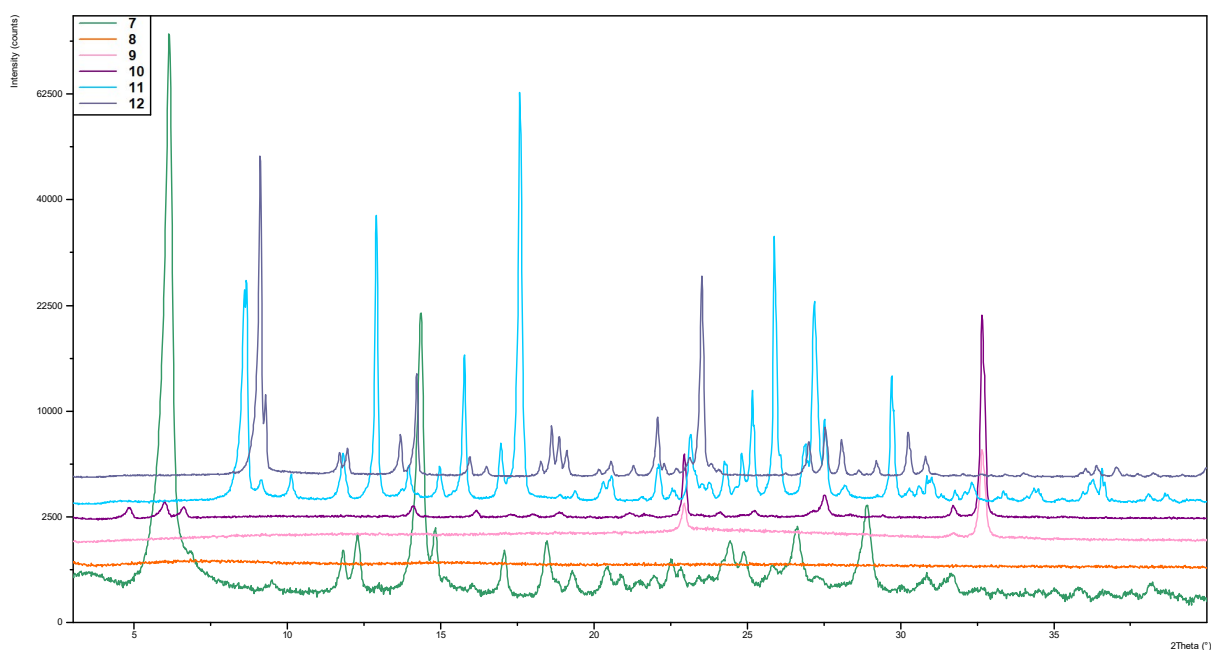
| <b>Spoj</b> | <b>Iskorištenje / %</b> | <b>UHPLC čistoća / A%</b> | <b>DSC / °C</b> | <b>Masa / g</b> |
|-------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>8</b>    | 48,8*                   | 100,00                    | 130,92          | 18,11           |
| <b>9</b>    | 57,7*                   | 100,00                    | 144,01          | 2,81            |
| <b>10</b>   | 49,8*                   | 100,00                    | 148,74          | 2,75            |
| <b>11</b>   | 4,4 <sup>#</sup>        | 100,00                    | 160,99          | 17,48           |
| <b>12</b>   | 50,4*                   | 100,00                    | 165,50          | 201,67          |

\* *Iskorištenje nakon reakcije i prekrystalizacije*

<sup>#</sup> *Spoj izoliran iz matičnice*



a)



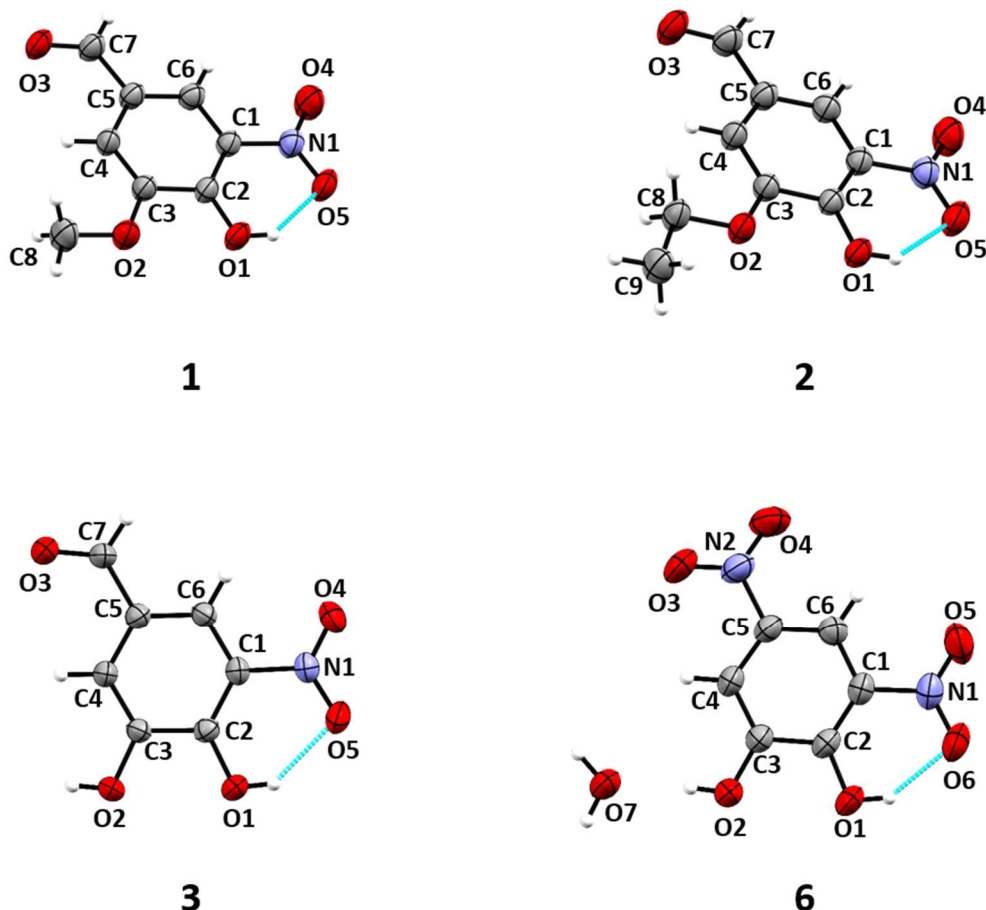
b)

**Slika 38.** Prikaz difraktograma uzoraka svih pripremljenih spojeva: a) spojevi **1 – 6**; b) spojevi **7 – 12**.

## 4.2. Kristalne strukture spojeva **1, 2, 3 i 6**

Spojevi **1 i 6** kristaliziraju u monoklinskom sustavu, dok spojevi **2 i 3** kristaliziraju u rompskom sustavu.<sup>101</sup> Od ova četiri spoja, jedino spoj **3** kristalizira u necentrosimetričnoj prostornoj grupi

$P2_12_12_1$ . U svim kristalnim strukturama prisutna je O–H $\cdots$ O intramolekulska vodikova veza između hidroksilne skupine i nitro-skupine koje su međusobno u *ortho*-položaju (Slika 39). Kristalografski podaci svih spojeva dani su u Tablici D1.

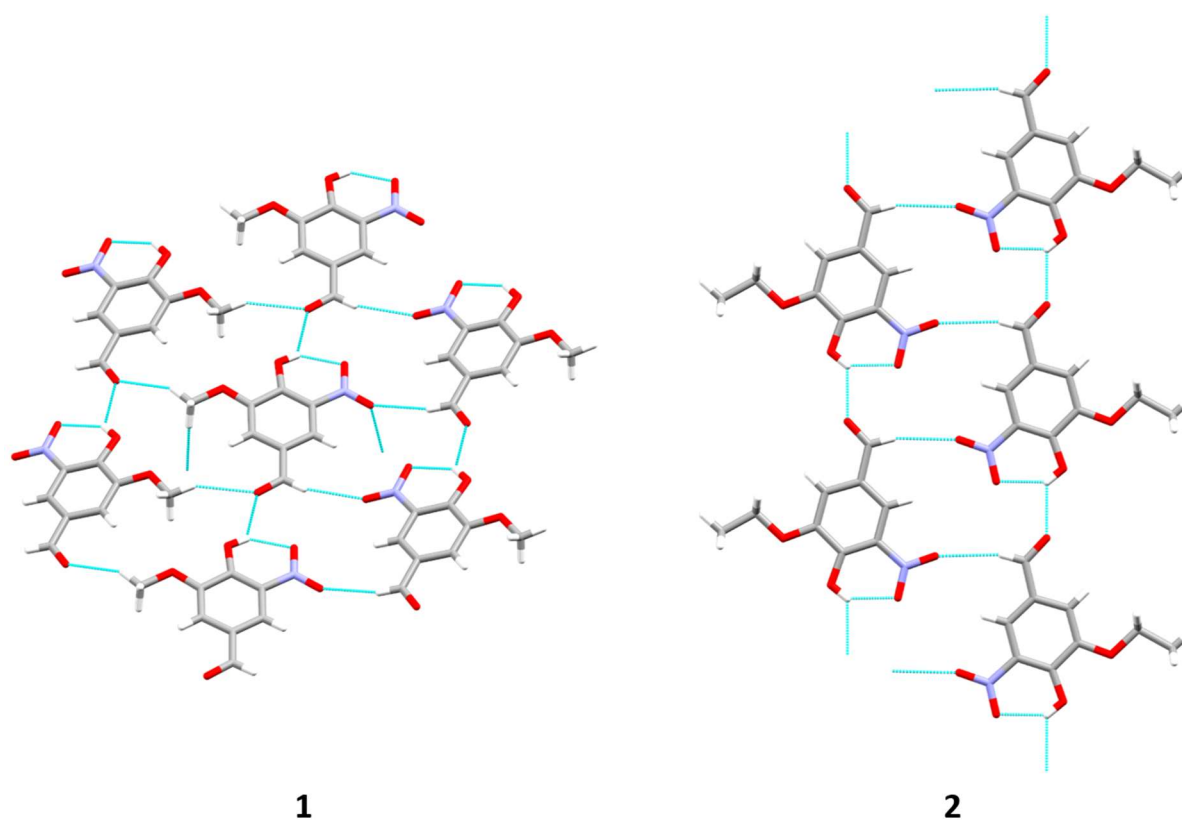


Slika 39. Intramolekulska O–H $\cdots$ O<sub>nitro</sub> vodikova veza u spojevima 1, 2, 3 i 6.

#### 4.2.1. Spojevi 1 i 2

Spojevi 1 i 2 sadrže po jednu hidroksilnu skupinu, nitro-skupinu, aldehydnu skupinu te alkoksiskupinu (metoksi-skupina kod spoja 1, etoksi-skupina kod 2). Hidroksilna skupina u oba spoja djeluje kao bifurkirani donator, odnosno sudjeluje u intramolekularnoj O–H $\cdots$ O vodikovoj vezi s nitro-skupinom i intermolekulskom O–H $\cdots$ O vodikovom vezom s karbonilnim atomom kisika susjedne molekule. Intermolekulskim vodikovim vezama, molekule spojeva 1 i 2 tvore beskonačni 1D lanac. U spoju 1 prisutne su i tri slabe C–H $\cdots$ O vodikove veze, koje s 1D lancima tvore dvostruke 2D slojeve (Slika 40), koji se u 3D strukturu povezuju disperznim interakcijama. U spoju 2 prisutna je samo jedna C–H $\cdots$ O vodikova veza, koja s 1D lancima O–

H···O vodikovih veza tvore dvostruke 1D lance, koji se dalje u 3D strukturu povezuju disperznim interakcijama. U Tablici 12 navedeni su parametri vodikovih veza spojeva **1** i **2**.

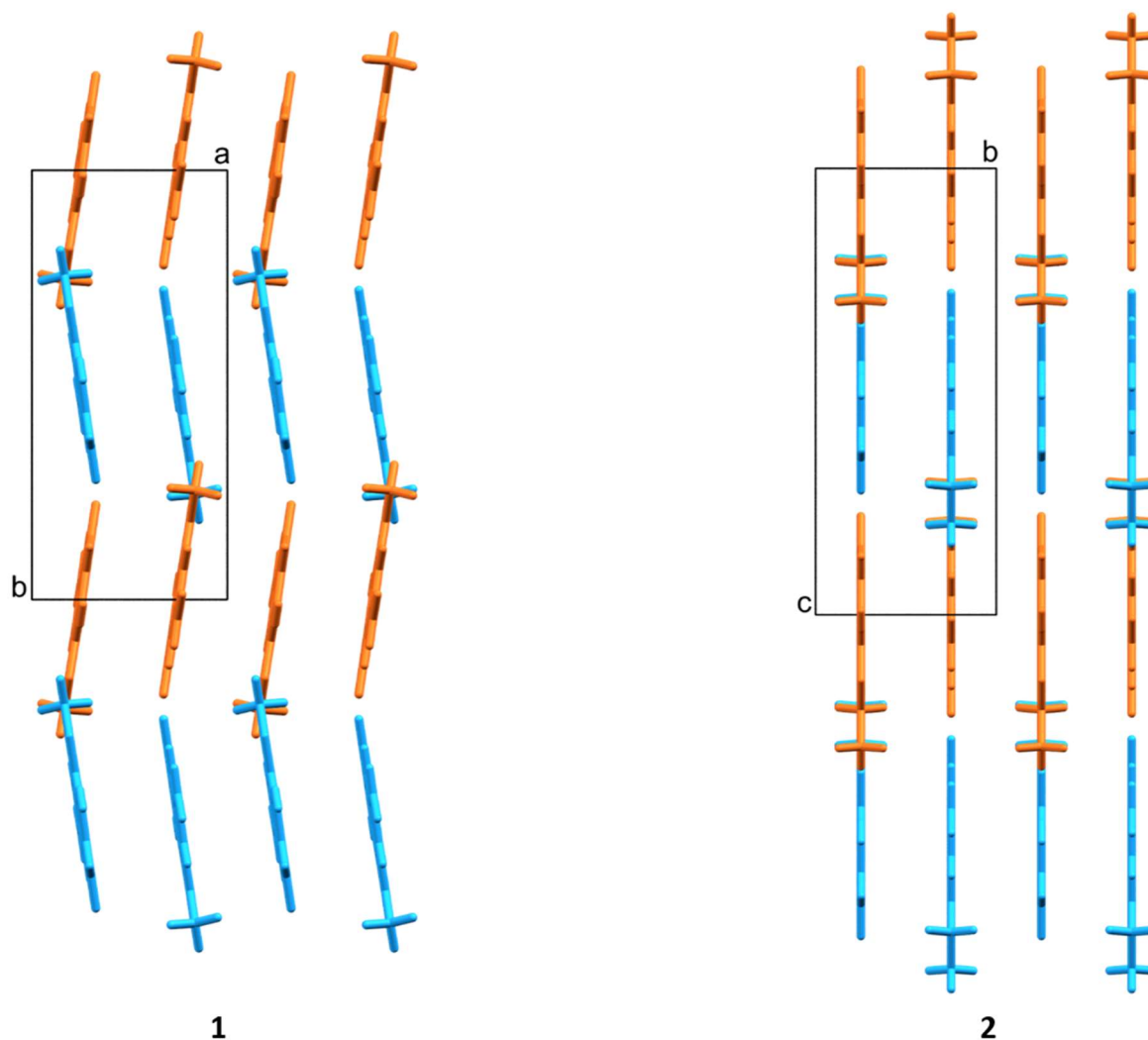


Slika 40. Vodikove veze u spojevima **1** i **2** prikazane svijetlo plavim linijama.

Tablica 12. Parametri vodikovih veza u spojevima **1** i **2**.

| $D-H\cdots A$    | $d(D-H\cdots A) / \text{Å}$ | $\angle(D-H\cdots A) / ^\circ$ |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>spoj 1</b>    |                             |                                |
| <b>O1-H···O3</b> | 2,6989(12)                  | 128                            |
| <b>O1-H···O5</b> | 2,6247(14)                  | 140                            |
| <b>C7-H···O4</b> | 3,4018(16)                  | 163                            |
| <b>C8-H···O3</b> | 3,4733(18)                  | 152                            |
| <b>C8-H···O4</b> | 3,476(2)                    | 156                            |
| <b>spoj 2</b>    |                             |                                |
| <b>O1-H···O3</b> | 2,7520(17)                  | 129                            |
| <b>O1-H···O5</b> | 2,6292(17)                  | 140                            |
| <b>C9-H···O4</b> | 3,472(2)                    | 164                            |

Iako je jedina razlika u strukturi spojeva **1** i **2** duljina lanca alkoksi-skupine, odnosno u jednoj metilenskoj skupini, postoji značajna razlika u kristalnom pakiranju ta dva spoja. Naime, spoj **1** kristalizira u monoklinskom sustavu, u prostornoj grupi  $P2_1/c$  te su susjedni 1D lanci duž kristalografske  $b$ -osi međusobno pod kutom od  $16,7^\circ$  (Slika 41). Spoj **2** pak kristalizira u rompskoj prostornoj grupi  $Pnma$  gdje sve molekule u kristalnoj strukturi leže na ravnini simetrije (Slika 41).

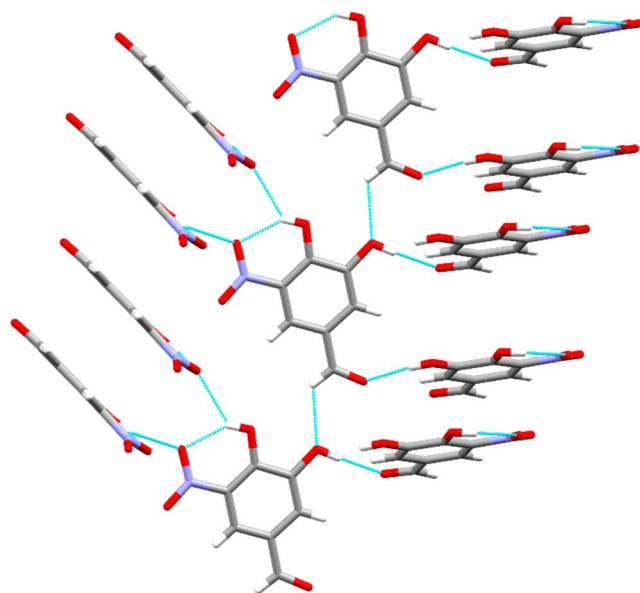


**Slika 41.** Kristalna pakiranja spojeva **1** i **2** u  $a$ - $b$ , odnosno  $b$ - $c$  ravnini. Radi preglednosti, susjedni slojevi označeni su različitim bojama.

#### 4.2.2. Spoj 3

Spoj **3** sadrži u svojoj strukturi dvije hidroksilne skupine, stoga ima i kompleksniju mrežu vodikovih veza u odnosu na spojeve **1** i **2**. Hidroksilna skupina u *ortho*-položaju u odnosu na nitro-skupinu djeluje kao bifurkirani donator te sudjeluje u intra- i intermolekulskim  $O1-H\cdots O5$

vodikovim vezama. Atom kisika O5 nitro-skupine djeluje kao bifurkirani akceptor vodikove veze te sudjeluje u istim intra- i intermolekulskim O1–H···O5 vodikovim vezama kao prethodno spomenuta hidroksilna skupina. Hidroksilna i aldehidna skupina u *meta*- položajima u odnosu na nitro-skupinu međusobno se povezuju vodikovim vezama pri čemu hidroksilna skupina djeluje kao donator u O2–H···O3 vodikovoj vezi, a aldehidna skupina u slaboj C7–H···O2 vodikovoj vezi (Slika 41). Navedene vodikove veze tvore 3D supramolekulsku mrežu. Parametri vodikovih veza navedeni su u Tablici 13. Molekule se pakiraju u koplanarne 2D slojeve disperznim interakcijama (Slika 42), a slojevi su međusobno pod kutom 86,4°, odnosno 62,0°.



Slika 42. Vodikove veze u spoju 3.

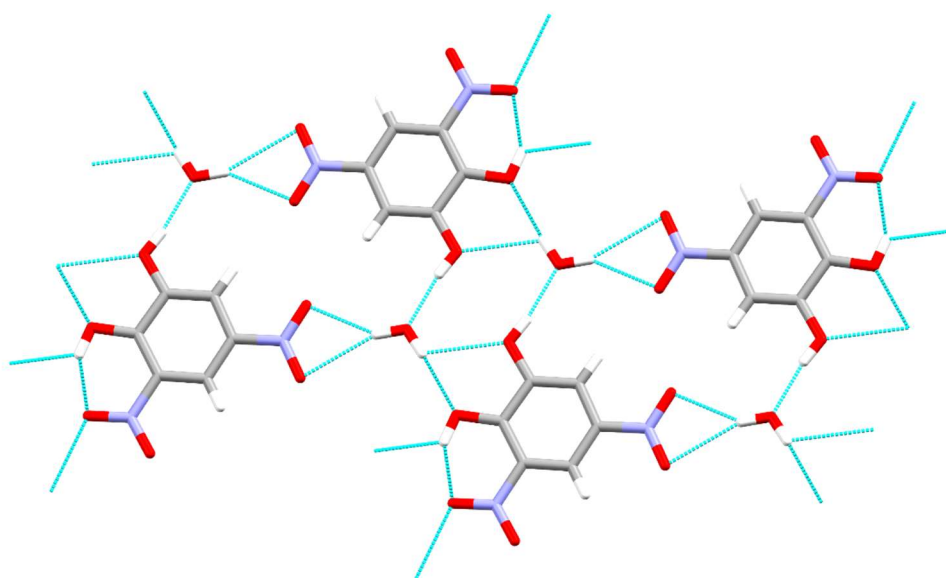
Tablica 13. Parametri vodikovih veza u spoju 3.

| $D-H\cdots A$                      | $d(D-H\cdots A) / \text{Å}$ | $\angle(D-H\cdots A) / ^\circ$ |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>O1–H···O5 (intramolekulska)</b> | 2,611(2)                    | 140                            |
| <b>O1–H···O5 (intermolekulska)</b> | 2,924(2)                    | 132                            |
| <b>O2–H···O3</b>                   | 2,728(2)                    | 173                            |
| <b>C7–H···O2</b>                   | 3,064(3)                    | 125                            |



#### 4.2.3. Spoj 6

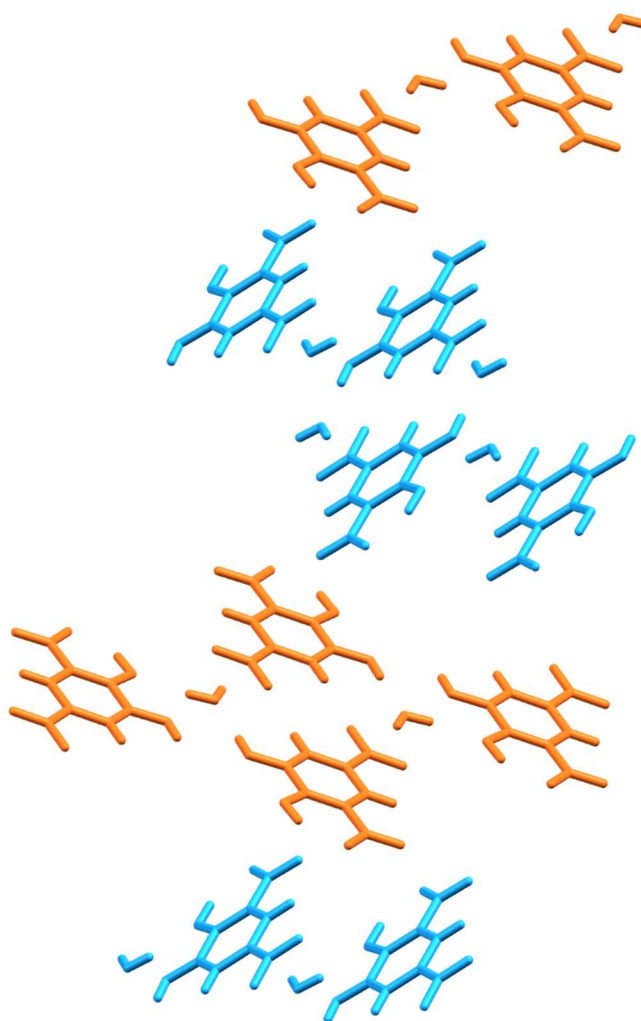
Spoj **6** jedini je kristaliziran kao solvat, odnosno hidrat. Molekule spoja **6** međusobno su premošćene molekulama vode s kojima tvore vodikove veze te na taj način tvore 2D slojeve (Slika 43). Molekula vode ostvaruje vodikovu vezu s kisikovim atomom O1 te s nitro-skupinom susjedne molekule koja nije uključena u intramolekulsku vodikovu vezu. U interakciji s nitro-skupinom molekula vode djeluje kao bifurkirani donator vodikove veze. Susjedni 2D slojevi međusobno su pod kutom od  $57,9^\circ$ , a povezani su prvenstveno  $O1-H\cdots O6_{\text{nitro}}$  vodikovim vezama (Slika 44) te tako tvore 3D strukturu. Geometrijski parametri vodikovih veza navedeni su u Tablici 14.



**Slika 43.** Povezivanje molekula spoja **6** i molekula vode vodikovim vezama u 2D sloj u kristalnoj strukturi.

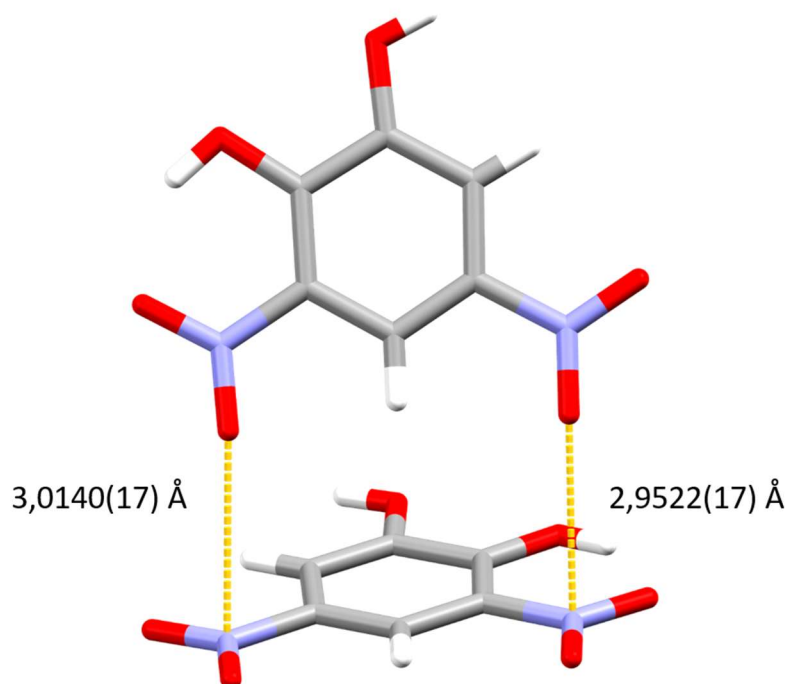
Tablica 14. Parametri vodikovih veza u spoju 6.

| $D-H\cdots A$                      | $d(D-H\cdots A) / \text{Å}$ | $\angle(D-H\cdots A) / ^\circ$ |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| O1-H $\cdots$ O6 (intramolekulska) | 2,5907(15)                  | 145,6(17)                      |
| O1-H $\cdots$ O6 (intermolekulska) | 2,9027(14)                  | 110,8(14)                      |
| O2-H $\cdots$ O7                   | 2,6301(14)                  | 170,4(18)                      |
| O7-H $\cdots$ O1                   | 2,9382(15)                  | 174,4(18)                      |
| O7-H $\cdots$ O2                   | 2,9611(14)                  | 115,6(14)                      |
| O7-H $\cdots$ O3                   | 2,9651(16)                  | 147(2)                         |
| O7-H $\cdots$ O4                   | 3,3213(16)                  | 159(2)                         |



**Slika 44.** Pakiranje 2D slojeva u kristalnoj strukturi spoja 6. Plavom i narančastom bojom naizmjenice su označeni susjedni slojevi.

Između slojeva su prisutne i druge međumolekulske interakcije. Primjerice, pakiranje slojeva potpomognuto je N–O⋯N dipol–dipol interakcijama u kojima sudjeluju obje nitro-skupine (Slika 45, Tablica 15). Relativno skraćenje neznatno je manje od sume van der Waalsovih radijusa atoma kisika i dušika (< 5 %).



Slika 45. Dipol–dipol interakcije između molekula spoja 6.

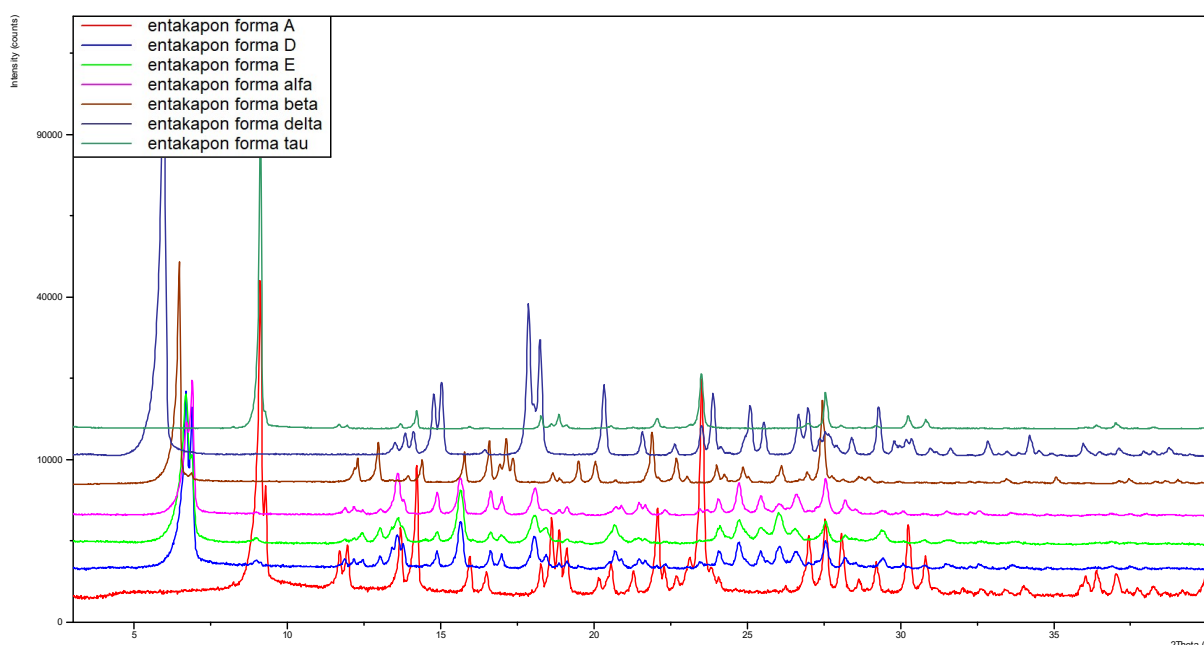
Tablica 15. Parametri dipol–dipol interakcija između molekula spoja 6.

| $D\cdots A$             | $d(D\cdots A) / \text{Å}$ |
|-------------------------|---------------------------|
| O4⋯N1 (intramolekulska) | 2,9522(17)                |
| O5⋯N2 (intermolekulska) | 3,0140(17)                |

Provedena strukturna analiza spojeva 1, 2, 3 i 6 ukazuje na značajan doprinos u stabilizaciji kristalnih struktura kroz povezivanje molekula vodikovim vezama. To čini dodatnu potporu hipotezi da srodni spojevi entakapona mogu utjecati na promjenu kristalne strukture tj. na varijabilnost polimorfije jer određene molekule mogu ostvariti dodatne interakcije s molekulom entakapona.

### 4.3. Priprava kristalnih formi entakapona

Da bi se potvrdila hipoteza o utjecaju srodnih spojeva entakapona na promjenu polimorfije bilo je potrebno ustvrditi koje se forme mogu pripremiti na temelju opisanih postupaka. Provedena je priprava poznatih formi entakapona, A, D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ .<sup>84-88</sup> Pokušaji pripreme forme C prema svim propisima dostupnima u literaturi nisu bili uspješni čak i uz više ponavljanja.<sup>84, 86</sup> Isto tako, forma  $\gamma$  nije dobivena iz nekoliko pokušaja ponavljanja jedinog dostupnog propisa iz literature.<sup>88</sup> Forma  $\varepsilon$  nije pripravljena zbog specifičnog načina pripreme koji nije primjenjiv na većim skalama te bi vrlo vjerojatno uzrokovalo pogrešku u ispitivanju utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije. Za sve uzorke pripremljenih kristalnih formi snimljen je IR spektar, te XRPD (Slika 46), DSC i TG.



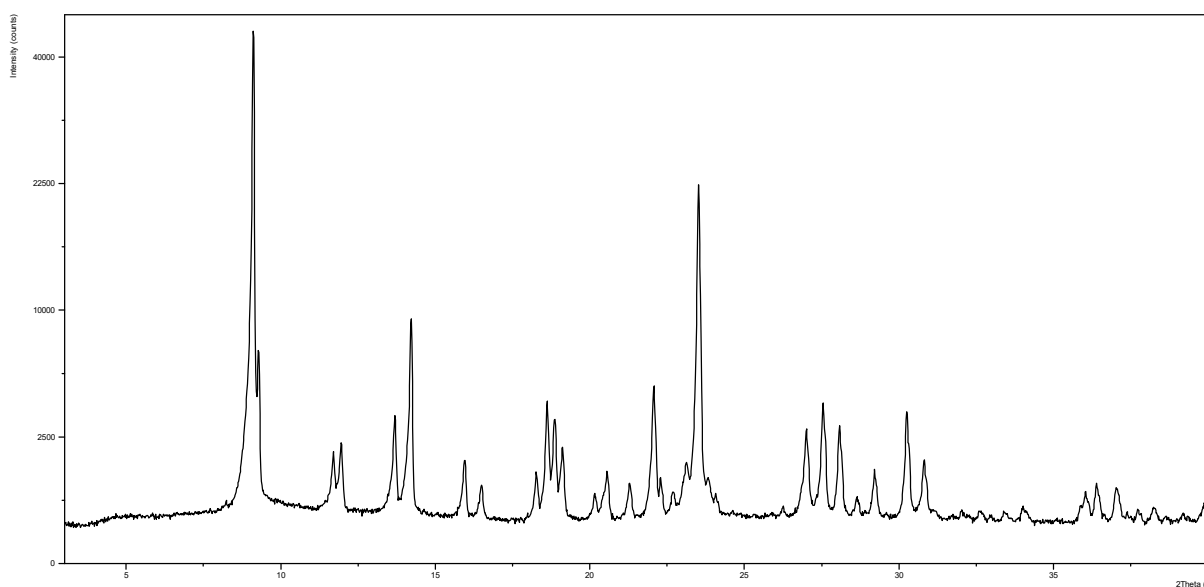
**Slika 46.** Usporedba difraktograma polikristalnih uzoraka pripremljenih formi entakapona.

Na temelju difrakcijskih pokusa, ustanovljeno je da se pripremljeni uzorci razlikuju, te je zahvaljujući tome potvrđeno da je difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku metoda izbora u određivanju ishoda kristalizacijskih pokusa.

#### 4.3.1. Entakapon Forma A

Forma A entakapona pripravljena je prekristalizacijom entakapona dobivenog sintezom opisanom u prethodnom poglavlju. Entakapon je otopljen u metanolu uz zagrijavanje te

polaganim hlađenjem dolazi do kristalizacije forme A. Dobivena forma A entakapona je analizirana difrakcijom rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 47).

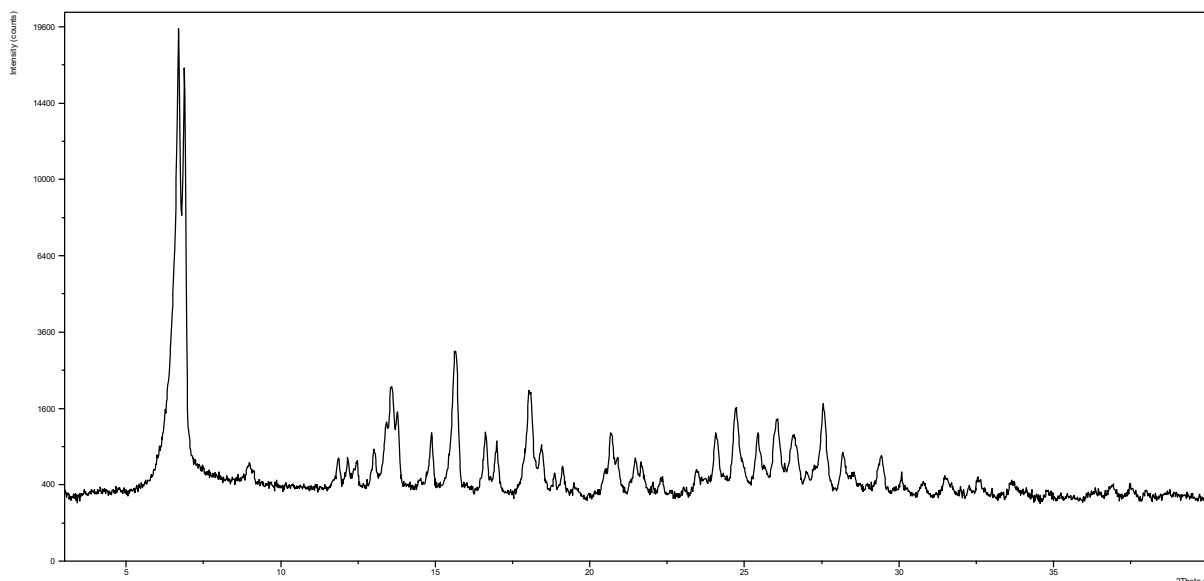


**Slika 47.** Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme A.<sup>72, 84, 85</sup>

Iz difraktograma praha forme A entakapona vidljiva su tri izražena karakteristična difrakcijska maksimuma na  $2\theta = 9,1^\circ$ ,  $14,2^\circ$  te  $23,5^\circ$  prema kojima će se lako ustvrditi prisutnost forme A u uzorku.<sup>70, 82, 83</sup>

#### 4.3.2. Entakapon Forma D

Forma D entakapona pripravljena je naglom precipitacijom entakapona. Entakapon (forma A) je otopljen u THF-u uz zagrijavanje te je dobivena otopina dodana u hladnu vodu pri čemu dolazi do precipitacije forme D. Pripravljene kristale forme D entakapona analizirani su metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 48).

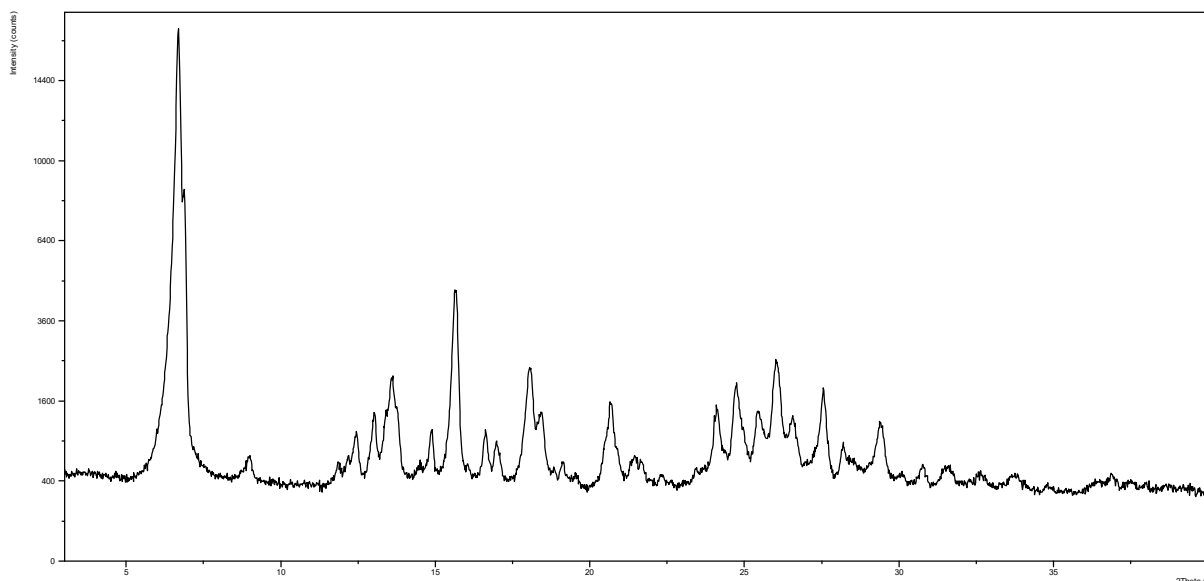


**Slika 48.** Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme D.<sup>84, 86, 87</sup>

Formu D karakteriziraju dva izražena difrakcijska maksimuma u području  $2\theta = 6,7 - 6,9^\circ$ .<sup>84, 86, 87</sup> Difraktogram forme D entakapona sličan je difraktogramima entakapona forme E i  $\alpha$ , međutim moguće ju je razlikovati zbog odsutnosti određenih maksimuma (vidi poglavlje 4.3.5.).

#### 4.3.3. Entakapon Forma E

Forma E entakapona također je pripravljena naglom precipitacijom entakapona. Entakapon (forma A) otopljen je u THF-u uz zagrijavanje te je dobivena otopina dodana u ohlađeni *n*-heksan pri čemu dolazi do precipitacije forme E. Dobivena forma E entakapona analizirana je metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 49).

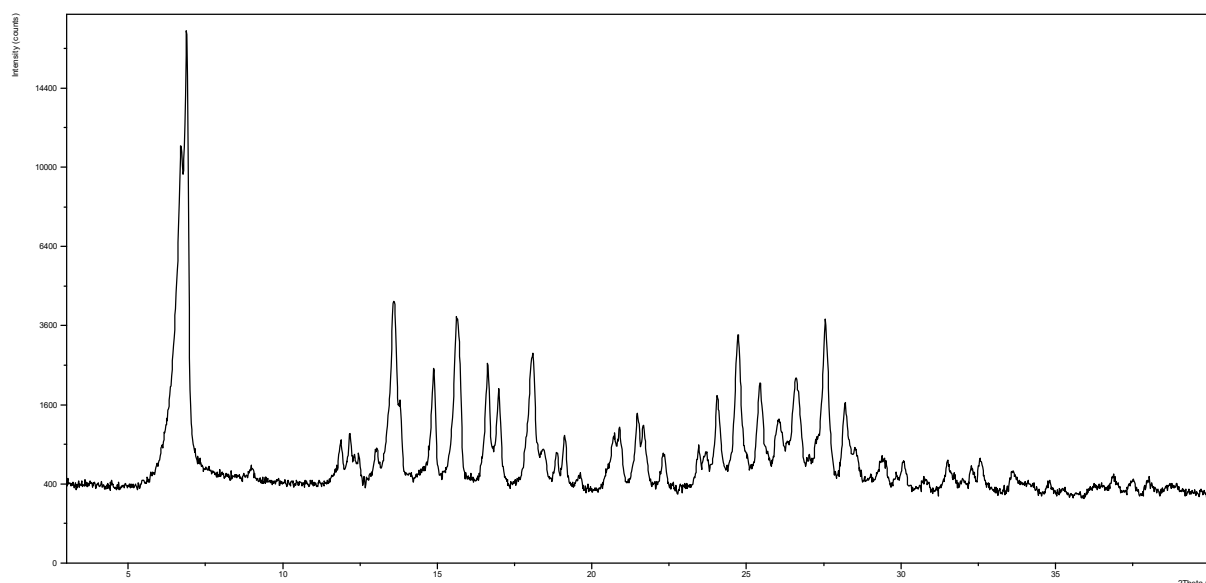


Slika 49. Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme E.<sup>86</sup>

Difraktogram polikristalnog uzorka forme E karakterizira izraženi maksimum na  $2\theta = 6,6^\circ$  te jedan manje izraženi na  $20,5^\circ$  zahvaljujući kojima je moguće ustvrditi prisutnost forme E u uzorcima.<sup>86</sup>

#### 4.3.4. Entakapon Forma $\alpha$

Forma  $\alpha$  entakapona pripravljena je na sličan način kao i forma D, naglom precipitacijom entakapona iz sustava THF/voda. Entakapon (forma A) otopljen je u THF-u uz zagrijavanje te je dobivena otopina dokapana u hladnu vodu pri čemu dolazi do precipitacije forme  $\alpha$ . Mala razlika u procesu (omjer otapala i brzina dodatka otopine entakapona) dovodi do nastanka druge forme. Pripravljena forma  $\alpha$  entakapona je analizirana metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 50).

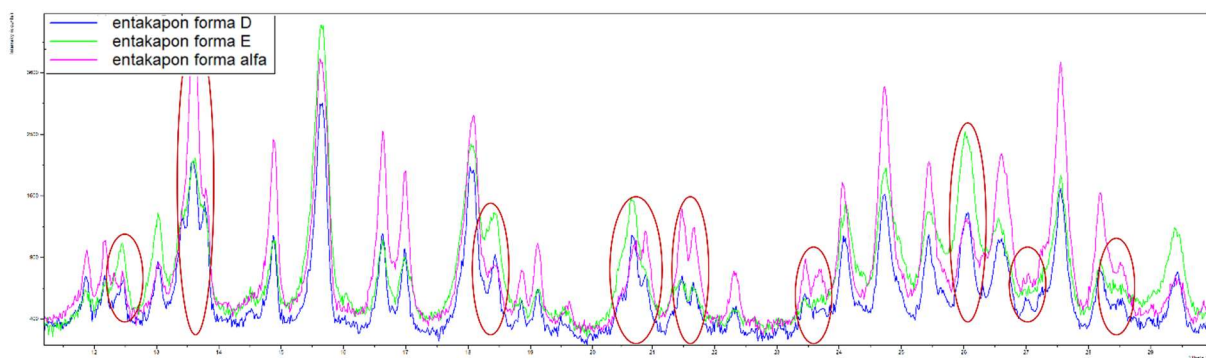


Slika 50. Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme  $\alpha$ .<sup>88</sup>

Formu  $\alpha$  entakapona karakterizira izraženi maksimum na  $2\theta = 13,6^\circ$  te na  $24,7^\circ$  te ju je moguće razlikovati od forme D i forme E.<sup>88</sup>

#### 4.3.5. Razlikovanje kristalnih formi D, E i $\alpha$ entakapona

Kao što je i ranije navedeno, difraktogrami polikristalnih uzoraka formi D, E i  $\alpha$  entakapona su slični te je bilo potrebno utvrditi difrakcijske maksimume koji bi pridonijeli preciznom utvrđivanju o kojoj se formi radi. Detaljnim pregledom difraktograma pronađena su područja u kojima je moguće razlikovati navedene kristalne forme (Slika 51).



Slika 51. Usporedba difraktograma polikristalnih uzoraka formi D, E i  $\alpha$  s naglaskom na područja u kojima su prisutne razlike u maksimumima.



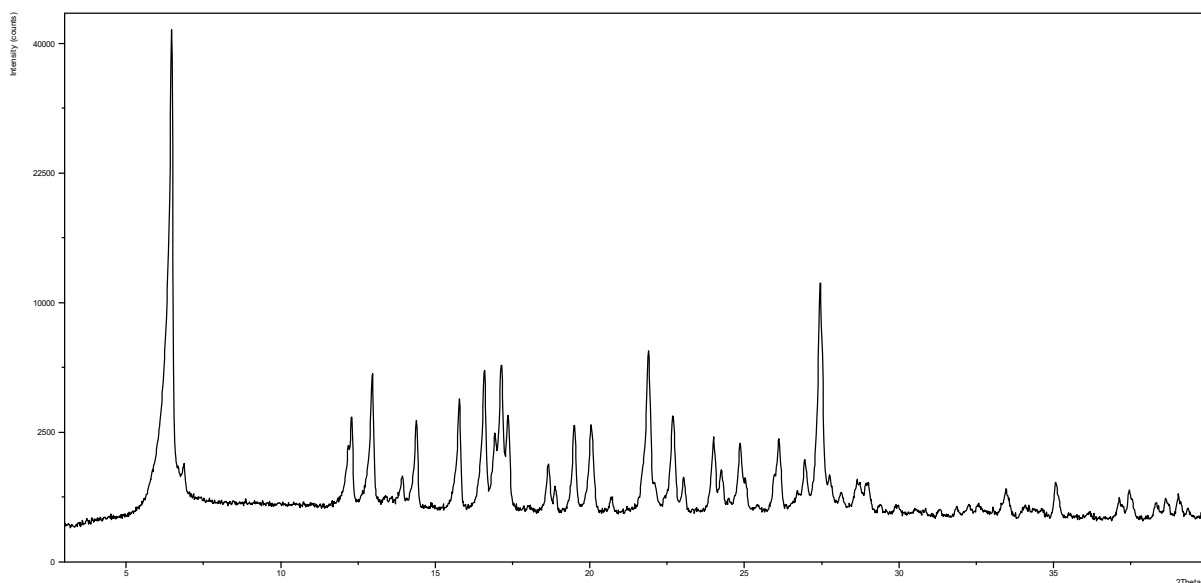
Dodatna potvrda u utvrđivanju razlika između kristalnih formi D , E i  $\alpha$  je razlika u talištu (Tablica 16) te je u određenim slučajevima rađena i DSC analiza kako bi se potvrdila prisutnost forme određene difraktogramom.

**Tablica 16.** Razlike u talištima kristalnih formi D, E i  $\alpha$ .

| Forma    | DSC / °C |
|----------|----------|
| D        | 159,6    |
| E        | 158,9    |
| $\alpha$ | 177,3    |

#### 4.3.6. Entakapon Forma $\beta$

Forma  $\beta$  entakapona pripravljena je naglom precipitacijom entakapona. Entakapon (forma A) otopljen je u *n*-propanolu uz zagrijavanje te je dobivena otopina dodana u hladnu vodu pri čemu dolazi do precipitacije forme  $\beta$ . Pripravljene kristale forme  $\beta$  entakapona analizirani su difrakcijom rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 52).

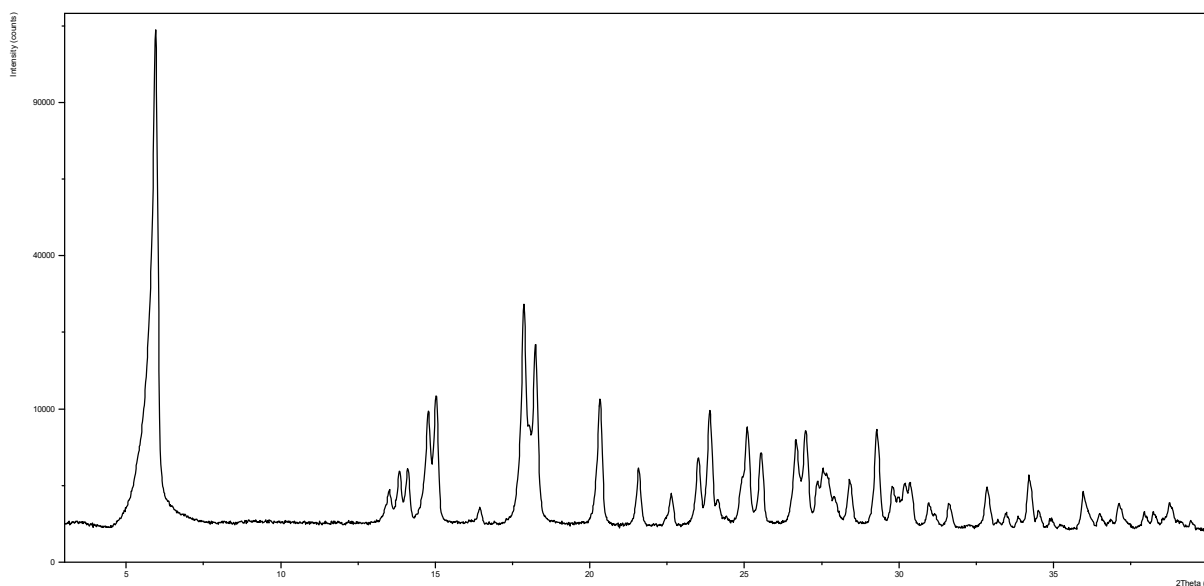


**Slika 52.** Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme  $\beta$ .<sup>88</sup>

Iako je metoda pripreme forme  $\beta$  entakapona slična pripravi formi D, E i  $\alpha$ , difraktogram forme  $\beta$  značajno se razlikuje od difraktograma navedenih formi te se lako može prepoznati na temelju dva jaka maksimuma na  $2\theta = 6,5^\circ$  i  $27,5^\circ$ .<sup>88</sup>

#### 4.3.7. Entakapon Forma $\delta$

Forma  $\delta$  entakapona pripravljena je precipitacijom entakapona. Entakapon (forma A) otopljen je u cikloheksanonu uz zagrijavanje, otopina je ohlađena na sobnu temperaturu te je dodana u *n*-heptan na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do precipitacije forme  $\delta$ . Dobivena forma  $\delta$  entakapona je analizirana metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 53).

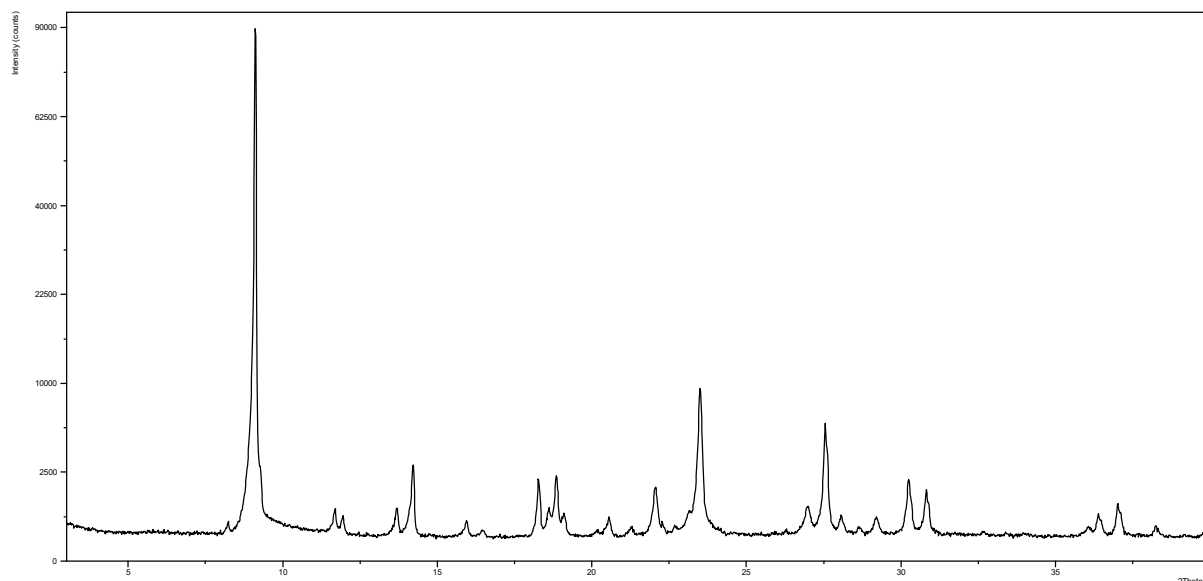


Slika 53. Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme  $\delta$ .<sup>88</sup>

Difraktogram polikristalnog uzorka forme  $\delta$  entakapona se bitno razlikuje od ostalih formi te ju je lako prepoznati prema karakterističnim maksimumima na  $2\theta = 5,9^\circ$ ,  $14,7^\circ$  i  $15,0^\circ$ .<sup>88</sup>

#### 4.3.8. Entakapon Forma $\tau$

Forma  $\tau$  entakapona pripravljena je naglom precipitacijom entakapona. Entakapon (forma A) otopljen je u propan-2-olu uz zagrijavanje te je u dobivenu otopinu dodan zagrijani *n*-heksan pri čemu dolazi do precipitacije forme  $\tau$ . Pripravljena forma  $\tau$  entakapona je analizirana metodom difrakcije rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (Slika 54).



Slika 54. Difraktogram polikristalnog uzorka entakapon forme  $\tau$ .<sup>88</sup>

Formu  $\tau$  karakterizira maksimum velikog intenziteta na  $2\theta = 9,0^\circ$  te jedan manji na  $2\theta = 27,5^\circ$ .<sup>88</sup> S obzirom da se većina maksimuma forme  $\tau$  poklapa s maksimumima forme A, prisutnost forme A moguće je utvrditi prisutnošću maksimuma na  $2\theta = 9,3^\circ$ ,  $20,2^\circ$  te  $21,3^\circ$  koji nisu detektirani u difraktogramu uzorka forme  $\tau$ .

#### 4.4. Ispitivanje utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije

Provedeno je ispitivanje utjecaja pripremljenih onečišćenja (spojevi navedeni u Tablici 11) na ishod kristalizacije svake pojedine forme entakapona. Pretraživanjem literature nije pronađen niti jedan literaturni navod koji bi ukazao na sustavan pristup u istraživanju utjecaja srodnih spojeva na pojavu polimorfije. Ta činjenica otvorila je mogućnost da se metodologija razradi i provjeri na modelnom sustavu entakaponu na način kako je opisano u poglavlju 3.29.

Prilikom sinteze većine organskih molekula, a pogotovo djelatnih tvari, u reakcijskoj smjesi mogu biti prisutni različiti srodni spojevi: nusprodukti reakcija, neizreagirani polazni spojevi te međuprodukti u različitim koncentracijama. Zbog iskoristivosti procesa te potreba za zadovoljavanjem zahtjeva regulatornih agencija udio tih onečišćenja prije izolacije i pročišćavanja u pravilu se kreće u rasponu masenih udjela od 0,1 – 10 %. Prisutni neželjeni spojevi mogu se nalaziti u otopljenom obliku, ali se isto tako, zbog određenih razlika u topljivosti, mogu i istaložiti te kao takvi poslužiti kao klica u kristalizaciji željenog spoja. Iz tog

razloga odabrane su obje metodologije ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije (cijepljenje i metoda obogaćenog uzorka) u rasponu masenih udjela onečišćenja od 0,1 – 5 %.

Postoji velik broj parametara koji mogu utjecati na ishod procesa kristalizacije: veličina i oblik tikvice/reaktora, dimenzije, geometrija i tip miješala, brzina miješanja, promjene u temperaturi, duljina miješanja, brzina i trajanje dokapavanja, kvaliteta tj. potencijalne deformacije ili oštećenja stjenke reaktora, itd. Tijekom dizajna pokusa kristalizacije uvijek se nastoji smanjiti broj parametara koji se ne kontroliraju da bi se izbjegao neželjeni utjecaj i smanjila varijabilnost ishoda kristalizacije. S obzirom da je broj mogućih parametara velik i nemoguće je uvijek potpuno kontrolirati sve parametre, pokusi koji su pokazali polimorfno drugačiji rezultat od očekivanog ponovljeni su tri puta da se potvrdi da je uzrok promjene utjecaj onečišćenja a ne potencijalna pogreška u izvođenju pokusa.

#### 4.4.1. Entakapon Forma A

Prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 3.14), forma A entakapona dobiva se prekristalizacijom iz metanola te su pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije provedeni na način da je onečišćenje otopljeno zajedno s entakaponom (obogaćeni uzorak) pri povišenoj temperaturi. Hlađenjem dolazi do kristalizacije. Ishod provedenih pokusa prikazan je u Dodatku, Tablici D2, Slika D1.

Prilikom pripreme forme A nije uočen utjecaj onečišćenja na drugačiji polimorfni ishod kristalizacije sa svim ispitanim srodnim spojevima. S obzirom da je forma A termodinamički stabilna forma te je postupak za dobivanje klasična kristalizacija, ovakav rezultat provedenih pokusa bio je i očekivan. Iz pokusa se vidi određeni utjecaj na iskorištenje izoliranih kristala forme A entakapona. U pokusima bez dodanih onečišćenja iskorištenje se kreće od 80 – 84 %, dok je ono u pokusima s dodanim onečišćenjima u rasponu od 69 – 84 % te se može zaključiti da u slučaju onečišćenja **7** (strukturno sličan spoj entakaponu; iskorištenje 69 %) dolazi do povećanja topljivosti entakapona u takvom sustavu. Razlika u strukturi samo je u jednoj hidroksilnoj skupini benzenskog prstena entakapona te je u slučaju onečišćenja **7** pristuna metoksi-skupina u položaju 3 benzenskog prstena. S obzirom da je kristalna struktura forme A entakapona riješena te je dokazana prisutnost vodikovih veza preko kojih se ostvaruju kontakti s drugim molekulama entakapona u kristalnoj strukturi, vjerojatno u slučaju onečišćenja **7** dolazi do dodatnih interakcija između molekula onečišćenja i molekula entakapona što je utjecalo na iskorištenje.

#### 4.4.2. Entakapon Forma D

Prema postupku opisanom u poglavlju 3.15 te u literaturi, forma D entakapona dobiva se brzim dodatkom otopine entakapona u THF-u u hladnu vodu pri čemu dolazi do naglog taloženja kristala.<sup>86</sup> Pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije provedeni su na način da je onečišćenje suspendirano u hladnoj vodi prije dodatka otopine entakapona (cijepljenje) ili je otopljeno zajedno s entakaponom u THF-u pri povišenoj temperaturi (obogaćeni uzorak) te je takva vruća otopina dodana u hladnu vodu. Sličnim postupkom (dodatak otopine entakapona u hladno antiotapalo) dobiva se više kristalnih formi entakapona (D, E,  $\alpha$  i  $\beta$ ) te je bilo potrebno temeljito istražiti moguće ishode kako bi se prikupilo dovoljno informacija za usporedbu s ishodom pokusa za navedene kristalne forme. Ishodi svih provedenih pokusa su prikazani u Dodatku, Tablici D3 te Slici D2.

Dok u većini pokusa nije došlo do varijabilnosti kristalne forme, ona je detektirana u slučaju onečišćenja **6** (smjesa formi D i A) te u slučaju onečišćenja **11** (čista forma A) u pokusima cijepljenja i obogaćenog uzorka s onečišćenjima pri masenom udjelu od 5 %. Prilikom smanjenja količine onečišćenja na samo 0,1 % cijepljenog onečišćenja **11** također je dobivena samo čista forma A (Dodatak, Slika D3). Činjenica da pri tako niskim količinama prisutnih aditiva dolazi do utjecaja na varijabilnost polimorfije te dovodi do nastanka druge kristalne forme daje dodatni razlog da se u farmaceutskoj industriji ulože veliki naponi prilikom ispitivanja polimornog ponašanja molekula prilikom kristalizacije. S obzirom na zakonski propisane dopuštene granice onečišćenja koja se kreću u količinama od 0,15 % (w) za poznata te 0,10 % (w) za nepoznata onečišćenja, pokusi pokazuju da je moguće da i pri tako malim količinama dođe do varijabilnosti kristalne forme, odnosno do utjecaja srodnih spojeva ili aditiva na ishod kristalizacije.

U slučaju onečišćenja **11** koje je strukturno slično entakaponu (*E* i *Z* izomeri) dolazi do nastanka čiste, termodinamički stabilne forme, forme A. U slučaju da je potrebno razviti industrijski postupak pripreme forme D entakapona, posebna bi se pažnja trebala obratiti na kontrolu onečišćenja **11** koje nastaje u zadnjem koraku pripreme entakapona te lako može biti prisutno u kristalizacijskom sustavu i time dovesti do neželjenog nastanka forme A. Forma A bi se prema ICH smjernicama smatrala onečišćenjem te bi takva situacija dovela do odstupanja u procesu što bi dovelo do dorade ili ponovne obrade pripremljenog materijala. Takve situacije u farmaceutskoj industriji nisu poželjne jer iziskuju dodatne napore, potencijalno veliki financijski trošak te utrošak energije i radne snage. Stoga je potrebno ponovno naglasiti važnost

ispitivanja svih parametara te uzeti u obzir i prisutnost onečišćenja dozvoljenih količina i njihov mogući utjecaj na ishod kristalizacije.

Utjecaj onečišćenja na iskorištenje izoliranih uzoraka forme D nije uočen te se ono kreće u svim pokusima u rasponu od 85 – 90 %.

#### 4.4.3. Entakapon Forma E

Forma E entakapona se prema literaturi dobiva brzim dodatkom THF otopine entakapona u hladni *n*-heksan pri čemu dolazi do naglog taloženja kristala.<sup>86</sup> Proces pripreme forme E entakapona ne razlikuje se previše od procesa pripreme forme D, jedina razlika je u antiotapalu prisutnome u sustavu (*n*-heksan umjesto vode). Pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije provedeni na način da je onečišćenje suspendirano u hladnom *n*-heksanu prije dodatka otopine entakapona (cijepljenje) ili otopljeno zajedno s entakaponom u THF-u na povišenoj temperaturi (obogaćeni uzorak) te je takva otopina dodana u čisti hladni *n*-heksan. Ishod provedenih pokusa je prikazan u Dodatku u Tablici D4, Slika D4.

Pokusi cijepjenja onečišćenja pri masenim udjelima od 5 % i 1 % pokazali su varijabilnost forme u slučaju onečišćenja **4** (smjesa formi E i  $\delta$ ), **7** (smjesa formi E, A i  $\beta$ ) i **11** (smjesa formi E i A). Prilikom kristalizacije forme E s onečišćenjima čak u tri pokusa je došlo do promjene polimorfije. Onečišćenje **4** u svojoj strukturi ima obje hidroksilne skupine benzenskog prstena zamijenjene s metoksi-skupinama. Onečišćenje **7** strukturno je slično entakaponu te je također jedna od hidroksilnih skupina benzenskog prstena zamijenjena metoksi-skupinom. Kako je od ranije poznato, entakapon u svojoj kristalnoj strukturi ostvaruje kontakte preko vodikovih veza što objašnjava moguće poremećaje prilikom nukleacije koji dovode do varijabilnosti polimorfije.<sup>89</sup>

Kao i u slučaju forme D, onečišćenje **11** dovelo je do nastanka forme A. Međutim, u ovom sustavu nije nastala čista forma već smjesa forme E i forme A. Jedan od mogućih razloga zašto je manja topljivost entakapona u sustavu THF/*n*-heksan što dodatno potvrđuje i činjenica da je iskorištenje izoliranih kristala oko 10 % veće nego u sustavu THF/voda. Prilikom znatnog smanjenja količine onečišćenja na svega 0,1 % (*w*) utjecaj je opažen samo u slučaju onečišćenja **4** (smjesa formi E i  $\delta$ ) dok u slučaju onečišćenja **7** i **11** on potpuno izostaje te je izolirana čista forma E. Iznenadujuće, u pokusima s obogaćenim uzorkom, utjecaj na varijabilnost kristalizirane forme nije opažen. Utjecaj onečišćenja na iskorištenje nije uočen te se ono kreće u rasponu od 90 – 95 % što upućuje na slabu topljivost entakapona u ovom kristalizacijskom sustavu.

#### 4.4.4. Entakapon Forma $\alpha$

Kako je i opisano u literaturi i provjereno na temelju vlastitih istraživanja, forma  $\alpha$  se dobiva sporim dodatkom THF otopine entakapona u hladnu vodu pri čemu dolazi do taloženja kristala.<sup>88</sup> Iako je postupak pripreme forme  $\alpha$  gotovo identičan postupku pripreme forme D, zahvaljujući malim razlikama u koncentracijama te u brzini dodatka otopine entakapona u antiotapalo, ipak se dobiva jednoznačno dobiva forma  $\alpha$  s malim razlikama u difraktogramu praha, ali i velikom razlikom u talištu prema DSC-u. Pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije rađeni na način da je onečišćenje suspendirano u vodi prije dodatka otopine entakapona (cijepljenje) ili otopljeno zajedno s entakaponom u THF-u na povišenoj temperaturi (obogaćeni uzorak) te je takva otopina dodana u čistu hladnu vodu. Iako su ovakvi postupci neuobičajeni i ponekad nepraktični na industrijskom mjerilu, ukoliko su iscrpljene sve opcije ipak se pristupa razvoju procesa dodatka otopine u antiotapalo. U slučaju pripreme forme  $\alpha$ , prvo je potrebno pripremiti otopinu entakapona u THF-u što je moguće samo uz zagrijavanje. Ta otopina se zatim hladi na sobnu temperaturu te takva dodaje u ohlađeno antiotapalo. Takvi metastabilni sustavi (prezasićeno stanje) prilikom uvećanja mogu dovesti do neočekivanih problema ponajviše u vidu moguće kristalizacije u reaktoru ili cjevovodu kroz kojeg se dalje otopina dovodi do reaktora u kojem se provodi kristalizacija. Unatoč tome, na maloj skali i mjerilu puno je jednostavnije kontrolirati sve parametre pa su pokusi provedeni bez varijacija ili neočekivanih ishoda. Rezultati provedenih pokusa je prikazan u Dodatku u Tablici D5., Slika D5.

Prilikom cijepjenja s onečišćenjima pri masenom udjelu od 5 % došlo je do varijabilnosti kristalne forme sa onečišćenjima **1** (smjesa formi  $\alpha$  i  $\delta$ ), **4** (smjesa formi  $\alpha$  i  $\delta$ ), **5** (smjesa formi  $\alpha$ ,  $\delta$  i A) te **11** (čista forma A). Provedeni pokusi pokazuju veliku varijabilnost polimorfije te je u gotovo 40 % slučajeva došlo do određene promjene u ishodu kristalizacije. Zanimljivo je i da veliki utjecaj na varijabilnost ima količina dodanih onečišćenja. Prilikom smanjenja količine na 1 % te u pokusima s obogaćenim uzorkom, efekt potpuno izostaje te je u svim pokusima dobivena čista forma  $\alpha$ . Dodatno je opažen i utjecaj onečišćenja na iskorištenje. Dok se u pokusima bez dodatka onečišćenja ono kreće u rasponu od 85 – 90 %, u slučaju pokusa u kojima je došlo do varijabilnosti kristalne forme s dodatkom onečišćenja **4** ono pada na 73 – 75 % te onečišćenja **5** na 80 – 83 %. I dok je kod onečišćenja **5** taj efekt slabo izražen te na granici eksperimentalne pogreške, u slučaju spoja **4** pad je osjetniji te iznosi 10 – 15 %.

#### 4.4.5. Entakapon Forma $\beta$

Forma  $\beta$  dobiva se brzim dodatkom otopine entakapona u hladnu vodu pri čemu dolazi do naglog taloženja kristala. Iako u literaturi postoji nekoliko opisanih postupaka pripreme forme  $\beta$ , nakon inicijalnih provedenih pokusa pripreme, odabran je sustav *n*-propanol/voda.<sup>88</sup> Pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije provedeni na način da je onečišćenje suspendirano u vodi prije dodatka otopine entakapona (cijepljenje) ili otopljeno zajedno s entakaponom u *n*-propanolu na povišenoj temperaturi (obogaćeni uzorak) te je takva otopina dodana u čistu hladnu vodu. Ishod provedenih pokusa prikazan je u Dodatku u Tablici D6, Slika D6.

Prilikom cijepjenja s onečišćenjima pri masenom udjelu od 5 % kao i u slučaju forme  $\alpha$ , primijećena je najveća varijabilnost kristalnih formi. Čak 4 različita onečišćenja su utjecala na ishod kristalizacije. Onečišćenje **4** dovelo je do kristalizacije čiste forme  $\delta$ , onečišćenja **6** i **7** dovela su do nastanka smjese forme  $\beta$  i A te onečišćenje **11** do nastanka čiste forme A. Prilikom smanjenja količine onečišćenja na 1 % te u pokusima s obogaćenim uzorkom efekt utjecaja onečišćenja **6** i **7** potpuno izostaje te je u tim pokusima dobivena čista forma  $\beta$ . Onečišćenje **4** u slučaju pripreme forme  $\beta$  ima snažan utjecaj na varijabilnost polimorfije te je smanjenjem količine na 1 % te u slučaju pokusa s obogaćenim uzorkom (5 %) također dobivena čista forma  $\delta$ . Dodatnim smanjenjem količine na 0,1 % cijepljenjem te 1 % metodom obogaćenog uzorka taj utjecaj nestaje te nastaje forma  $\beta$ . Ponovno je najveći utjecaj opažen u slučaju onečišćenja **11**. Metodom cijepjenja utjecaj je opažen pri svim ispitivanim masenim udjelima dodanih onečišćenja te se ponovno kao i u slučaju forme D na samoj granici propisane količine smjernicama regulatornih agencija (0,1 %) dobiva forma A. Metodom obogaćenog uzorka efekt je uočen pri masenim udjelima od 5 % te 1 % dok on potpuno izostaje pri niskom količinama onečišćenja ( $w=0,1$  %). Dodatno je, kao i u slučaju pripreme forme  $\alpha$ , za onečišćenje **4** opažen slabi utjecaj na iskorištenje. Dok se u pokusima bez dodatka onečišćenja ono kreće u rasponu od 82 – 84 %, u slučaju pokusa u kojima je došlo do varijabilnosti kristalne forme s dodatkom onečišćenja **4** ono pada na 78 – 80 %. U oba slučaja nastaje smjesa formi  $\alpha$  i  $\delta$  te se može zaključiti da nastala forma  $\delta$  ima veću topljivost u navedenim sustavima.

#### 4.4.6. Entakapon Forma $\delta$

Forma  $\delta$  također se dobiva metodom dodatka otopine entakapona u antiotapalo, međutim u odnosu na prethodno opisane forme u ovom slučaju se koristi potpuno drugi sustav otapala – cikloheksanon/*n*-heptan.<sup>88</sup> Pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije rađeni

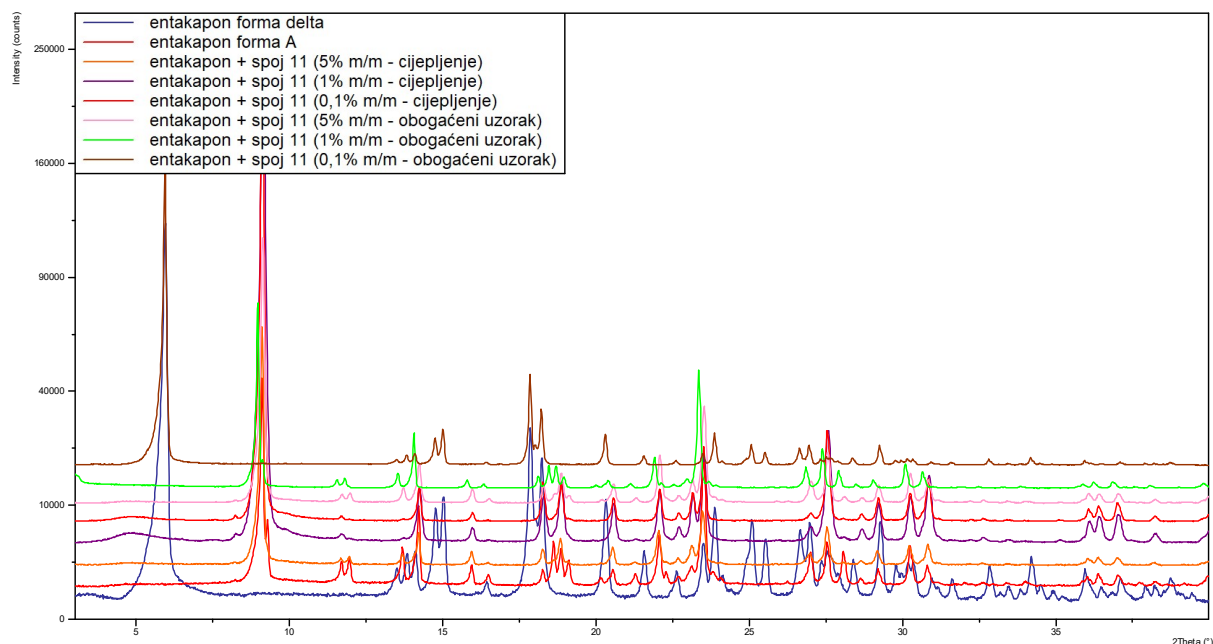


na način da je onečišćenje suspendirano u *n*-heptanu prije dodatka otopine entakapona (cijepljenje) ili otopljeno zajedno s entakaponom u cikloheksanonu (obogaćeni uzorak) te je takva otopina dodana u antiotapalo. Rezultati provedenih pokusa su prikazani u Dodatku u Tablici D7, Slika D7.

U većini pokusa nije došlo do varijabilnosti kristalne forme, međutim, ona je ponovno detektirana u slučaju onečišćenja **7** (čista forma A) te u slučaju onečišćenja **11** (čista forma A) u pokusima cijepjenja i obogaćenog uzorka pri masenom udjelu od 5 %. Ta onečišćenja su u provedenim pokusima dala najveću varijabilnost ishoda pokusa kristalizacije. U pokusima s cijepjenja, promjena forme je detektirana u dvije trećine pokusa za onečišćenje **7** pri masenom udjelu onečišćenja od 5 %, dok je, pri istoj količini, u slučaju onečišćenja **11** u svim pokusima došlo do promjene forme pri čemu je nastala forma A. Prilikom smanjenja masenog udjela na samo 0,1 % cijepljenog onečišćenja **11** također je dobivena samo čista forma A (Tablica 17, Slika 55). Isti efekt je u slučaju onečišćenja **11** opažen i prilikom provedbe pokusa s obogaćenim uzorkom do udjela od 1 % dok za onečišćenje **7** on uopće nije uočen. Pri niskim masenim udjelima od 0,1 % obogaćenog uzorka utjecaja nema. Veći utjecaj na iskorištenje nije uočen u pokusima te se ono kreće u rasponu od 80 – 87 %.

**Tablica 17.** Utjecaj onečišćenja **11** na ishod kristalizacije forme  $\delta$  entakapona.

| Dodano onečišćenje | <i>w</i> / % | Metoda           | Forma (XRPD) |
|--------------------|--------------|------------------|--------------|
| <b>11</b>          | 5            | cijepljenje      | A            |
|                    | 1            |                  | A            |
|                    | 0,1          |                  | A            |
|                    | 5            | obogaćeni uzorak | A            |
|                    | 1            |                  | A            |
|                    | 0,1          |                  | $\delta$     |



**Slika 55.** Prikaz difraktograma polikristalnih uzoraka izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja **11** na ishod kristalizacije forme  $\delta$ .

#### 4.4.7. Entakapon Forma $\tau$

Kako je opisano u literaturi, forma  $\tau$  se dobiva dokapavanjem vrućeg *n*-heksana u vruću otopinu entakapona u propan-2-olu (80 °C) pri čemu dolazi do taloženja kristala.<sup>88</sup> Razlika u odnosu na dosadašnje pripreme entakapona taloženjem iz sustava otapalo/antiotapalo je u redosljedu dodavanja. Dok se u pripravama formi D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$  otopina entakapona dodavala u antiotapalo, forma  $\tau$  se dobiva dodatkom antiotapala u otopinu entakapona. U literaturi opisani proces pripreme forme  $\tau$  je teško primjenjiv na većim skalama na taj način jer se opisuje dodatak vrućeg antiotapala u otopinu entakapona. To bi podrazumijevalo potrebu za zagrijanim reaktorom te grijani cjevovod kojim bi se osigurala dovoljno visoka temperatura antiotapala. Isto tako, temperatura otopine entakapona je blizu njezinog vrelišta što dodatno otežava izvedbu dokapavanja. Ipak najveći nedostatak takvog procesa leži u činjenici da je temperatura otopine entakapona 10-ak stupnjeva iznad temperature vrelišta antiotapala te prilikom dokapavanja dolazi do snažnog vrijanja smjese i pada temperature u kristalizacijskom sustavu. Laboratorijski pokusi su rađeni na skali od 2 g te su navedeni parametri uspješno kontrolirani uz povećan oprez prilikom dokapavanja da ne dođe do prejakog vrijanja.

Pokusi ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije rađeni na način da je onečišćenje otopljeno s entakaponom prije dodatka antioatapala (obogaćeni uzorak) ili je

suspendirano u *n*-heksanu te je ta suspenzija dodana u otopinu entakapona (cijepljenje). Ishod provedenih pokusa je prikazan u Dodatku u Tablici D8, Slika D8.

Kao i u prethodnim pokusima, cijepljenje s onečišćenjima **6**, **7** i **11** dovelo je do varijabilnosti kristalne forme pri čemu je nastala termodinamički najstabilnija forma, forma A. Varijabilnost je uočena pri masenim udjelima od 5 %, 1 % te u slučaju onečišćenja **11** i pri niskim udjelima od 0,1 %. Pokusi s obogaćenim uzorkom su također doveli do varijabilnosti kristalne forme pri čemu je također kristalizirala forma A u pokusima s onečišćenjima **7** ( $w=5$  % i  $w=1$  %) te **11** ( $w=5$  %). Veći utjecaj na iskorištenje nije uočen u pokusima te se ono kreće u rasponu od 80 – 87 %.

#### 4.4.8. Strukturni aspekt utjecaja prisustva odabranih onečišćenja na varijabilnost polimorfije entakapona

Rezultati provedenih pokusa ispitivanja utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije metodom cijepljenja sumirano su prikazani u Tablicama 18 – 20. Ovim rezultatima potvrđena je radna hipoteza prema kojoj srodni spojevi mogu utjecati na usmjeravanje nukleacije a samim time i dovesti do nastanka određenih polimorfnih formi.

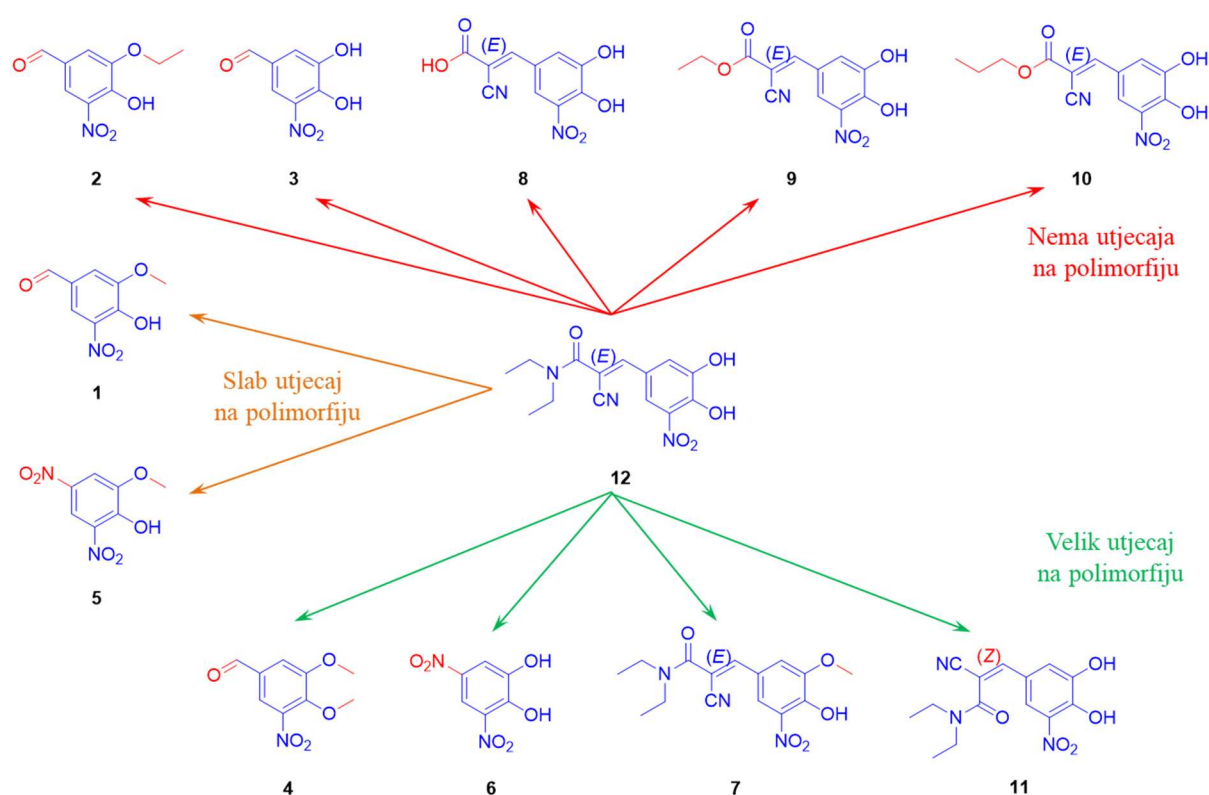
**Tablica 18.** Prikaz utjecaja 5 % onečišćenja na ishod kristalizacije prilikom cijepljenja.

| <i>w</i> =5 % | Onečišćenje |    |    |            |               |            |               |    |    |    |            |
|---------------|-------------|----|----|------------|---------------|------------|---------------|----|----|----|------------|
| Forma         | 1           | 2  | 3  | 4          | 5             | 6          | 7             | 8  | 9  | 10 | 11         |
| A             | NI*         | NI | NI | NI         | NI            | NI         | NI            | NI | NI | NI | NI         |
| D             | D           | D  | D  | D          | D             | <b>DiA</b> | D             | D  | D  | D  | <b>A</b>   |
| E             | E           | E  | E  | <b>Eiδ</b> | E             | E          | <b>E, Aiβ</b> | E  | E  | E  | <b>EiA</b> |
| α             | <b>αiδ</b>  | α  | α  | <b>αiδ</b> | <b>α, δiA</b> | α          | α             | α  | α  | α  | <b>A</b>   |
| β             | β           | β  | β  | <b>δ</b>   | β             | <b>βiA</b> | <b>βiA</b>    | β  | β  | β  | <b>A</b>   |
| δ             | δ           | δ  | δ  | δ          | δ             | δ          | <b>A</b>      | δ  | δ  | δ  | <b>A</b>   |
| τ             | τ           | τ  | τ  | τ          | τ             | <b>A</b>   | <b>A</b>      | τ  | τ  | τ  | <b>A</b>   |

\* NI – nije izvedivo

Cijepljenje onečišćenjima pri masenim udjelima od 5 % dovela su do najvećeg broja varijabilnosti kristalne forme. Ipak, pokusi pokazuju da određena onečišćenja kao što su **2**, **3**, **8**, **9** te **10** nisu pokazala nikakvu varijabilnost niti u jednom provedenom pokusu. Također, onečišćenje **1** samo je u jednom pokusu pridonijelo varijabilnosti kristalne forme pri pripravi

forme  $\alpha$  te je nastala smjesa formi  $\alpha$  i  $\delta$ . Strukturne formule molekula navedenih onečišćenja prikazane na Slici 56. pokazuju strukturne sličnosti onečišćenja **1**, **2** i **3** koja imaju aldehidnu skupinu u položaju 5 te hidroksilnu skupinu u položaju 2. Isto tako, usporedbom strukture entakapona i onečišćenja **8**, **9** i **10** vidi se velika strukturna razlika. Akrilamidni dio prisutan kod entakapona u navedenim onečišćenjima nije prisutan te su umjesto njega prisutne hidroksilne odnosno esterske skupine što vjerojatno uzrokuje izostanak utjecaja na kristalizaciju. Dodatno, ta činjenica može biti objašnjena stvaranjem vodikovih veza preko kojih dolazi do kontakata u kristalnim strukturama entakapona.



**Slika 56.** Prikaz utjecaja strukture onečišćenja na varijabilnosti kristalne forme u provedenim pokusima cijepjenja s 5 % dodanog onečišćenja.

Obje strukture koje su slične entakaponu (onečišćenje **7** razlikuje se samo u supstituentu na položaju 3 benzenskog prstena – metoksi-skupina umjesto hidroksilne skupine te **11** Z- izomer) dovela su do velike varijabilnosti kristalne forme – onečišćenje **11** u svim provedenim pokusima te onečišćenje **7** u četiri od šest ispitanih formi pri čemu dolazi do kristalizacije termodinamički najstabilnije forme, forme A.

Onečišćenja **4** i **6** također su dovela do većeg broja slučajeva (tri od šest) u kojima je došlo do kristalizacije druge kristalne forme pri čemu onečišćenje **4** dovodi do nastanka forme  $\delta$  dok onečišćenje **6** usmjerava u formu A. Onečišćenja **1** i **5** imaju slab utjecaj na varijabilnost kristalne forme i u samo jednom slučaju dolazi do promjene forme te dolazi do nastanka forme  $\delta$  koja nastaje u smjesi sa željenom formom. Isto tako, očit je utjecaj onečišćenja **1**, **4** i **5** koja djelomično ili potpuno usmjeravaju kristalizaciju prema nastanku forme  $\delta$ , dok onečišćenja **6**, **7** i **11** primarno vode k nastanku forme A.

U Tablicama 19 i 20 vidi se polagani pad utjecaja na varijabilnost kristalne forme koja je posljedica smanjenja količine onečišćenja na 1 % odnosno 0,1 %.

**Tablica 19.** Prikaz utjecaja 1 % dodanog onečišćenja na ishod kristalizacije prilikom cijepjenja.

| w=1 %<br>Forma | Onečišćenje |          |          |                                |          |              |                                  |          |          |          |              |
|----------------|-------------|----------|----------|--------------------------------|----------|--------------|----------------------------------|----------|----------|----------|--------------|
|                | 1           | 2        | 3        | 4                              | 5        | 6            | 7                                | 8        | 9        | 10       | 11           |
| A              | A           | A        | A        | A                              | A        | A            | A                                | A        | A        | A        | A            |
| D              | D           | D        | D        | D                              | D        | <b>D i A</b> | D                                | D        | D        | D        | <b>A</b>     |
| E              | E           | E        | E        | <b>E i <math>\delta</math></b> | E        | E            | <b>E, A i <math>\beta</math></b> | E        | E        | E        | <b>E i A</b> |
| $\alpha$       | $\alpha$    | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$                       | $\alpha$ | $\alpha$     | $\alpha$                         | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$     |
| $\beta$        | $\beta$     | $\beta$  | $\beta$  | $\delta$                       | $\beta$  | $\beta$      | $\beta$                          | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$  | <b>A</b>     |
| $\delta$       | $\delta$    | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$                       | $\delta$ | $\delta$     | <b>A</b>                         | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$ | <b>A</b>     |
| $\tau$         | $\tau$      | $\tau$   | $\tau$   | $\tau$                         | $\tau$   | <b>A</b>     | <b>A</b>                         | $\tau$   | $\tau$   | $\tau$   | <b>A</b>     |

**Tablica 20.** Prikaz utjecaja 0,1 % dodanog onečišćenja na ishod kristalizacije prilikom cijepljenja.

| w=0,1 %  | Onečišćenje |          |          |              |          |          |          |          |          |          |          |          |
|----------|-------------|----------|----------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|          | 1           | 2        | 3        | 4            | 5        | 6        | 7        | 8        | 9        | 10       | 11       |          |
| <b>A</b> | A           | A        | A        | A            | A        | A        | A        | A        | A        | A        | A        | A        |
| <b>D</b> | D           | D        | D        | D            | D        | D        | D        | D        | D        | D        | D        | A        |
| <b>E</b> | E           | E        | E        | E i $\delta$ | E        | E        | E        | E        | E        | E        | E        | E        |
| $\alpha$ | $\alpha$    | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$     | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ | $\alpha$ |
| $\beta$  | $\beta$     | $\beta$  | $\beta$  | $\delta$     | $\beta$  | NP*      | NP       | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$  | A        |
| $\delta$ | $\delta$    | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$     | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$ | $\delta$ | A        |
| $\tau$   | $\tau$      | $\tau$   | $\tau$   | $\tau$       | $\tau$   | $\tau$   | A        | $\tau$   | $\tau$   | $\tau$   | $\tau$   | A        |

\* NP – nije provedeno

Posebo je zanimljiv utjecaj male količine dodanog onečišćenja (0,1 %). Tri različita onečišćenja dovela su do kristalizacije druge kristalne forme pri čemu je onečišćenje **11** dovelo do kristalizacije forme A u pripravi forme D,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ . Dopuštene granice onečišćenja u farmaceutskim tvarima iznose 0,15 % za poznata, odnosno 0,10 % za nepoznata onečišćenja. Priprava određenog polimorfa željenih karakteristika u farmaceutskoj industriji od iznimne je važnosti te se prilikom razvoja ispituju svi procesni parametri koji bi mogli imati utjecaj na proces pripreme polimorfa. Međutim u tim razmatranjima se ne uzima u obzir mogući utjecaj onečišćenja prisutnih u tako malim količinama (< 0,15 %) na ishod kristalizacije. S obzirom na prikazani utjecaj onečišćenja na kristalizaciju, pri razvoju procesa i kristalizacije određenih API-a bilo bi dobro potpuno istražiti i utjecaj onečišćenja i aditiva na pripravu kristalnih formi.

U usporedbi s podacima dostupnim u literaturi, koristile su se slične metodologije u ispitivanju utjecaja onečišćenja ili aditiva na ishod kristalizacije.<sup>99,101,102</sup> U tim radovima raspon ispitivanih količina dodanih onečišćenja kretao se od 0,5 – 6 % (w) u radu Poornachary *et al.* u kojem je utjecaj na ishod opažen samo pri većim količinama dodanih onečišćenja (w=2 – 6 %) dok je pri ispitivanim masenim udjelima od 0,5 % on izostao.<sup>97</sup> Isto tako, u radu Mirmehrabi *et al.* ispitivan je utjecaj u rasponu od w=0,25 – 1 % ali je uočen samo utjecaj na morfologiju dok je utjecaj na promjenu polimorfije izostao.<sup>101</sup> Navedene činjenice daju dodatnu težinu sustavnom pristupu provedenih ispitivanja opisanog u ovom radu.

Rezultati pokusa u kojima je onečišćenje dodano u otopinu entakapona prikazani su u tablicama 21 i 22.

**Tablica 21.** Prikaz utjecaja 5 % onečišćenja na ishod kristalizacije metodom obogaćenog uzorka.

| $w=5\%$  | Onečišćenje |        |        |          |          |         |          |        |        |        |          |
|----------|-------------|--------|--------|----------|----------|---------|----------|--------|--------|--------|----------|
| Forma    | 1           | 2      | 3      | 4        | 5        | 6       | 7        | 8      | 9      | 10     | 11       |
| A        | A           | A      | A      | A        | A        | A       | A        | A      | A      | A      | A        |
| D        | NP*         | NP     | NP     | NP       | NP       | A       | NP       | NP     | NP     | NP     | A        |
| E        | NP          | NP     | NP     | E        | NP       | NP      | E        | NP     | NP     | NP     | E        |
| $\alpha$ | A           | NP     | NP     | $\alpha$ | $\alpha$ | NP      | NP       | NP     | NP     | NP     | $\alpha$ |
| $\beta$  | NP          | NP     | NP     | $\delta$ | NP       | $\beta$ | $\beta$  | NP     | NP     | NP     | A        |
| $\delta$ | NP          | NP     | NP     | NP       | NP       | NP      | $\delta$ | NP     | NP     | NP     | A        |
| $\tau$   | T           | $\tau$ | $\tau$ | $\tau$   | $\tau$   | $\tau$  | A        | $\tau$ | $\tau$ | $\tau$ | A        |

\* NP – nije provedeno

I u ovom slučaju, onečišćenje **11** dovelo je do najveće varijabilnosti kristalne forme, u četiri od sedam pokusa dovelo je do nastanka kristalne forme A. Onečišćenja **4**, **6** i **7** samo su u jednom setu pokusa pridonijela promjeni kristalne forme pri čemu je onečišćenje **4** dovelo do kristalizacije forme  $\delta$ , dok su onečišćenja **6** i **7** dovela do nastanka forme A.

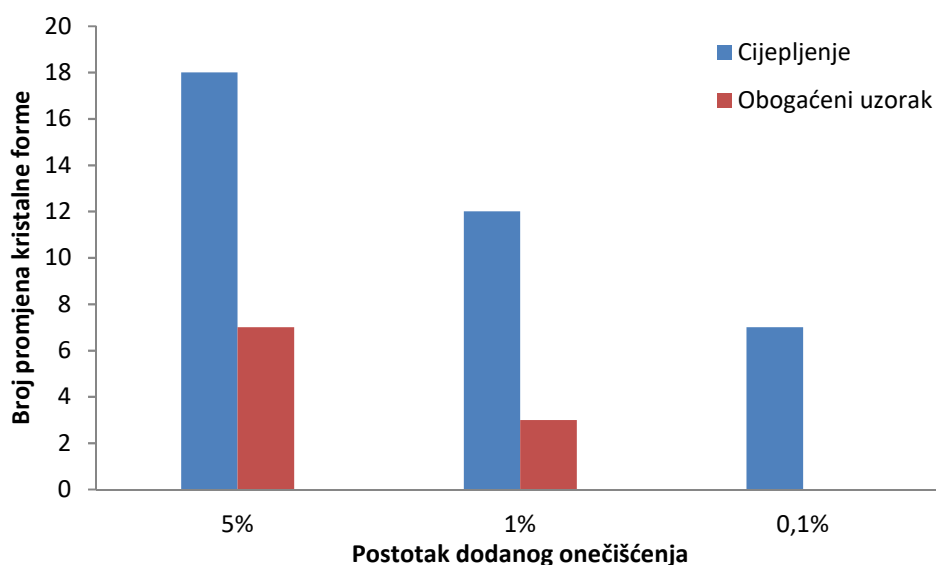
**Tablica 22.** Prikaz utjecaja 1 % dodanog onečišćenja na ishod kristalizacije metodom obogaćenog uzorka.

| w=1 %<br>Forma | Onečišćenje |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |         |
|----------------|-------------|----|----|---------|----|----|----|----|----|----|----|---------|
|                | 1           | 2  | 3  | 4       | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 |         |
| A              | NP*         | NP | NP | NP      | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP      |
| D              | NP          | NP | NP | NP      | NP | D  | NP | NP | NP | NP | NP | D       |
| E              | NP          | NP | NP | NP      | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP      |
| $\alpha$       | NP          | NP | NP | NP      | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP      |
| $\beta$        | NP          | NP | NP | $\beta$ | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | $\beta$ |
| $\delta$       | NP          | NP | NP | NP      | NP | NP | NP | NP | NP | NP | NP | A       |
| $\tau$         | NP          | NP | NP | NP      | NP | NP | A  | NP | NP | NP | NP | A       |

\* NP – nije provedeno

Isto kao i u pokusima cijepjenja, u provedenim pokusima metodom obogaćenog uzorka utjecaj onečišćenja na varijabilnost kristalne forme pada sa smanjenjem količine dodanog onečišćenja na 1 % dok u pokusima sa samo 0,1 % dodanog onečišćenja taj efekt potpuno izostaje.

Ukupni rezultati pokazuju znatno manji utjecaj onečišćenja na ishod kristalizacije ukoliko je onečišćenje dodano u otopinu entakapona prije početka kristalizacije (obogaćeni uzorak) u odnosu na pokuse u kojima je onečišćenje dodano u antiotapalo (Slika 57).



**Slika 57.** Prikaz pada utjecaja onečišćenja na varijabilnost kristalne forme.



## § 5. ZAKLJUČAK

U cilju istraživanja utjecaja strukture spojeva na varijabilnost polimorfije entakapona načinjena je biblioteka spojeva koji se po strukturi ne razlikuju bitno od istraživanog sustava, te su to ili polazni spojevi/međuprodukti uporabljeni u sintezi ciljne molekule ili potencijalna onečišćenja nastala neželjenim reakcijama.

Odabrani spojevi **1-11** te entakapon **12** uspješno su sintetizirani te im je struktura potvrđena spektroskopskim metodama (NMR, FTIR) dok im je čistoća provjerena korištenjem prikladne UHPLC metode. Svi pripremljeni spojevi su analizirani metodom difrakcije rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku. Dodatna strukturalna karakterizacija provedena je difrakcijom na monokristalnom uzorku te su za četiri onečišćenja (spojevi **1**, **2**, **3** i **6**) riješene molekulske i kristalne strukture.

Da bi se napravila nedvojbeno identifikacija formi čvrstog stanja entakapona pripremljeni su kristalne forme entakapona, pri čemu je od deset opisanih u literaturi uspješno i reproducibilno priređeno sedam oblika (A, D, E,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\tau$ ). Za sve priređene forme provedena je detaljna karakterizacija korištenjem termičkih metoda (DSC i TG) te su dobivene kristalne forme analizirane metodom difrakcije rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku. Na temelju dobivenih rezultata, difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku odabrana je kao diskriminatorska metoda za praćenje ishoda kristalizacijskih pokusa.

Razvijena je metodologija praćenja utjecaja onečišćenja na varijabilnost polimorfije koja najbolje opisuje mogućnosti do kojih dolazi tijekom kristalizacije. Metoda cijepljenja potvrđuje se kao metoda u kojoj je opažen najveći utjecaj onečišćenja na nastanak druge kristalne forme koja bi iskristalizirala prije ciljanog polimorfa. Metoda obogaćenog uzorka samo je u manjem broju pokusa dovela do varijabilnosti polimorfije.

Utjecaj onečišćenja na kristalizaciju ispitan je pri različitim masenim udjelima dodanih onečišćenja ( $w=0,1$  %, 1 % te 5 %). U 30-ak % slučajeva došlo je do promjene polimorfije, pri čemu onečišćenje **11** ima dominantnu ulogu u promjeni polimorfije. Pretpostavka je da strukturno slična molekula usmjerava nukleaciju prema najstabilnijoj formi što je u ovom slučaju forma A.

Istraživani je i utjecaj količine prisutnih onečišćenja, te je očekivano pokazano da što je više onečišćenja prisutno, utjecaj na promjenu polimorfije je veći. S druge strane ustanovljeno je da

u određenim slučajevima i mala količina onečišćenja ( $w=0,1$  %) može utjecati na promjenu kristalne strukture.

Do sada nije sustavno, na primjeru više od 10 različitih onečišćenja, istražen niti jedan kristalizacijski sustav API-a. U ovom radu ispitana su dva moguća pristupa utjecaja na kristalizaciju te je promjena polimorfije povezana sa strukturom onečišćenja. Rezultati su pokazali da na pojavu polimorfije uz sam postupak i korištena otapala, veliki utjecaj imaju i onečišćenja.

Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu poznavanja i istraživanja sastava kristalizacijskih sustava, posebice kada se želi prirediti metastabilna polimorfna modifikacija određene tvari. S obzirom na sve strože zahtjeve farmaceutske industrije, to se posebno odnosi na procese pripreme djelatnih tvari.

## § 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

2-PrOH - propan-2-ol

3-OMD - 3-O-metildopa

AADC - dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina (engl. *Aromatic L-amino acid decarboxylase*)

AFM - mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*)

API - djelatna tvar (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*)

APT - (engl. *Attached Proton Test*)

CE - kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*)

CNT - klasična nukleacijska teorija (engl. *Classical Nucleation Theory*)

COMT - katehol-O-metiltransferaza (engl. *Catechol-O-methyltransferase*)

COSY - (engl. *Homonuclear Correlation Spectroscopy*)

CSD - raspodjela veličine kristala (engl. *Crystal Size Distribution*)

DAD - detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)

DMF - *N,N*-dimetilformamid

DMSO - dimetilsulfoksid

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

DSC - razlikovna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*)

EMA - europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)

EtOH - etanol

Eu. Ph. - europska farmakopeja (engl. *European Pharmacopoeia*)

FBRM - (engl. *Focused Beam Reflectance Measurement*)

FDA - američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Agency*)

FTIR - (engl. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)

GC - plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

HMBC - (engl. *Heteronuclear Multiple-bond Correlation spectroscopy*)

HOAc - octena kiselina

HPLC - tekućinska kromatografija visoke razlučivosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

HSM - mikroskopija s grijaćim pločom (engl. *Hot Stage Microscopy*)

HSQC - (engl. *Heteronuclear Single-quantum Correlation Spectroscopy*)

ICH - Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku uporabu (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

IR - infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared Spectroscopy*)

MeOH - metanol

MS - spektrometrija masa (engl. *Mass spectroscopy*)

NMR - nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

PB - Parkinsonova bolest

PXRD - difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku (engl. *Powder X-Ray Diffraction*)

SEM - pretražna elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*)

SFC - kromatografija superkričnim fluidom (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*)

TEM - transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *Transmission Electron Microscopy*)

TG - termogravimetrijska analiza (engl. *Thermogravimetry*)

THF - tetrahidrofuran

TLC - tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*)

TMS - tetrametilsilan

UHPLC - tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

USP - američka farmakopeja (engl. *United States Pharmacopeia*)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. W. Lancaster, P. G. Karamertzanis, A. T. Hulme, D. A. Tocher, T. C. Lewis, S. L. Price, *J. Pharm. Sci.* **96** (2007) 3419–3431.
2. S. Mirza, I. Miroshnyk, J. Rantanen, J. Aaltonen, P. Harjula, E. Kiljunen, J. Heinämäki, J. Yliruusi, *J. Pharm. Sci.* **96** (2007) 2399–2408.
3. L. V. Kalia, A. E. Lang, *Lancet* **386** (2015) 896–912.
4. T. Vos, C. Allen, M. Arora, R. M. Barber, Z. A. Bhutta, A. Brown, A. Carter, D. C. Casey, F. J. Charlson, A. Z. Chen, *Lancet* **388** (2016) 1545–1602.
5. B. P. Chekal, A. M. Campeta, Y. A. Abramov, N. Feeder, P. P. Glynn, R. W. McLaughlin, P. A. Meenan, R. A. Singer, *Org. Process Res. Dev.* **13** (2009) 1327–1337.
6. M. W. Hosseini, *Molecular Networks*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA, 2009 str. 27–31.
7. L. Yu, G. A. Stephenson, C. A. Mitchell, C. A. Bunnell, S. V. Snorek, J. J. Bowyer, T. B. Borchardt, J. G. Stowell, S. R. Byrn, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 585–591.
8. L. Yu, *Acc. Chem. Res.* **43** (2010) 1257–1266.
9. D. Mangin, F. Puel, S. Veessler, *Org. Process Res. Dev.* **13** (2009) 1241–1253.
10. S. K. Poornachary, P. S. Chow, R. B. H. Tan, *Cryst. Growth Des.* **8** (2008) 179–185.
11. B. Y. Shekunov, P. York, *J. Cryst. Growth* **211** (2000) 122–136.
12. S. R. Chemburkar, *Org. Process Res. Dev.* **4** (2000) 413–417.
13. S. L. Morissette, *Adv. Drug Delivery Rev.* **56** (2004) 275–300.
14. P.H. Karpinski, *Chem. Eng. Technol.* **22** (2006) 233–237.
15. A. Llinas, J. M. Goodman, *Drug Discov. Today* **13** (2008) 198–210.
16. S. R. Chemburkar, J. Bauer, K. Deming, H. Spiwek, K. Patel, J. Morris, R. Henry, S. Spanton, W. Dziki, W. Porter, J. Quick, P. Bauer, J. Donaubauer, B. A. Narayanan, M. Soldani, D. Riley, K. McFarland, *Org. Process Res. Dev.* **4** (2000) 413–417.
17. J. Bauer, S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter, J. Morris, *J. Pharm. Res.* **18** (2001) 859–866.
18. S. Desikan, R. L. Parsons, W. P. Davis, J. E. Ward, W. J. Marshall, P. H. Toma, *Org. Process Res. Dev.* **9** (2005) 933–942.
19. A. M. Campeta, B. P. Chekal, Y. A. Abramov, P. A. Meenan, M. J. Henson, B. Shi, R. A. Singer, K. R. Horspool, *J. Pharm. Sci.* **99** (2010) 3874–3886.
20. Y. S. Jin, J. Ulrich, *Chem. Eng. Technol.* **33** (2010) 839–844.

21. J. Lu, S. Rohani, *Org. Process Res. Dev.* **13** (2009) 1262–1268.
22. D. Albers, M. Galgoci, D. King, D. Miller, R. Newman, L. Peerey, E. Tai, R. Wolf, *Org. Process Res. Dev.* **11** (2007) 846–860.
23. Y. Zhu, Y. Chen, G. Xu, X. Ye, D. He, J. Zhong,, *J. Mater. Sci. Eng., C* **32** (2012) 390–394.
24. L. Lin, R. Hao, W. Xiong, J. Zhong, *J. Biosci Bioeng.* **119** (2015) 591–595.
25. K. N. Olafson, M. A. Ketchum, J. D. Rimer, P. G. Vekilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112** (2015) 4946–4951.
26. D. Hean, T. Gelbrich, U. Griesser, J. Michael, A. Lemmerer, *CrystEngComm* **17** (2015) 5143–5153.
27. C. H. Spink, *Methods Cell Biol* **84** (2008) 115–141.
28. J. R. MacCallum, *Thermogravimetric Analysis A2. In Comprehensive Polymer Science and Supplements*, Pergamon, Amsterdam, 1989, str. 903–909.
29. A. Müllertz, Y. Perrie, T. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*, Springer, New York, 2016, str. 293–314.
30. J. Anwar, S. E. Tarling, P. Barnes, *J. Pharm. Sci.* **78** (1989), 337–342.
31. C. Doherty, P. York, *Int. J. Pharm.* **47** (1988) 141–155.
32. J. J. Gerber, J. G. van der Watt, A. P. Lötter, *Int. J. Pharm.* **73** (1991), 137–145.
33. B. Hegedűs, P. Bod, K. Harsányi, I. Péter, A. Kálmán, L. Párkányi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7** (1989) 563–569.
34. Y. Zhao, J. Yuan, Z. Ji, J. Wang, S. Rohani, *Ind. Eng. Chem. Res.* **51** (2012) 12530–12536.
35. International Conference on Harmonization, Guidance for Industry Q3A (R2); Impurities in New Drug Substances, (2006)
36. D. Giron, *Boll. Chim. Pharm.* **133** (1994) 201–219.
37. A. M. Krstulović, C. R. Lee, *J. Chromatogr. B* **689** (1997) 137–153.
38. J. C. Berridge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996) 7–12.
39. J. Pajander, K. B. Hausghøj, K. Bjernebøe, P. Wahlberg, J. Rantanen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **80** (2013) 116–125.
40. S. Görög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B* **659** (1994) 51–84.
41. A. C. Cartwright, *Drug. Inf. J.* **24** (1990) 15–116.
42. H. Shindo, J. Caldwell, *Chirality* **3** (1991) 91–93.
43. H. Bourichi, Y. Brik, P. Hubert, Y. Cherrah, A. Bouklouze, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2** (2012) 412–421.
44. R. Bonfilio, J. S. Leal, O. M. M. Santos, G. R. Pereira, A. C. Doriguetto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **88** (2014) 562–570.

45. M. Biba, M. Wong, A. Akin, E. T. Manning, L. Schaffter, L. Miller, Y. Zhang, W. Farrell, J. O. DaSilva, L. Nogle, B. Hritzko, F. Riley, R. P. DePianta, K. Barry, D. A. Gao, E. Seest, M. Goel, L. Chung, J. Paulson, H. Lee, D. B. Moore, S. Dong, W. Leister, N. Fukushima, A. Sasaki, T. Lee, T. Iriki, M. Nishimura, M. Tomita, M. Owa, K. Tanaka, T. o Shagawa, T. J. Moran, T. Bamba, C. J. Welch, *Org. Process Res. Dev.* **24** (2020) 1271–1280.
46. C. Loda, E. Bernabe, A. Nicoletti, S. Bacchi, R. Dams, *Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 1388–1391.
47. S. Gao, Z.-P. Zhang, H. T. Karnes, *J. Chromatogr. B* **825** (2005) 98–110.
48. G. V. R. Reddy, A. P. Kumar, B. V. Reddy, J. Sreeramulu, J. H. Park, *Croat. Chem. Acta* **83** (2010) 443–449.
49. N. Mistry, I. M. Ismail, M. S. Smith, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16** (1997) 697–705.
50. J. Anwar, S. E. Tarling, P. Barnes, *J. Pharm. Sci.* **78** (1989), 337–342.
51. D. Giron-Forest, C.H. Goldbronn, P. Piechon, *J. Pharm. Biomed Anal.* **7** (1989) 1421–1433.
52. A. Sarkar, S. Rohani, *J. Pharm. Sci.* **104** (2015) 98–105.
53. D. Doff, F. Bownen, O. Corrigan, *Analyst* **111** (1986) 179–182.
54. D. Giron, B. Edel, P. Piechon, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **187** (1990) 297–307.
55. K. Kelton, A. Greer, *Crystallization in Glasses. In Nucleation in Condensed Matter: Applications in Materials and Biology*; Pergamon, Oxford, UK., 2010, str. 279–284., 318–329.
56. S. Karthika, T. K. Radhakrishnan, P. Kalaichelv, *Cryst. Growth Des.* **16** (2016) 6663–6681.
57. D. Gebauer, M. Kellermeier, J. D. Gale, L. Bergström, H. Cölfen, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 2348–2371.
58. O. Galkin, K. Chen, R. L. Nagel, R. E. Hirsch, P. G. P. Vekilov, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (2002) 8479–8483.
59. J. Chen, B. Sarma, J. M. B. Evans, A. S. Myerson, *Cryst. Growth Des.* **11** (2011) 887–895.
60. D. Moroni, P. R. ten Wolde, P. G. Bolhuis, *Phys. Rev. Lett.* **95** (2005) 235703–235707.
61. H. Chen, M. Li, Z. Lu, X. Wang, J. Yang, Z. Wang, F. Zhang, C. Gu, W. Zhang, Y. Sun, J. Sun, W. Zhu, X. Guo, *Nature Comm.* **10** (2019) 3872–3882.
62. A. G. Jones, *Crystallization process systems*, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 2002, str . 58-62.
63. A. G. Jones, *Crystallization Process Systems*, Butterworth-Heinemann, Woburn, USA, 2002, str. 62–63., 124–128.
64. J. Axelrod, W. Albers, C. D. Clemente, *J. Neurochem.* **5** (1959) 68–72.
65. <https://www.sciencedirect.com/> 27.01.2020.
66. J. Axelrod, R. Tomchick, *J. Biol. Chem.* **233** (1958) 702–705.

- 
67. N. P. Quinn, *Drugs*, **28** (1984) 236–262.
  68. G. Bartholini, A. Pletscher, *Pharmacol. Ther. [B]* **1** (1975) 407–421.
  69. R. Pahwa, K. E. Lyons, *Curr. Med. Res.* **25** (2009) 841–849.
  70. M. J. Bonifácio, P. N. Palma, L. Almeida, P. Soares-da-Silva, *CNS Drug Rev.* **13** (2007) 352–379.
  71. G. Srikanth, U. K. Ray, D. V. N. S. Rao, P. B. Gupta, P. Lavanya, A. Islam, *Synth Comm* **42** (2012) 1359–1366.
  72. S. Mantegazza, P. Allagrini, G. Razzetti, A process for the preparation of Entacapone, EP 1935873 A1, 25.06.2008.
  73. G. S. Chittor, R. B. Uday, J. Munusamy, N. V. S. P. A. R. K. M. Muppidi, A process for the preparation of Entacapone form A, US 2008/0300420 A1, 04.12.2008.
  74. R. Chinnapillai, R. I. Kondakindi, R. V. Arava, V. Jasti, An improved process for the preparation of Entacapone, WO 2007/094007 A1, 23.08.2007.
  75. M. B. Sanmarti, J. G. S. Rocabert, F. P. Nicolau, A. M. Ponce, Process for the preparation of Entacapone and intermediates thereof, EP 1978014 A1, 08.10.2008.
  76. A. S. Harisha, S. P. Nayak, M. S. Pavan, K. Shridhara, R. K. Sundararaja, K. Rajendra, P. Koteppa, H. Sivaramkrishnan, T. N. R. Guru, K. Nagarajan, *J. Chem. Sci.* **127** (2015) 1977–1991.
  77. M. Hytönen, L. Hilden, Process for manufacturing Entacapone, WO 2007/090923 A1, 06.08.2007.
  78. R. J. Backstrom, K. E. Heinola, E. J. Honkanen, S. K. Kaakkola, P. J. Kairisalo, I. B. Y. Linden, P. I. Mannisto, E. A. O. Nissinen, P. Pohto, A. K. Pippuri, J. J. Pystynen, Pharmacologically active catechol derivatives, US 5,446,194, 29.08.1995.
  79. P. B. Deshpande, A. K. Randey, D. R. Dhameliya, B. R. Dayawant, P. K. Luthra, Process for the preparation of Entacapone, US 2010/0234632 A1, 16.09.2010.
  80. R. V. Arava, R. Chinnapillai, M. Qadeeruddin, Improved process for the preparation of Entacapone, WO 2005/063693 A1, 14.07.2005.
  81. Z. Cziaky, Process for the preparation of (*E*)-*N,N*-diethyl-2-cyano-3-(3,4-dihydroxy- $\delta$ -nitrophenyl)-acrylamide in stable polymorphic form and intermediates of the process, WO 2006/064296, 22.06.2006.
  82. European Pharmacopoeia 10.0 Monograph E, str. 2507–2508.
  83. United States Pharmacopoeia (2022), USP Monographs, Entacapone str. 1–2.
  84. S. M. J. Mukarram, R. A. R. Khan, R. P. Yadav, Z. G. Shaikh, Stable polymorphs of (*E*)-*N,N*-diethyl-2-cyano-3-(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)acrylamide, US 2008/0004343 A1, January 3, 2008.



85. G. S. Chittor, R. B. Uday, J. Munusamy, N. V. S. P. A. R. K. M. Miuppid, A process for the preparation of Entacapone form A, WO 2007/077572 A1, July 12, 2007
86. T. Bader, M. Furegati, O. Jungmann, Novel crystalline forms of Entacapone and production thereof, US 2008/0076825 A1, March 27, 2008
87. R. P. Yadav, Z. G. Shaikh, S. M. J. Mukarram, Process for the preparation of a stable polymorphic form of Entacapone, WO 2008/053304 A2, May 08, 2008
88. D. Š. Šamec, M. Marinković, Z. Šiljković, M. Horvat, New forms of active pharmaceutical ingredient, WO 2007/135406 A2, November 29, 2007
89. J. Leppänen, E. Wegelius, T. Nevalainen, T. Järvinena, J. Gynthera, J. Huuskonen, *J. Mol. Struct.* **562** (2001) 129–135.
90. K. Sangwal, *Additives and Crystallization Processes: From Fundamentals to Applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 2007
91. C. Schmidt, M. J. Jones, J. Ulrich, *The Influence of Additives and Impurities on Crystallization In Crystallization*, John Wiley & Sons, Hoboken, New York, USA, 2013 bH & Co. KGaA, 2013; str. 105–127.
92. Y. N. Palyanov, A. F. Khokhryakov, Y. M. Borzdov, I. N. Kupriyanov, *Cryst. Growth Des.* **13** (2013) 5411–5419.
93. C. Scott, S. Black, *Org. Process Res. Dev.* **9** (2005) 890–893.
94. J. I. Lopez Ortiz, E. Quiroga, C. F. Narambuena, A. J. Ramirez-Pastor, *Cryst. Growth Des.* **19** (2019) 134–140.
95. C. C. Sun, W. Sun, S. Price, C. Hughes, J. Ter Horst, S. Veessler, K. Lewtas, A. Myerson, H. Pan, G. Coquerel, J. van den Ende, H. Meekes, M. Mazzotti, I. Rosbottom, F. Taulelle, S. Black, A. Mackenzie, S. Janbon, P. Vekilov, T. Threlfall, T. Turner, K. Back, H. Cuppen, D. Toroz, J. Sefcik, J. Lovelock, R. Hammond, N. Candoni, E. Simone, M. Ward, C. A. Bertran, T. Vetter, R. Sear, J. De Yoreo, R. Davey, J. Anwar, E. Santiso, D. T. Wu, K. Roberts, B. Peters, S. Schroeder, F. Jones, A. Rasmuson, H. Cölfen, J. Zeglinski, M. Salvalaglio, *Faraday Discuss.* **179** (2015) 383–420.
96. S. Singh, S. Görög *Trends Anal. Chem.* **101** (2018) 1–128.
97. A. Fiebig, M. J. Jones, J. Ulrich, *Cryst. Growth Des.* **7** (2007) 1623–1627.
98. G. Capellades, H. Wiemeyer, A. S. Myerson, *Cryst. Growth Des.* **19** (2019) 4008–4018.
99. S. K. Poornachary, P. S. Chow, R. B. H. Tan, *Cryst. Growth Des.* **8** (2008) 179–185.
100. C. Heffernan, M. Ukrainczyk, J. Zeglinski, B. K. Hodnett, Å. C. Rasmuson, *Cryst. Growth Des.* **18** (2018) 4715–4723.
101. M. Mirmehrabi, S. Rohani, K. S. K. Murthy, B. Radatus, *Cryst. Growth Des.* **6** (2006) 141–149.
102. T. Mukuta, A. Y. Lee, T. Kawakami, A. S. Myerson, *Cryst. Growth Des.* **5** (2005) 1429–1436.

- 
103. A. J. Nicholls, A. S. Batsanov, I. R. Baxendale, *Molecules* **24** (2019) 4154.
104. M. Benechie, B. Delpech, Q. Khuong-Huu, F. Khuong-Huu, *Tetrahedron* **48** (1992) 1895–1910.
105. V. Vušak, D. Vušak, K. Molčanov, E. Meštrović, *Acta Crystallogr. E* **76** (2020), 239–244.
106. C. Selvam, I. A. Lemasson, I. Brabet, N. Oueslati, B. Karaman, A. Cabaye, A. S. Tora, B. Commare, T. Courtiol, S. Cesarini, I. McCort-Tranchepain, D. Rigault, L. Mony, T. Bessiron, H. McLean, F. R. Leroux, F. Colobert, H. Daniel, A. Goupil-Lamy, H.-O. Bertrand, C. Goudet, J.-P. Pin, F. C. Acher, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 1969–1989.
107. D. Katayev, K. Zhang, R. Calvo, Nitration, WO2020/84094 A1, 30.04.2020.
108. B. Rousseau, J. P. N. Rosazza, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3314–3317.
109. E. C. Behrman, S. Chen, E. J. Behrman, *Tetrahedron Lett.* **43** (2002) 3221–3224.
110. A. V. Reddy, S. Gogireddy, *Synth. Commun.* **44** (2014) 1274–1278.

## § 8. DODATAK

Tablica D1. Kristalografski podatci spojeva 1 i 2.

| Spoj   | 1   | 2   |
|--|---|---|
| Empirijska formula   | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub> | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub> |
| $M_r$  | 197,15  | 211,17  |
| dimenzije kristala / mm <sup>3</sup>                                 | 0,13×0,15×0,30                                | 0,18×0,20×0,35                                |
| Prostorna grupa  | <i>P2<sub>1</sub>/c</i>                       | <i>Pnma</i>                                   |
| Kristalni sustav   | monoklinski                                   | rompski                                       |
| $a / \text{Å}$   | 6,8249(2)                                     | 8,9614(2)                                     |
| $b / \text{Å}$   | 14,3395(5)                                    | 6,4484(1)                                     |
| $c / \text{Å}$   | 8,9089(3)                                     | 15,9340(3)                                    |
| $\alpha / ^\circ$  | 90  | 90  |
| $\beta / ^\circ$   | 106,678(4)                                    | 90  |
| $\gamma / ^\circ$  | 90  | 90  |
| $V / \text{Å}^3$   | 835,20(5)                                     | 920,77(3)                                     |
| $Z$  | 4   | 4   |
| $D_{\text{calc}} / \text{g cm}^{-3}$                                 | 1,568   | 1,523   |
| $\mu / \text{mm}^{-1}$   | 1,157   | 1,090   |
| $F(000)$   | 408   | 440   |
| $T / \text{K}$   | 293   | 293   |
| $\lambda / \text{Å}$   | 1,54184                                       | 1,54184                                       |
| Ukupan br. refleksa  | 3633  | 2418  |
| Br. neovisnih refleksa   | 1697  | 1027  |
| Br. parametara   | 127   | 91  |
| $R_{\text{int}}$   | 0,016   | 0,018   |
| $R^a, wR^b [I \geq 2\sigma(I)]$                                      | 0,0404, 0,1735                                | 0,0407, 0,1167                                |
| Prikladnost modela, $S^c$  | 0,81  | 1,10  |
| $\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}} / \text{e Å}^{-3}$ | -0,17, 0,27                                   | -0,25, 0,20                                   |

Tablica D1. (nastavak) Kristalografski podatci spojeva 3 i 6.

| Spoj   | 3   | 6   |
|--|---|---|
| Empirijska formula   | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>5</sub>         | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> |
| <i>M<sub>r</sub></i>   | 183,12  | 218,13  |
| dimenzije kristala / mm <sup>3</sup>                                       | 0,16×0,21×0,33  | 0,10×0,17×0,28  |
| Prostorna grupa  | <i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> | <i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i>                          |
| Kristalni sustav   | rompski   | monoklinski   |
| <i>a</i> / Å   | 4,5049(1)   | 8,9619(2)   |
| <i>b</i> / Å   | 6,5630(2)   | 6,1734(1)   |
| <i>c</i> / Å   | 24,9218(6)  | 15,5967(3)  |
| $\alpha$ / °   | 90  | 90  |
| $\beta$ / °  | 90  | 96,687(2)   |
| $\gamma$ / °   | 90  | 90  |
| <i>V</i> / Å <sup>3</sup>  | 736,83(3)   | 857,02(3)   |
| <i>Z</i>   | 4   | 4   |
| <i>D</i> <sub>calc</sub> / g cm <sup>-3</sup>                              | 1,651   | 1,691   |
| $\mu$ / mm <sup>-1</sup>   | 1,262   | 1,408   |
| <i>F</i> (000)   | 376   | 448   |
| <i>T</i> / K   | 293   | 293   |
| $\lambda$ / Å  | 1,54184   | 1,54184   |
| Ukupan br. refleksa  | 2052  | 3577  |
| Br. neovisnih refleksa   | 1316  | 1709  |
| Br. parametara   | 120   | 152   |
| <i>R</i> <sub>int</sub>  | 0,023   | 0,015   |
| <i>R</i> <sup>a</sup> , <i>wR</i> <sup>b</sup> [ <i>I</i> ≥2σ( <i>I</i> )] | 0,0349, 0,0969  | 0,0377, 0,1031  |
| Prikladnost modela, <i>S</i> <sup>c</sup>                                  | 0,93  | 0,91  |
| $\Delta\rho_{\min}, \Delta\rho_{\max}$ / e Å <sup>-3</sup>                 | -0,18, 0,18   | -0,12, 0,20   |
| Flackov parametar  | 0,01(17)  |   |

**Tablica D2.** Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme A entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | A            | 80,6             |
| 2     | -                  | -     | -                                | A            | 84,1             |
| 3     | -                  | -     | -                                | A            | 80,8             |
| 4     | -                  | -     | -                                | A            | 82,1             |
| 5     | 1                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 77,2             |
| 6     | 2                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 73,3             |
| 7     | 3                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,9             |
| 8     | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 76,3             |
| 9     | 5                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 78,2             |
| 10    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,3             |
| 11    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 69,2             |
| 12    | 8                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 80,5             |
| 13    | 9                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 78,4             |
| 14    | 10                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 81,0             |
| 15    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,4             |
| 16    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | A            | 83,2             |

**Tablica D3.** Prikaz onečišćenja na ishod kristalizacije forme D entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | D            | 88,5             |
| 2     | -                  | -     | -                                | D            | 87,5             |
| 3     | -                  | -     | -                                | D            | 88,2             |
| 4     | -                  | -     | -                                | D            | 87,1             |
| 5     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 87,5             |
| 6     | 2                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 85,3             |
| 7     | 3                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 87,9             |
| 8     | 4                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 88,6             |
| 9     | 5                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 88,1             |

**Tablica D3.** (nastavak) Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme D entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 10    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | D i A        | 89,1             |
| 11    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | D i A        | 86,4             |
| 12    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | D i A        | 87,2             |
| 13    | 6                  | 1     | cijepljenje                      | D i A        | 88,2             |
| 14    | 6                  | 1     | cijepljenje                      | D i A        | 87,1             |
| 15    | 6                  | 0,1   | cijepljenje                      | D            | 87,4             |
| 16    | 6                  | 0,1   | cijepljenje                      | D            | 88,2             |
| 17    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 87,5             |
| 18    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 89,1             |
| 19    | 6                  | 1     | obogaćeni uzorak                 | D            | 86,2             |
| 20    | 6                  | 1     | obogaćeni uzorak                 | D            | 87,9             |
| 21    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 89,7             |
| 22    | 8                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 85,1             |
| 23    | 9                  | 5     | cijepljenje                      | D            | 86,3             |
| 24    | 10                 | 5     | cijepljenje                      | D            | 86,1             |
| 25    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 88,2             |
| 26    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 87,5             |
| 27    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 89,8             |
| 28    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 89,2             |
| 29    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 88,5             |
| 30    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 88,5             |
| 31    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 86,8             |
| 32    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 89,5             |
| 33    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 88,7             |
| 34    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | D            | 89,1             |
| 35    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | D            | 88,6             |

**Tablica D4.** Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme E entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD)   | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|----------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | E              | 92,7             |
| 2     | -                  | -     | -                                | E              | 93,5             |
| 3     | -                  | -     | -                                | E              | 90,1             |
| 4     | -                  | -     | -                                | E              | 92,5             |
| 5     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 91,1             |
| 6     | 2                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 94,7             |
| 7     | 3                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 90,6             |
| 8     | 4                  | 5     | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 90,6             |
| 9     | 4                  | 5     | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 91,5             |
| 10    | 4                  | 5     | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 91,3             |
| 11    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 93,0             |
| 12    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 92,8             |
| 13    | 4                  | 0,1   | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 90,8             |
| 14    | 4                  | 0,1   | cijepljenje                      | E i $\delta$   | 91,5             |
| 15    | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | E              | 92,5             |
| 16    | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | E              | 93,0             |
| 17    | 5                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 90,6             |
| 18    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 92,7             |
| 19    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | E, A i $\beta$ | 92,9             |
| 20    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | E, A i $\beta$ | 93,1             |
| 21    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | E, A i $\beta$ | 93,5             |
| 22    | 7                  | 1     | cijepljenje                      | E, A i $\beta$ | 93,2             |
| 23    | 7                  | 1     | cijepljenje                      | E, A i $\beta$ | 93,0             |
| 24    | 7                  | 0,1   | cijepljenje                      | E              | 92,6             |
| 25    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | E              | 93,5             |
| 26    | 8                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 94,5             |
| 27    | 9                  | 5     | cijepljenje                      | E              | 91,5             |
| 28    | 10                 | 5     | cijepljenje                      | E              | 92,8             |
| 29    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | E i A          | 93,0             |

**Tablica D4.** (nastavak) Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme E entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 30    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | E i A        | 92,2             |
| 31    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | E i A        | 93,2             |
| 32    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | E i A        | 93,6             |
| 33    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | E i A        | 92,8             |
| 34    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | E            | 91,5             |
| 35    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | E            | 93,1             |
| 36    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | E            | 92,8             |

**Tablica D5.** Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\alpha$  entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD)        | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|---------------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | $\alpha$            | 89,9             |
| 2     | -                  | -     | -                                | $\alpha$            | 88,7             |
| 3     | -                  | -     | -                                | $\alpha$            | 87,4             |
| 4     | -                  | -     | -                                | $\alpha$            | 88,5             |
| 5     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$ i $\delta$ | 78,4             |
| 6     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$ i $\delta$ | 77,2             |
| 7     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$ i $\delta$ | 78,3             |
| 8     | 1                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$            | 82,1             |
| 9     | 1                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$            | 82,8             |
| 10    | 1                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\alpha$            | 85,6             |
| 11    | 1                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\alpha$            | 84,9             |
| 12    | 1                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\alpha$            | 77,1             |
| 13    | 2                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$            | 87,9             |
| 14    | 3                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$            | 88,1             |
| 15    | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$ i $\delta$ | 73,2             |
| 16    | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$ i $\delta$ | 74,8             |
| 17    | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$ i $\delta$ | 73,5             |



**Tablica D5.** (nastavak) Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\alpha$  entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD)         | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|----------------------|------------------|
| 18    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 80,2             |
| 19    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 81,1             |
| 20    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 84,2             |
| 21    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 84,6             |
| 22    | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\alpha$             | 73,6             |
| 23    | 5                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha, \delta$ i A | 80,1             |
| 24    | 5                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha, \delta$ i A | 82,8             |
| 25    | 5                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha, \delta$ i A | 80,3             |
| 26    | 5                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 85,6             |
| 27    | 5                  | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 85,2             |
| 28    | 5                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\alpha$             | 87,3             |
| 29    | 5                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\alpha$             | 86,9             |
| 30    | 5                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\alpha$             | 81,4             |
| 31    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 88,7             |
| 32    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 88,9             |
| 33    | 8                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 89,3             |
| 34    | 9                  | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 87,6             |
| 35    | 10                 | 5     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 87,5             |
| 36    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A                    | 86,8             |
| 37    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A                    | 87,9             |
| 38    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A                    | 85,4             |
| 39    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 88,8             |
| 40    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | $\alpha$             | 87,5             |
| 41    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | $\alpha$             | 88,3             |
| 42    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | $\alpha$             | 87,1             |
| 43    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\alpha$             | 87,9             |

**Tablica D6.** Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\beta$  entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | $\beta$      | 83,5             |
| 2     | -                  | -     | -                                | $\beta$      | 82,1             |
| 3     | -                  | -     | -                                | $\beta$      | 82,6             |
| 4     | -                  | -     | -                                | $\beta$      | 82,4             |
| 5     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,5             |
| 6     | 2                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 83,1             |
| 7     | 3                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 80,5             |
| 8     | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 81,4             |
| 9     | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 79,9             |
| 10    | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 82,1             |
| 11    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | $\delta$     | 81,8             |
| 12    | 4                  | 1     | cijepljenje                      | $\delta$     | 82,2             |
| 13    | 4                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,6             |
| 14    | 4                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,3             |
| 15    | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\delta$     | 81,5             |
| 16    | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\delta$     | 81,3             |
| 17    | 4                  | 1     | obogaćeni uzorak                 | $\beta$      | 82,9             |
| 18    | 4                  | 1     | obogaćeni uzorak                 | $\beta$      | 80,6             |
| 19    | 5                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,2             |
| 20    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$ i A  | 82,7             |
| 21    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$ i A  | 81,5             |
| 22    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$ i A  | 80,6             |
| 23    | 6                  | 1     | cijepljenje                      | $\beta$      | 80,9             |
| 24    | 6                  | 1     | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,5             |
| 25    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\beta$      | 81,6             |
| 26    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$ i A  | 82,1             |
| 27    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$ i A  | 83,0             |
| 28    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$ i A  | 81,8             |
| 29    | 7                  | 1     | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,4             |

**Tablica D6.** (nastavak) Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\beta$  entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 30    | 7                  | 1     | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,8             |
| 31    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\beta$      | 83,4             |
| 32    | 8                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 82,0             |
| 33    | 9                  | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 83,1             |
| 34    | 10                 | 5     | cijepljenje                      | $\beta$      | 83,4             |
| 35    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 81,1             |
| 36    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 82,9             |
| 37    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 80,4             |
| 38    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 81,3             |
| 39    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 79,9             |
| 40    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 78,4             |
| 41    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 80,5             |
| 42    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,2             |
| 43    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 81,4             |
| 44    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | $\beta$      | 83,2             |
| 45    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | $\beta$      | 80,1             |

**Tablica D7.** Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\delta$  entakapona.

| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | $\delta$     | 86,1             |
| 2     | -                  | -     | -                                | $\delta$     | 85,5             |
| 3     | -                  | -     | -                                | $\delta$     | 85,2             |
| 4     | -                  | -     | -                                | $\delta$     | 86,8             |
| 5     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 81,7             |
| 6     | 2                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 82,7             |
| 7     | 3                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 86,3             |
| 8     | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 85,3             |
| 9     | 5                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 84,6             |

**Tablica D7.** (nastavak) Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\delta$  entakapona.

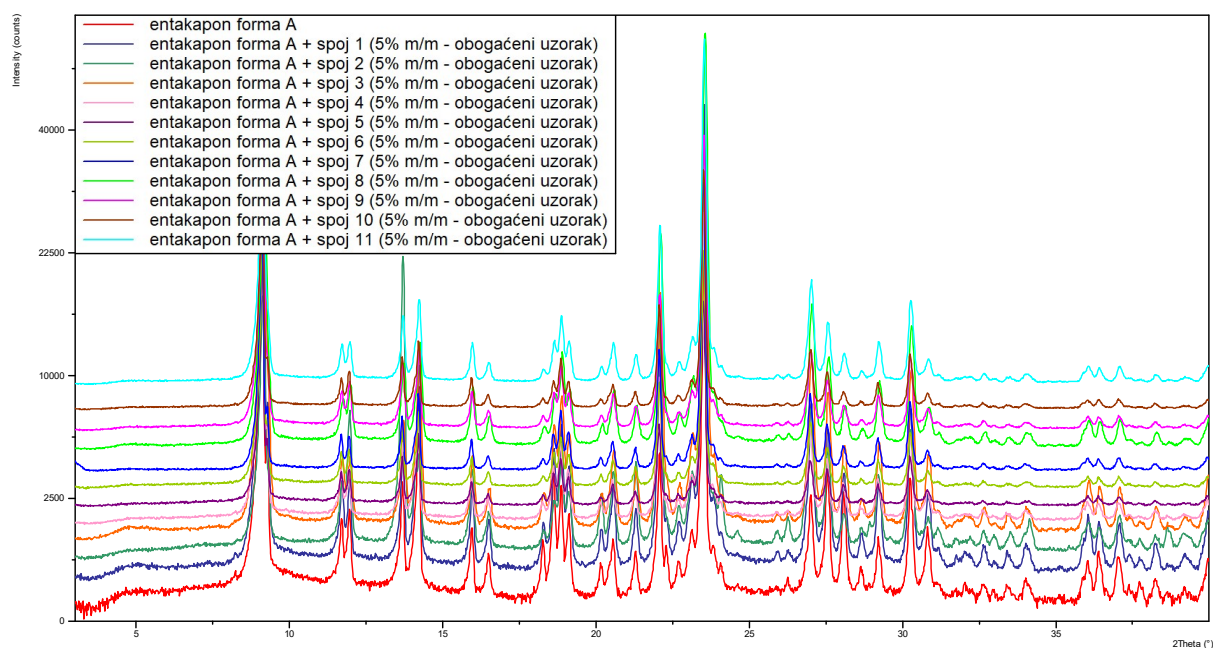
| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 10    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 81,4             |
| 11    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | A            | 85,9             |
| 12    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | A            | 85,2             |
| 13    | 7                  | 5     | cijepljenje                      | A            | 86,8             |
| 14    | 7                  | 1     | cijepljenje                      | A            | 85,3             |
| 15    | 7                  | 1     | cijepljenje                      | A            | 86,5             |
| 16    | 7                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\delta$     | 86,1             |
| 17    | 7                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\delta$     | 85,9             |
| 18    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\delta$     | 85,4             |
| 19    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\delta$     | 83,8             |
| 20    | 8                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 84,2             |
| 21    | 9                  | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 80,2             |
| 22    | 10                 | 5     | cijepljenje                      | $\delta$     | 85,3             |
| 23    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 82,1             |
| 24    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 83,4             |
| 25    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 82,9             |
| 26    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 81,1             |
| 27    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 82,3             |
| 28    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 81,9             |
| 29    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 81,5             |
| 30    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,1             |
| 31    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,7             |
| 32    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | A            | 82,8             |
| 33    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | A            | 81,5             |
| 34    | 11                 | 0,1   | obogaćeni uzorak                 | $\delta$     | 82,3             |
| 35    | 11                 | 0,1   | obogaćeni uzorak                 | $\delta$     | 82,0             |

**Tablica D8.** Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\tau$  entakapona.

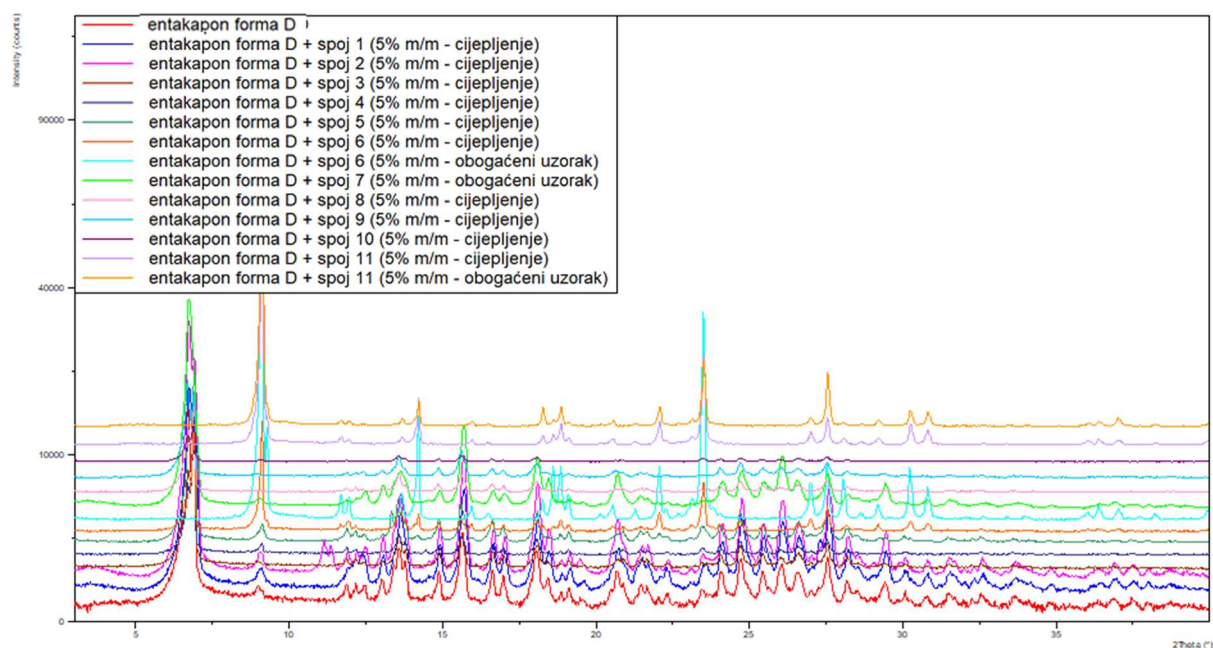
| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 1     | -                  | -     | -                                | $\tau$       | 85,4             |
| 2     | -                  | -     | -                                | $\tau$       | 85,2             |
| 3     | -                  | -     | -                                | $\tau$       | 84,8             |
| 4     | -                  | -     | -                                | $\tau$       | 84,3             |
| 5     | 1                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 85,2             |
| 6     | 1                  | 5     | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,7             |
| 7     | 2                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 85,5             |
| 8     | 2                  | 5     | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,7             |
| 9     | 3                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 85,8             |
| 10    | 3                  | 5     | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,2             |
| 11    | 4                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 84,2             |
| 12    | 4                  | 5     | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,1             |
| 13    | 5                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 84,9             |
| 14    | 5                  | 5     | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,3             |
| 15    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 86,3             |
| 16    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 85,9             |
| 17    | 6                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 86,0             |
| 18    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | A            | 85,4             |
| 19    | 6                  | 5     | cijepljenje                      | A            | 85,5             |
| 20    | 6                  | 1     | cijepljenje                      | A            | 85,2             |
| 21    | 6                  | 1     | cijepljenje                      | A            | 85,7             |
| 22    | 6                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,1             |
| 23    | 6                  | 0,1   | cijepljenje                      | $\tau$       | 85,1             |
| 24    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 85,0             |
| 25    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 85,9             |
| 26    | 7                  | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 84,8             |
| 27    | 7                  | 1     | obogaćeni uzorak                 | A            | 84,5             |
| 28    | 7                  | 1     | obogaćeni uzorak                 | A            | 84,7             |
| 29    | 7                  | 0,1   | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 83,9             |

**Tablica D8.** (nastavak) Prikaz utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\tau$  entakapona.

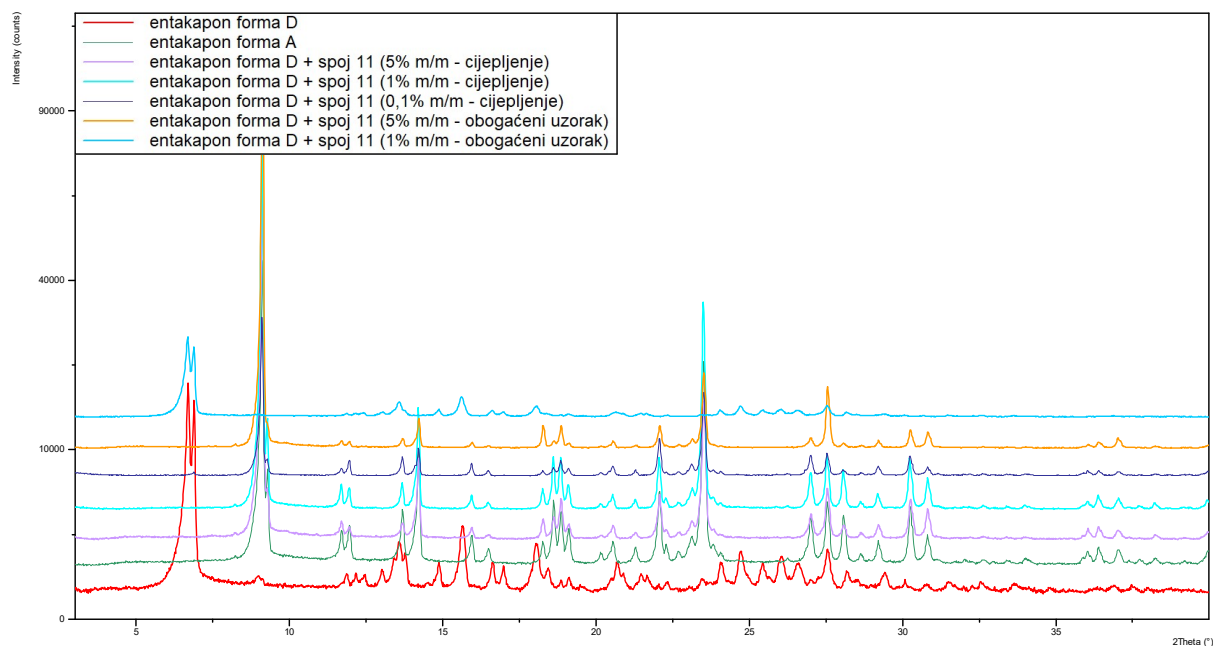
| Pokus | Dodano onečišćenje | w / % | obogaćeni uzorak ili cijepljenje | Forma (XRPD) | Iskorištenje / % |
|-------|--------------------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 30    | 7                  | 0,1   | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 84,6             |
| 43    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 85,6             |
| 44    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 84,7             |
| 45    | 11                 | 5     | obogaćeni uzorak                 | A            | 84,0             |
| 46    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 84,1             |
| 47    | 11                 | 1     | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 85,2             |
| 48    | 11                 | 0,1   | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 83,8             |
| 49    | 11                 | 0,1   | obogaćeni uzorak                 | $\tau$       | 84,6             |
| 50    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 85,4             |
| 51    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 84,6             |
| 52    | 11                 | 5     | cijepljenje                      | A            | 84,9             |
| 53    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 84,5             |
| 54    | 11                 | 1     | cijepljenje                      | A            | 85,5             |
| 55    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 84,4             |
| 56    | 11                 | 0,1   | cijepljenje                      | A            | 85,6             |



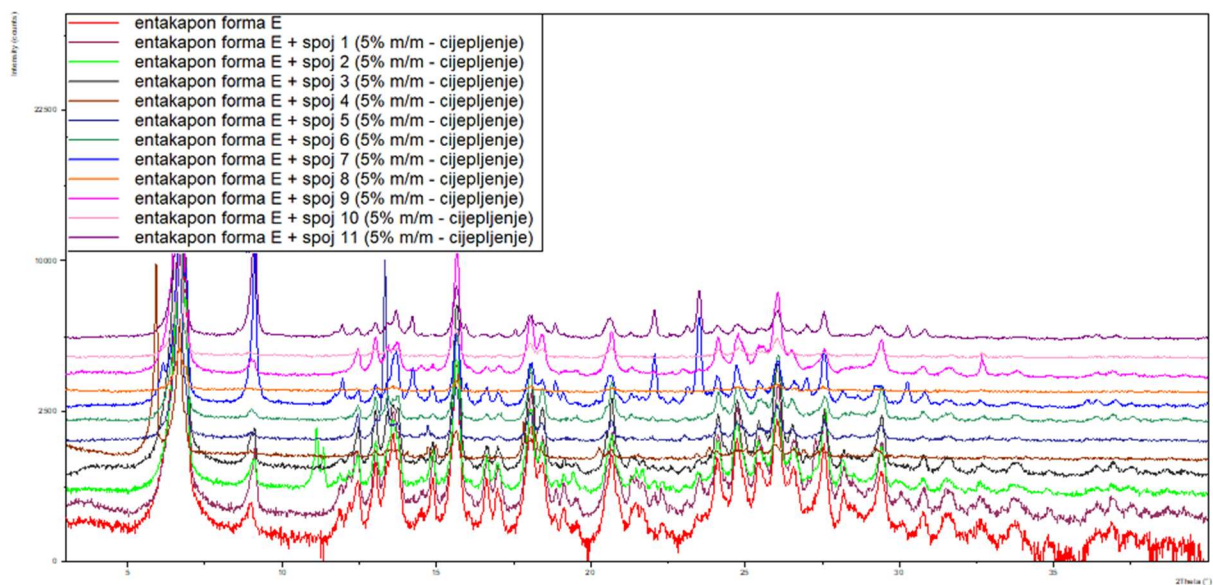
**Slika D1.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme A.



**Slika D2.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme D.

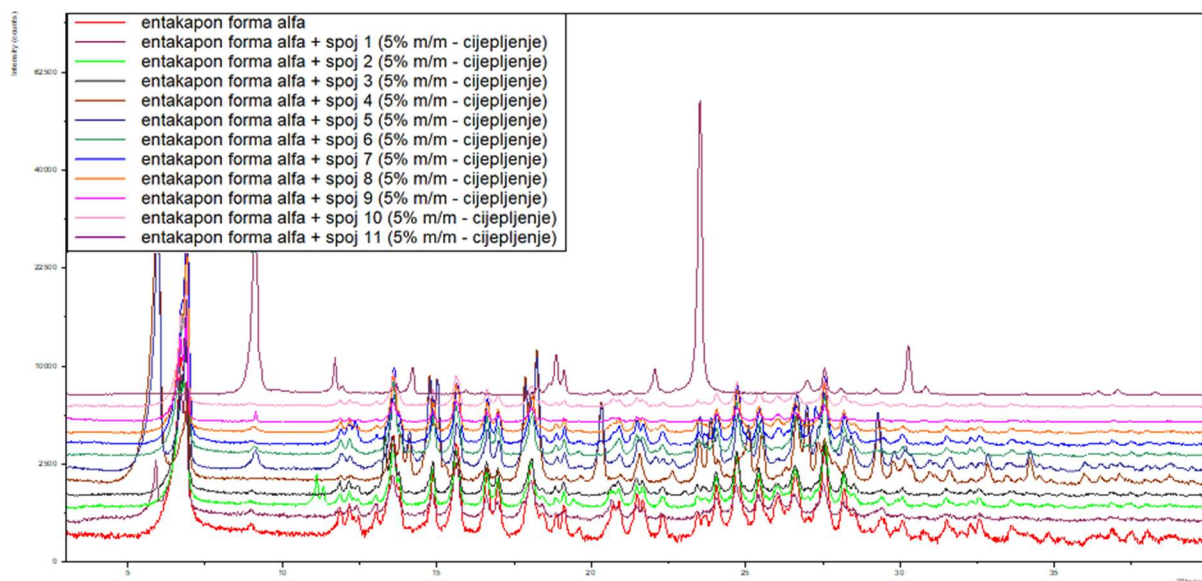


**Slika D3.** Prikaz difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja **11** na ishod kristalizacije forme D.

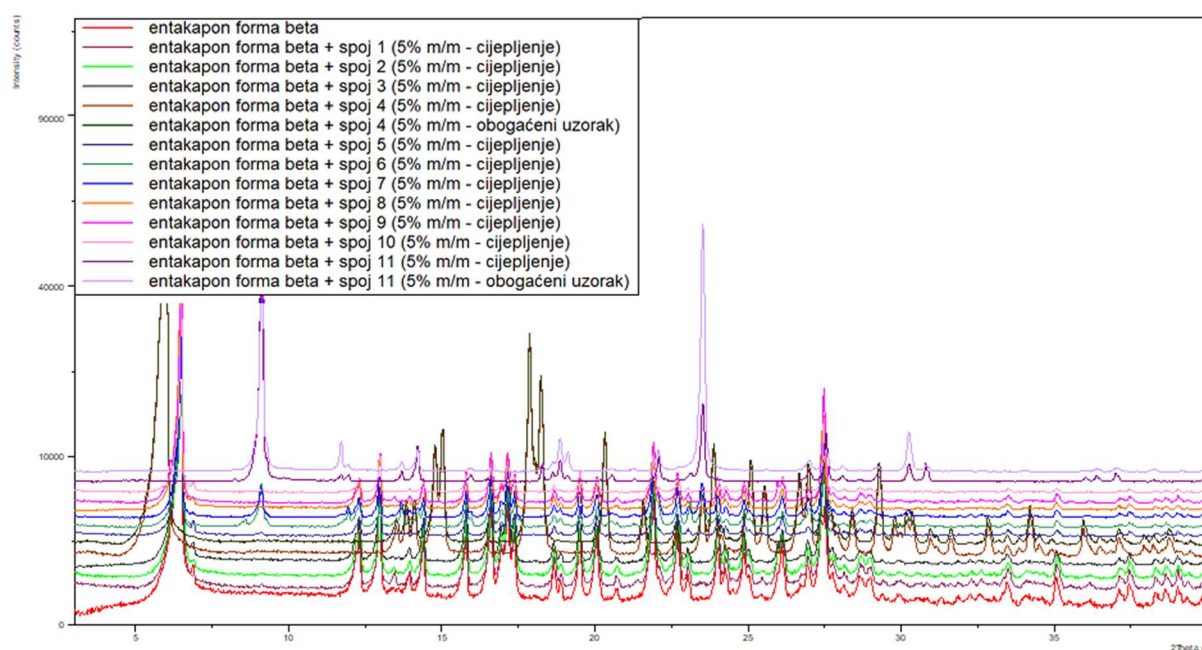


**Slika D4.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme E.

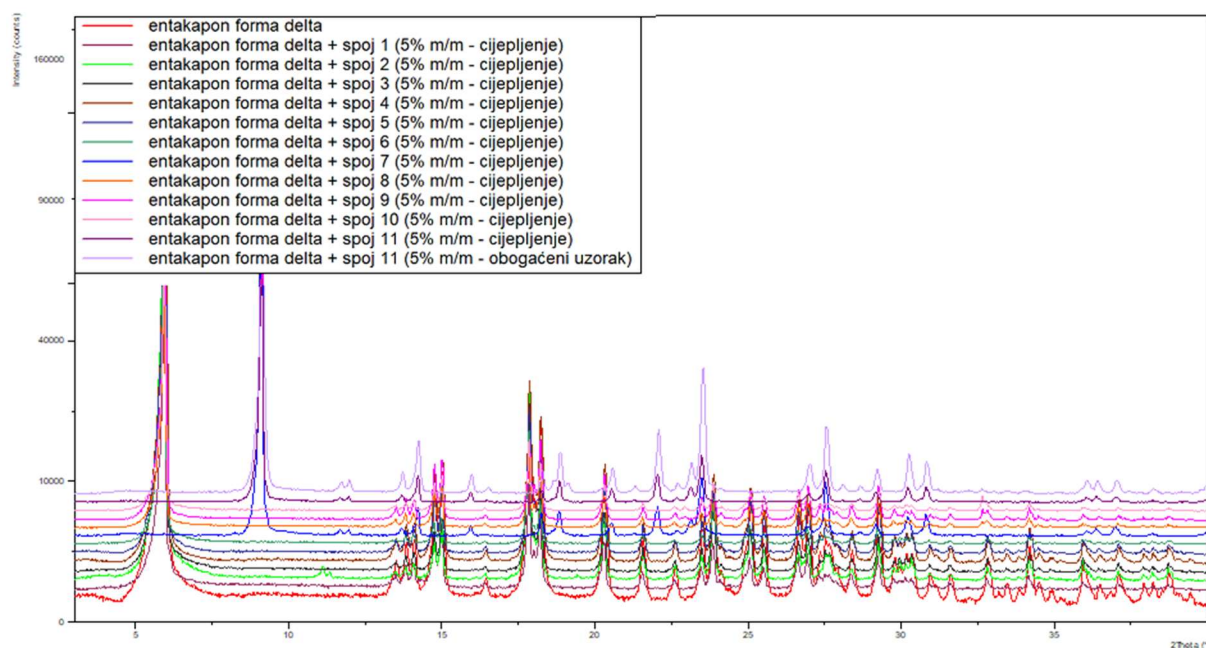




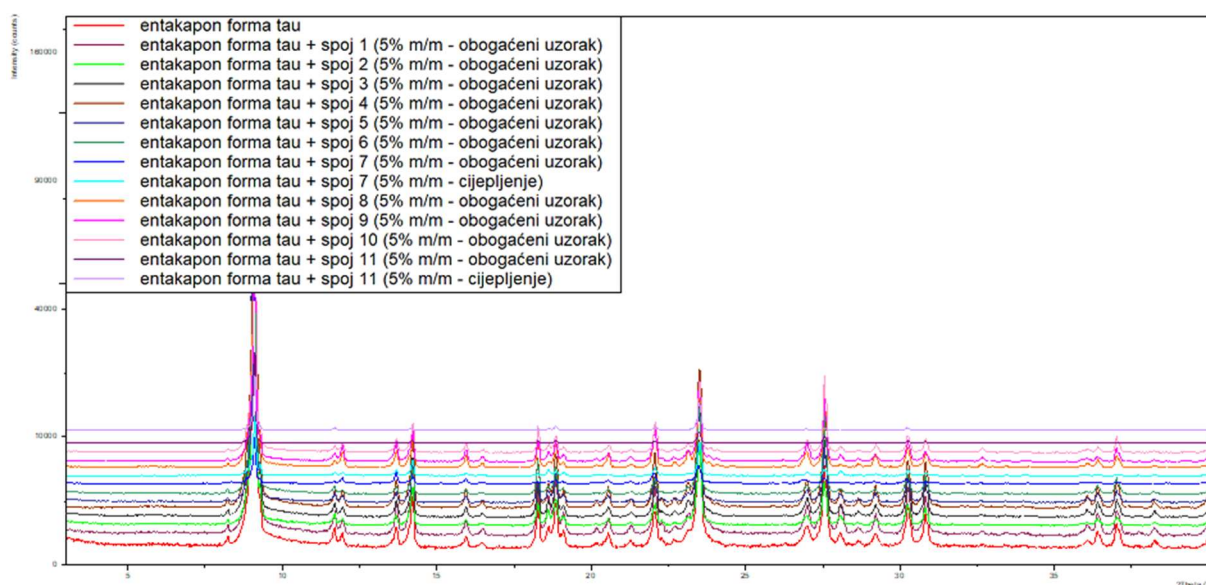
**Slika D5.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\alpha$ .



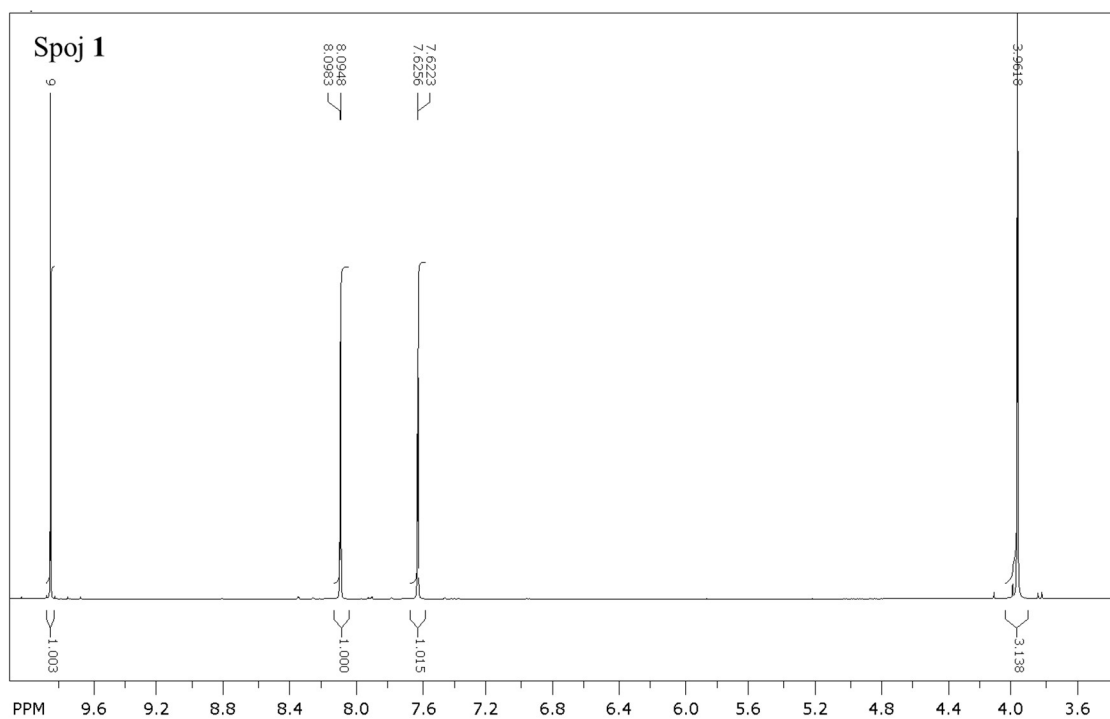
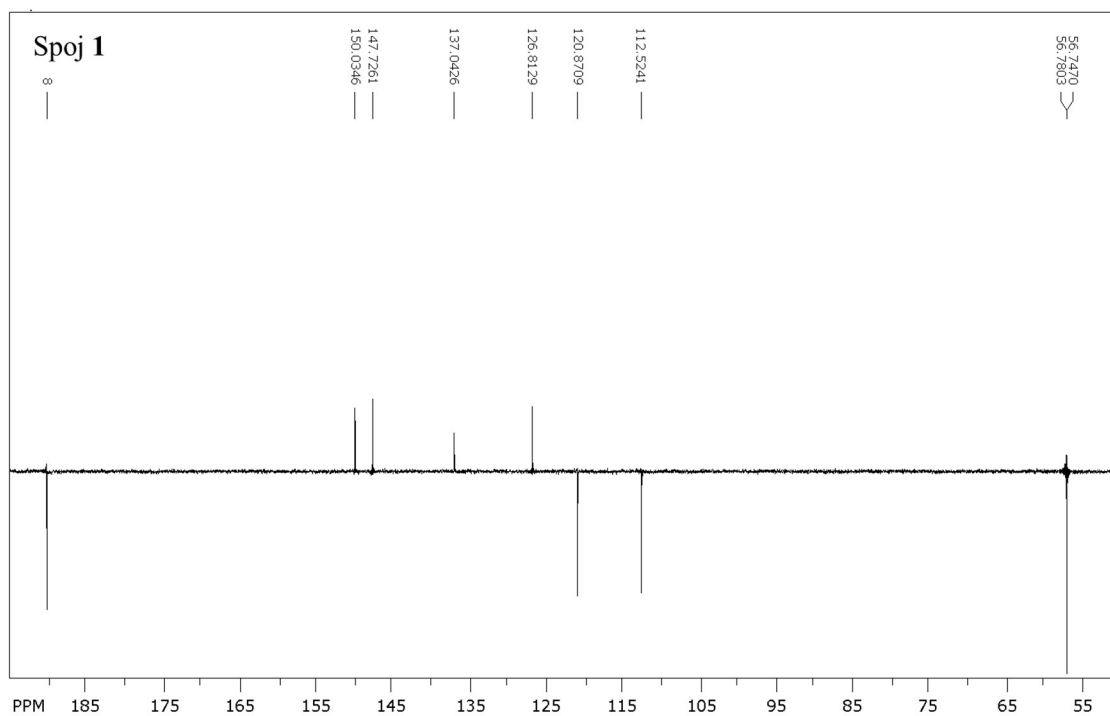
**Slika D6.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\beta$ .

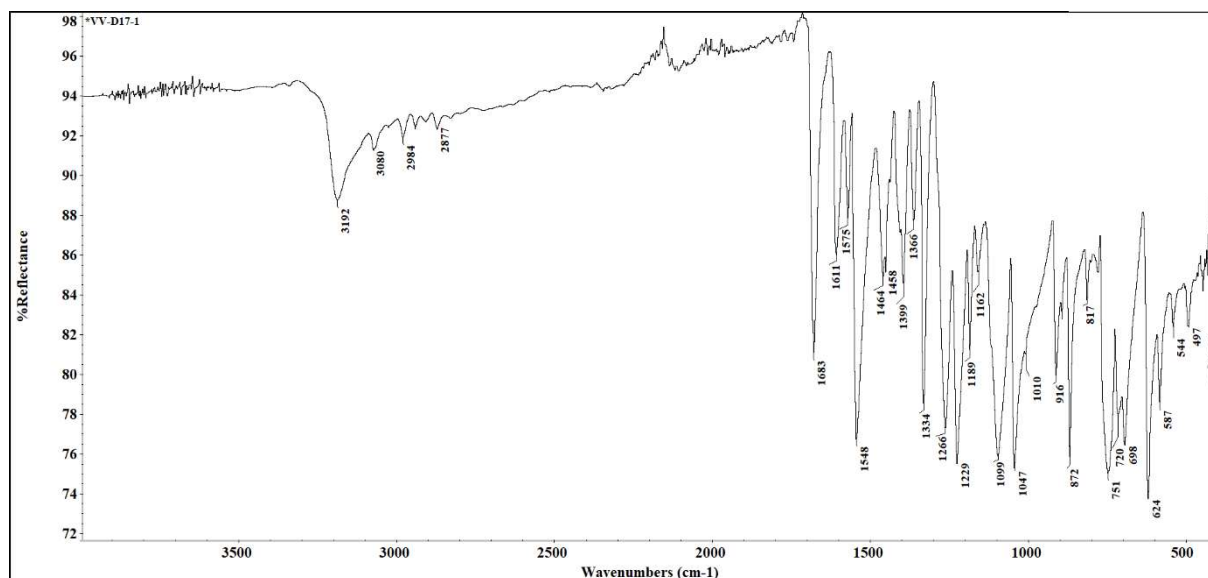


**Slika D7.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\delta$ .

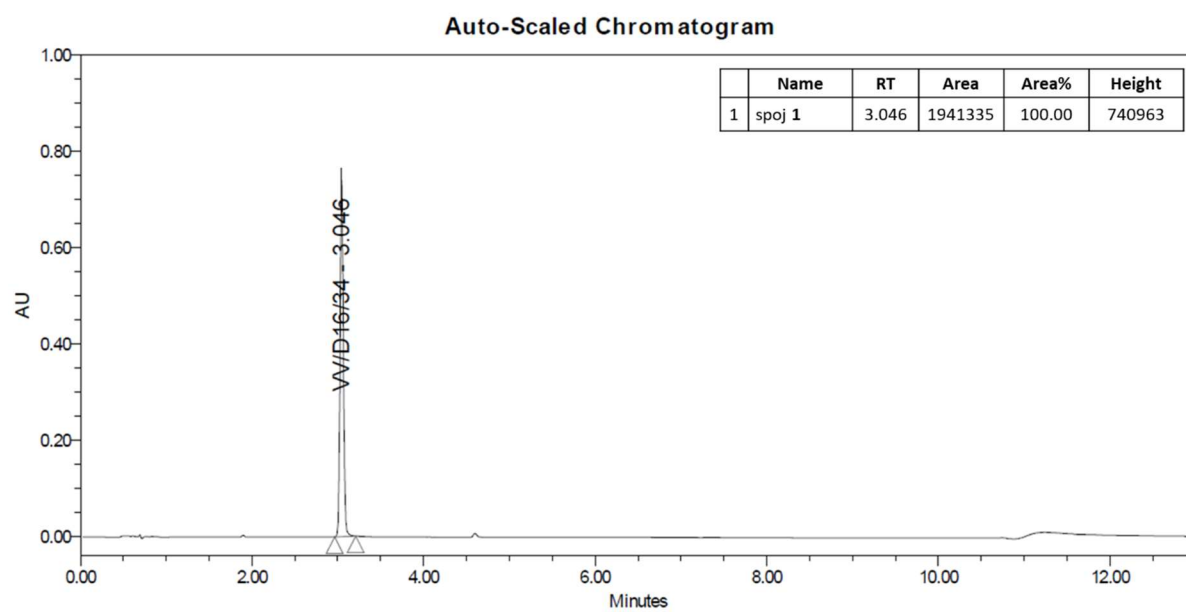


**Slika D8.** Usporedba difraktograma praha na polikristalnom uzorku izoliranih kristala iz pokusa utjecaja onečišćenja na ishod kristalizacije forme  $\tau$ .

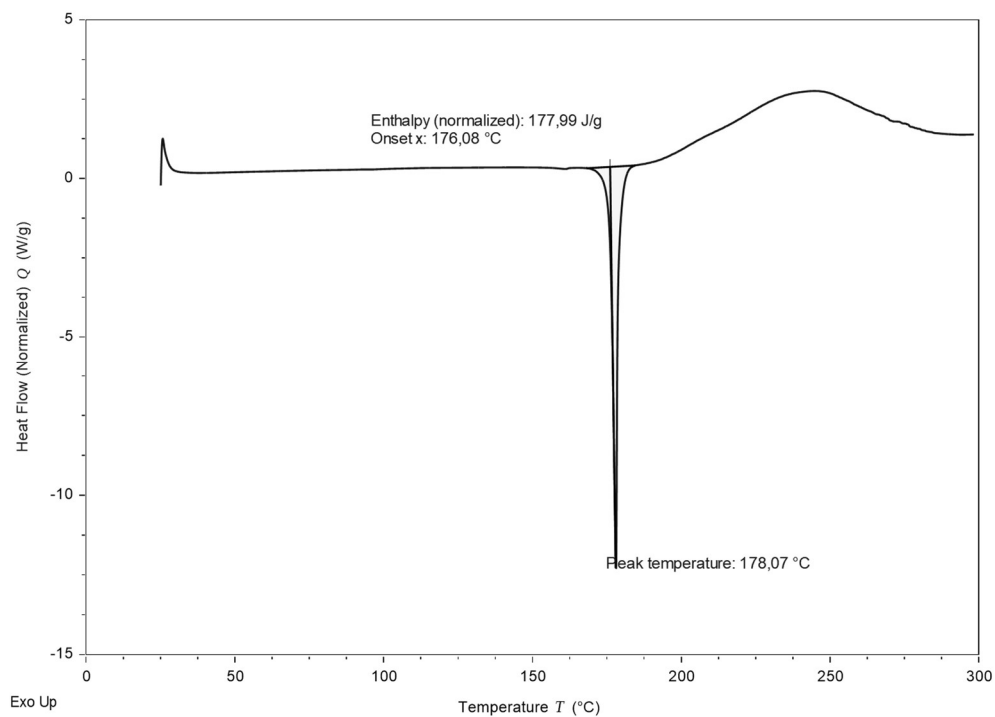
Slika D9.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 1 (DMSO- $d_6$ ).Slika D10.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 1 (DMSO- $d_6$ ).



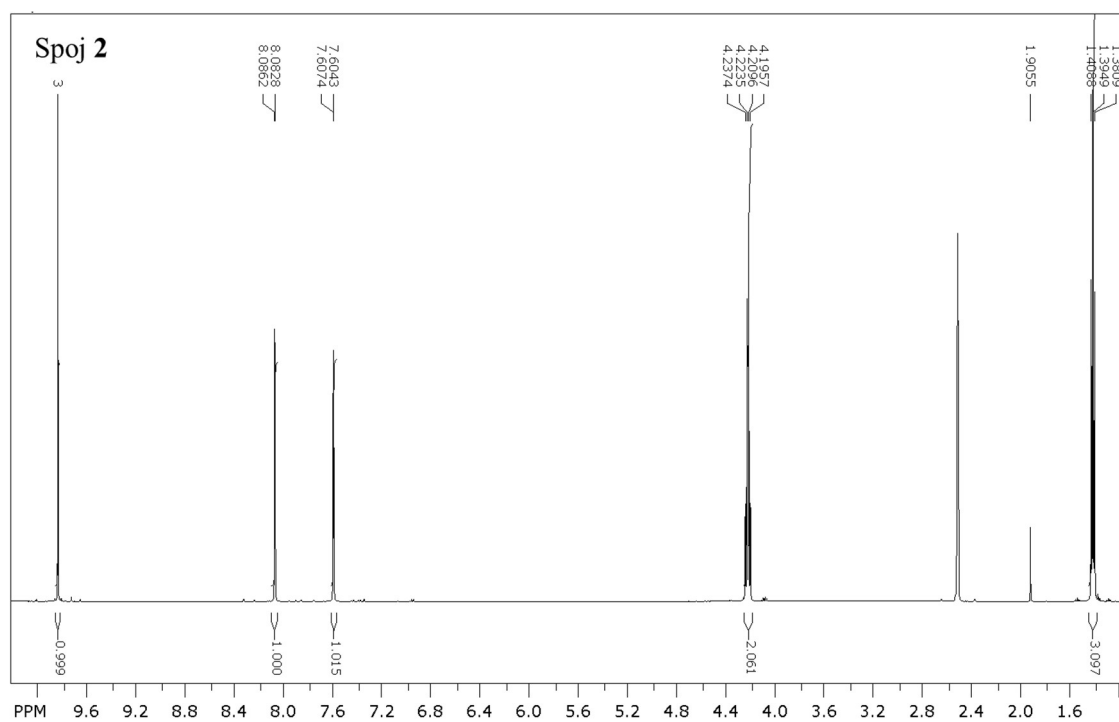
Slika D11. IR spektar spoja 1 (ATR).

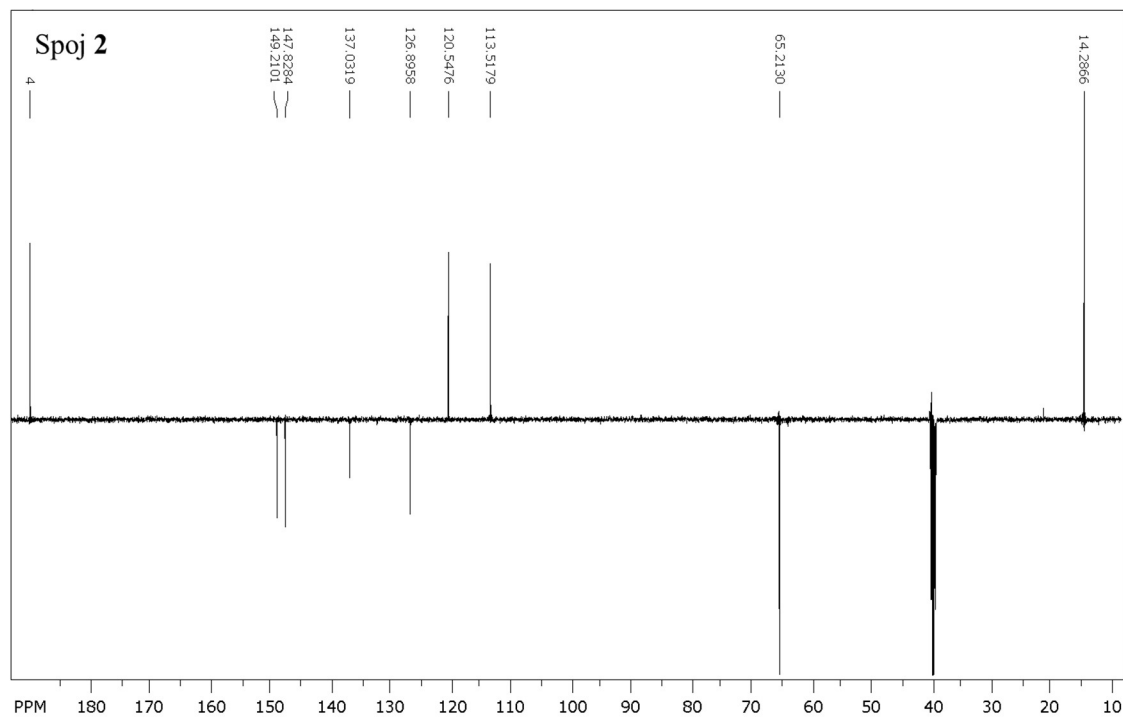
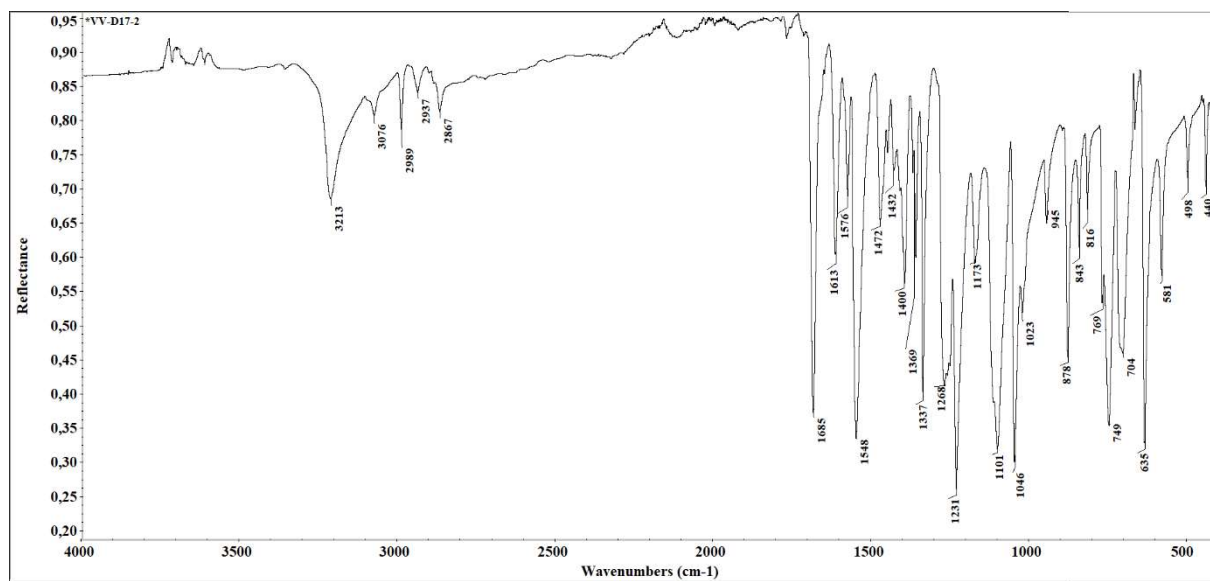


Slika D12. UHPLC kromatogram spoja 1.

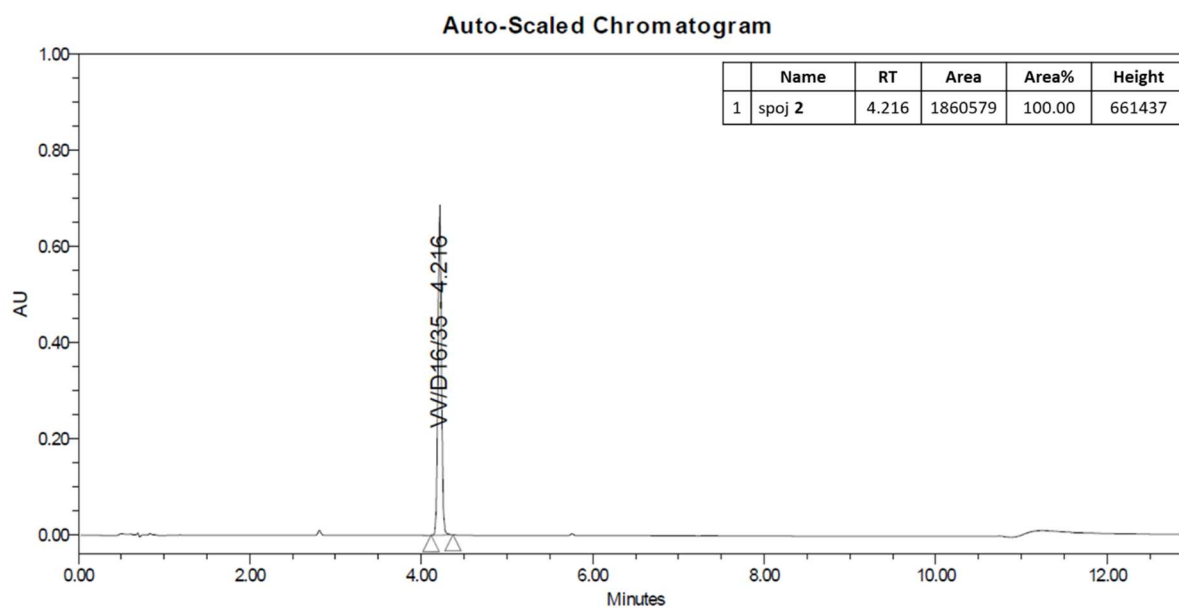


Slika D13. DSC spoja 1.

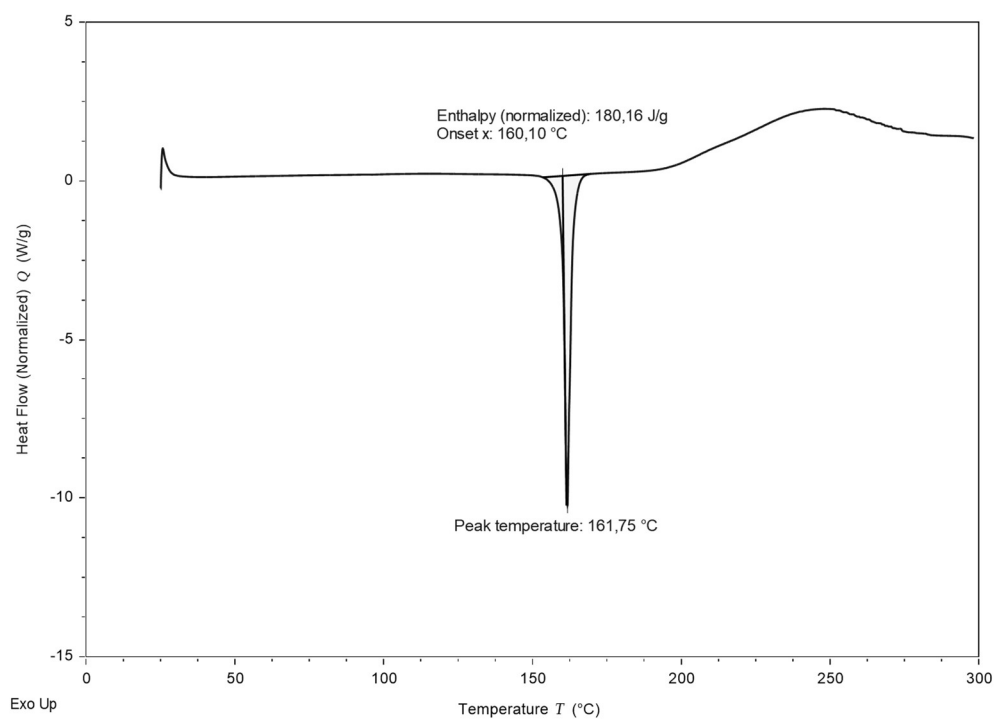
Slika D14.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 2 (DMSO- $d_6$ ).

Slika D15.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 2 (DMSO- $d_6$ ).

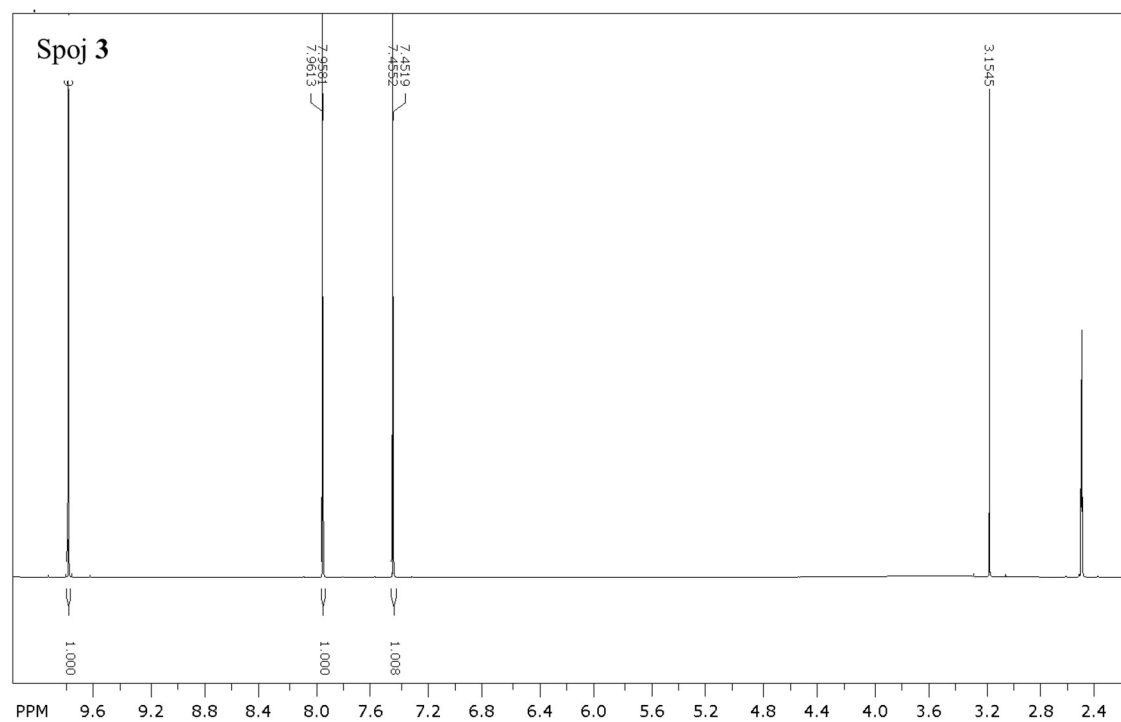
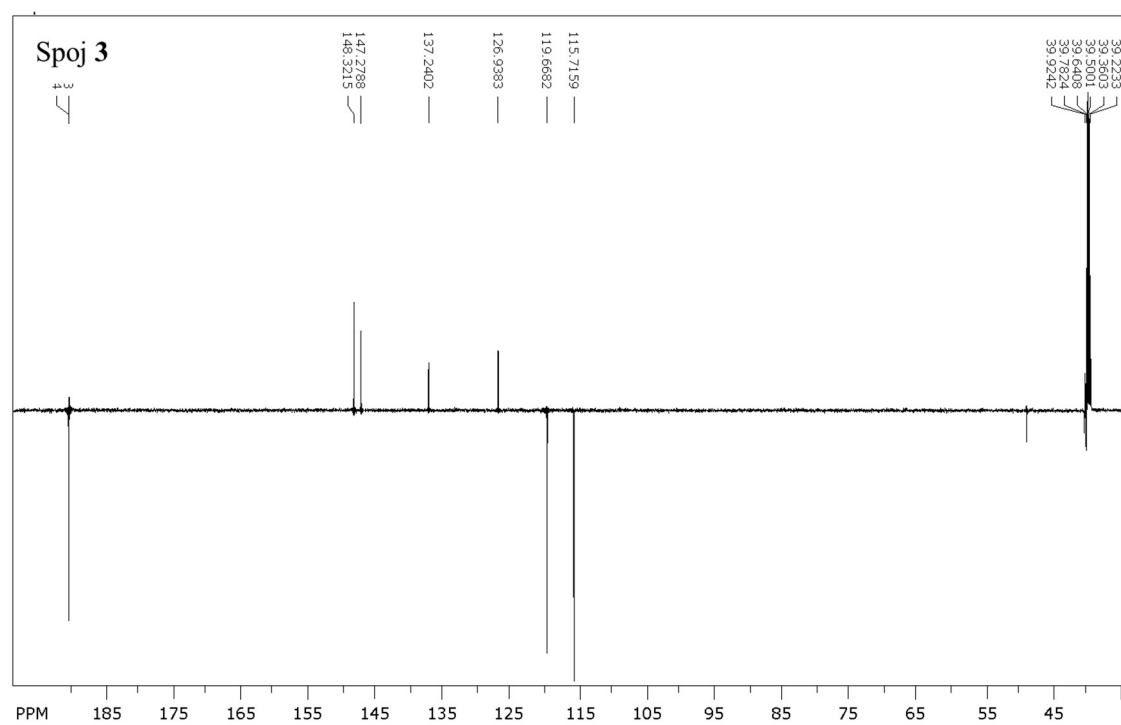
Slika D16. IR spektar spoja 2 (ATR).



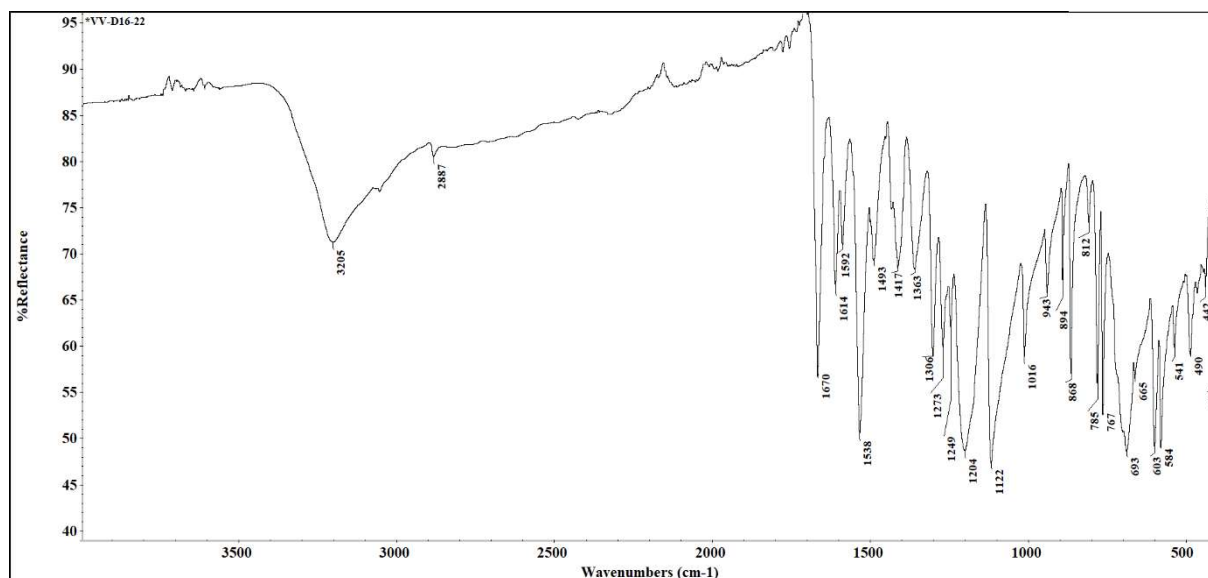
Slika D17. UHPLC kromatogram spoja 2.



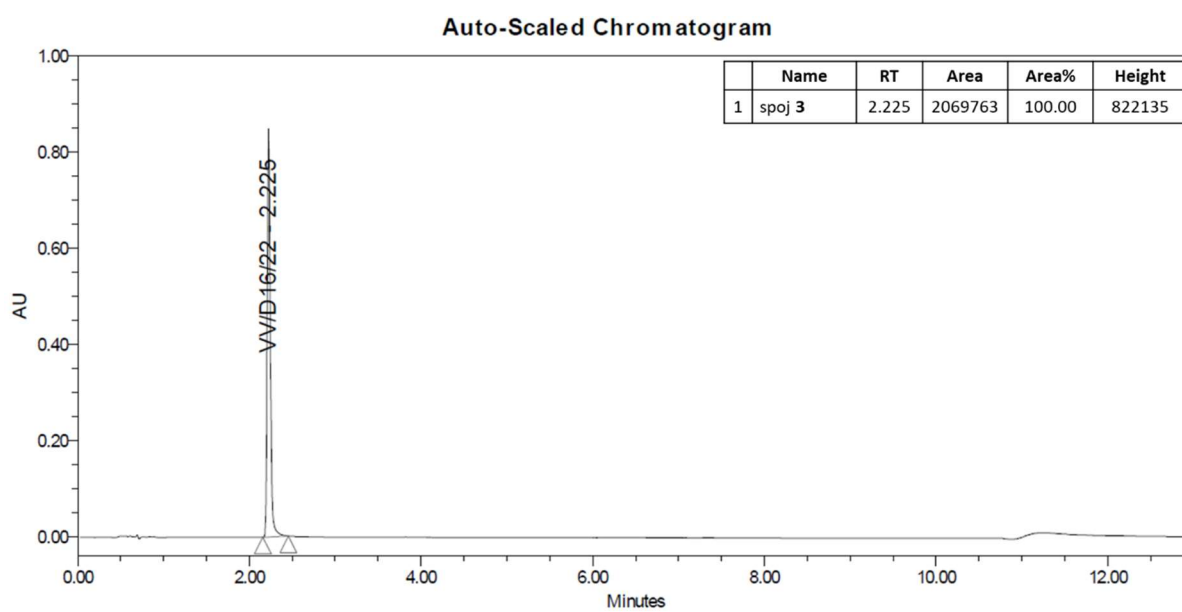
Slika D18. DSC spoja 2.

Slika D19.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 3 (DMSO- $d_6$ ).Slika D20.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 3 (DMSO- $d_6$ ).

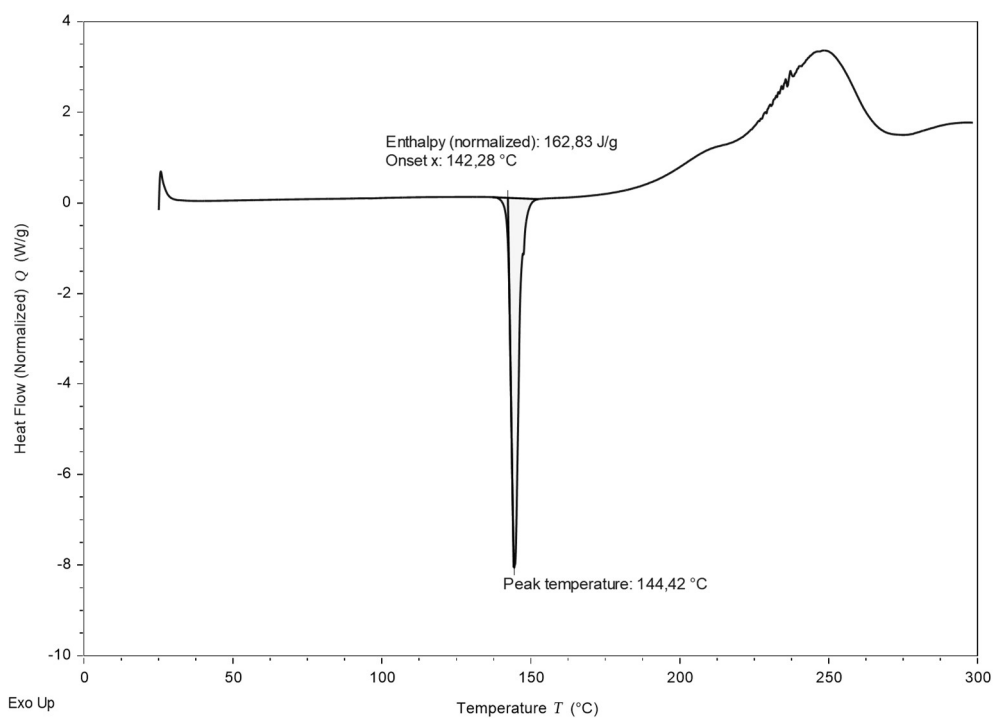




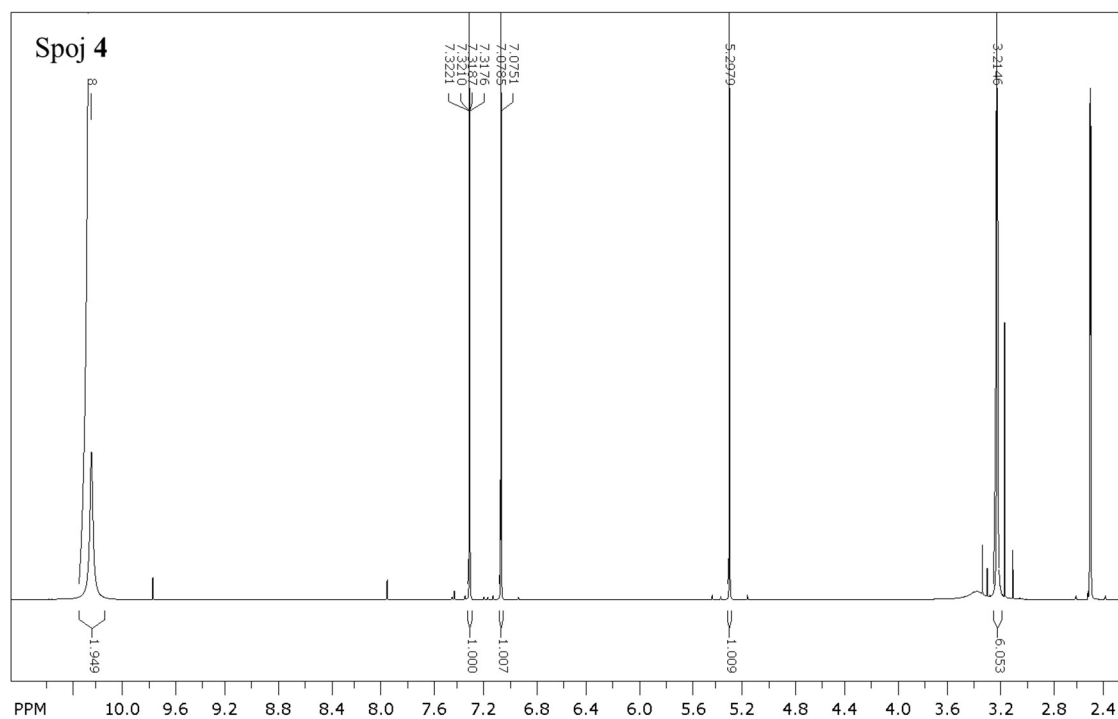
Slika D21. IR spektar spoja 3 (ATR).

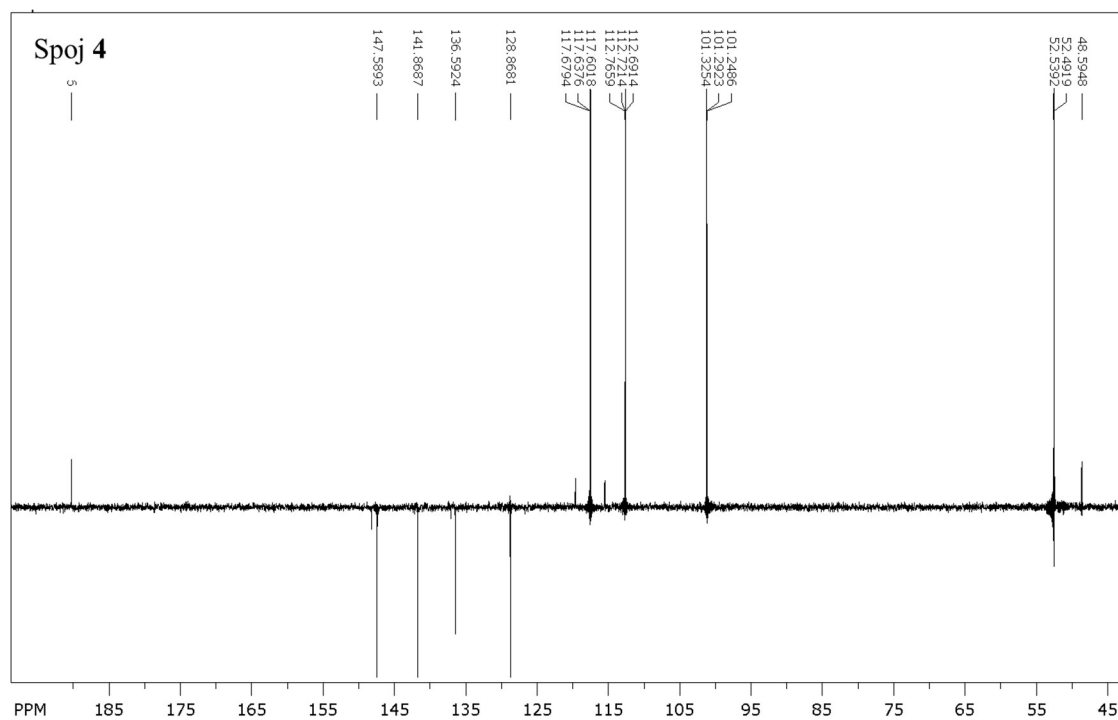
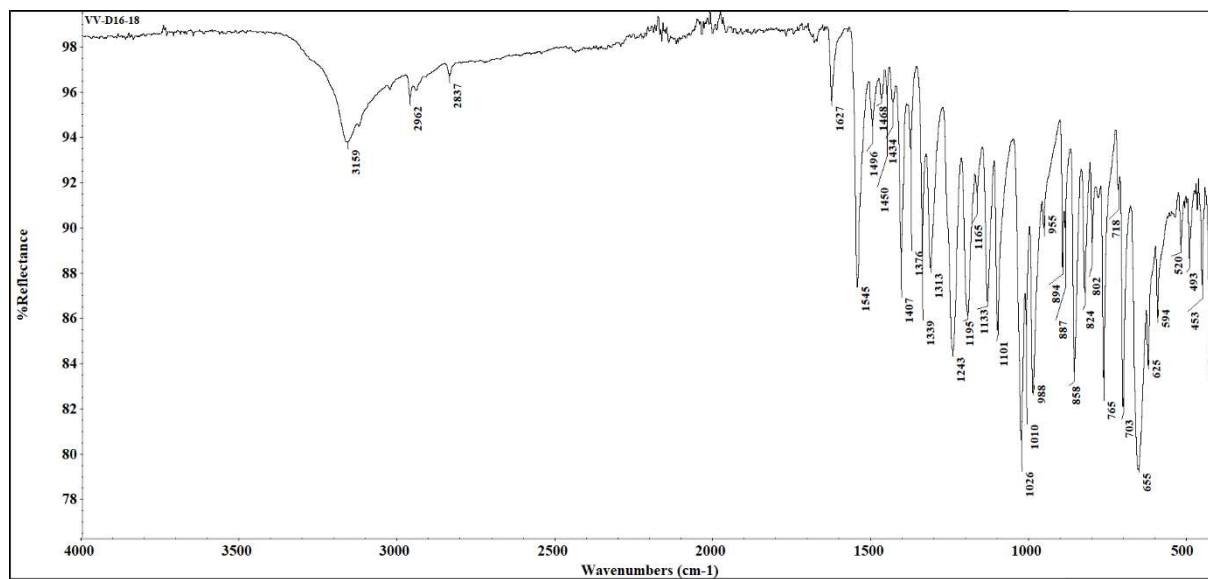


Slika D22. UHPLC kromatogram spoja 3.

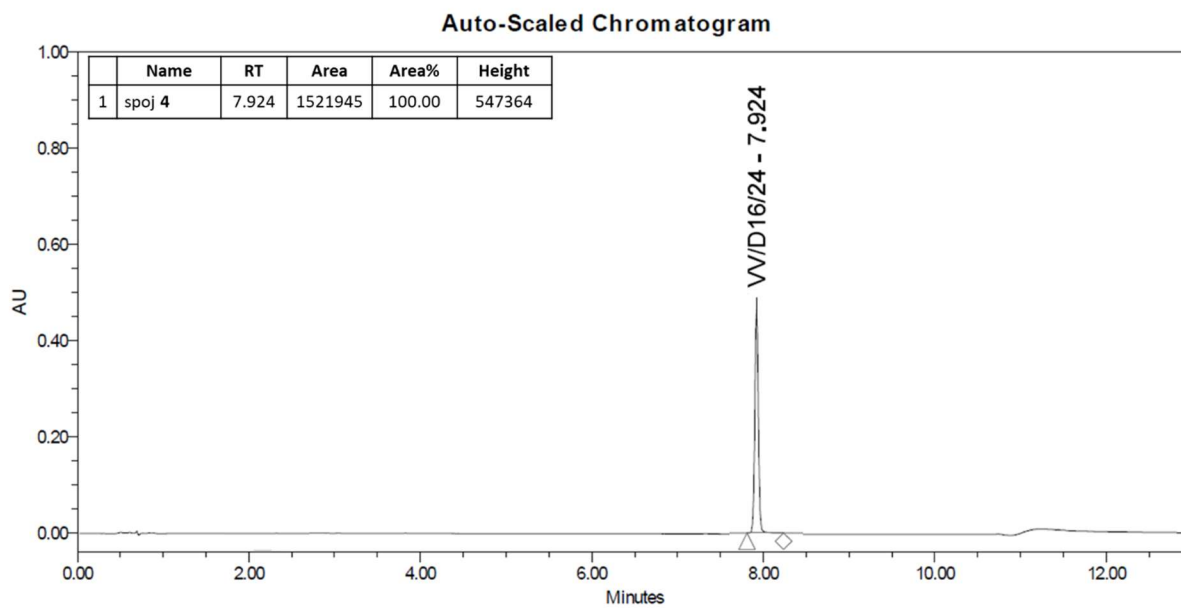


Slika D23. DSC spoja 3.

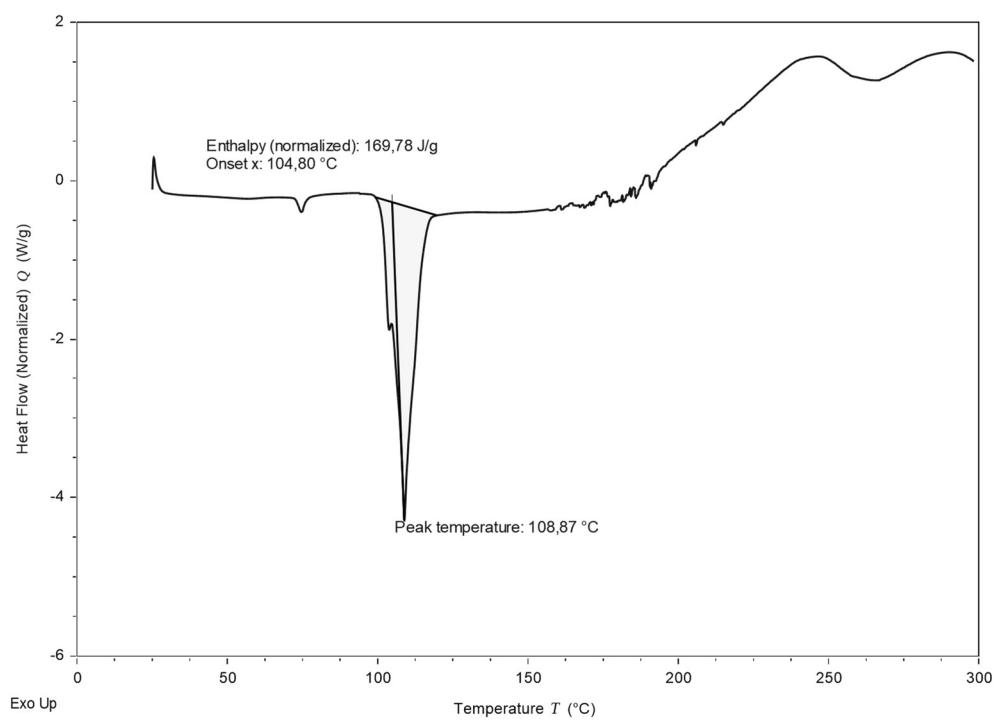
Slika D24. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 4 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Slika D25.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 4 (DMSO- $d_6$ ).

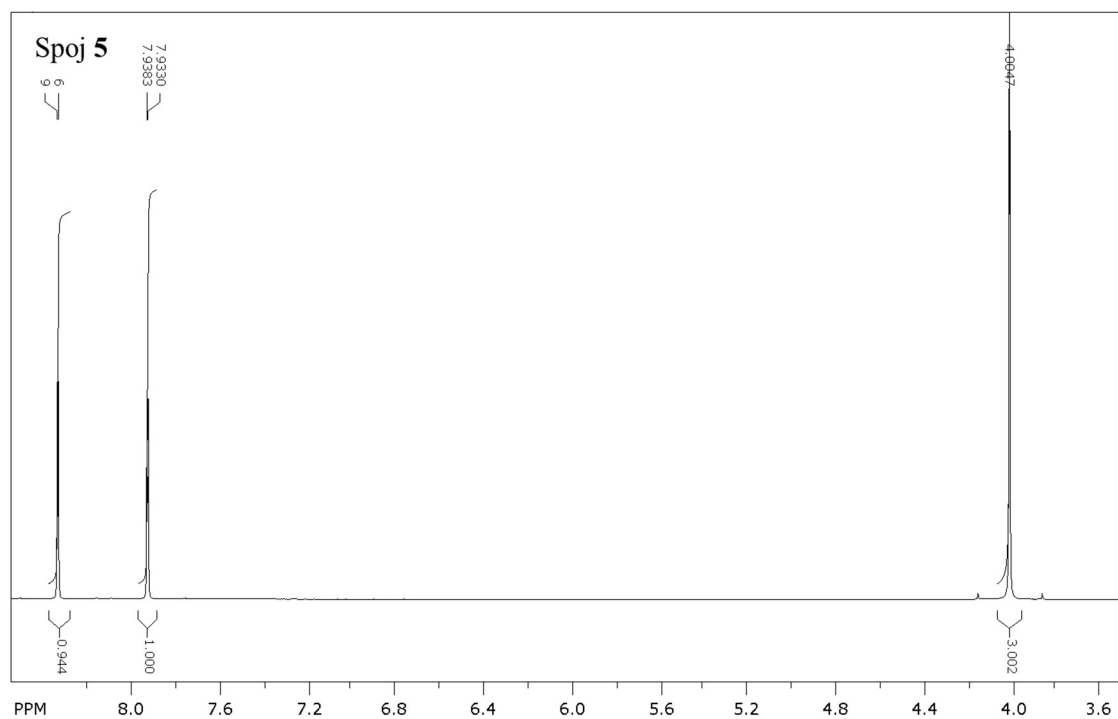
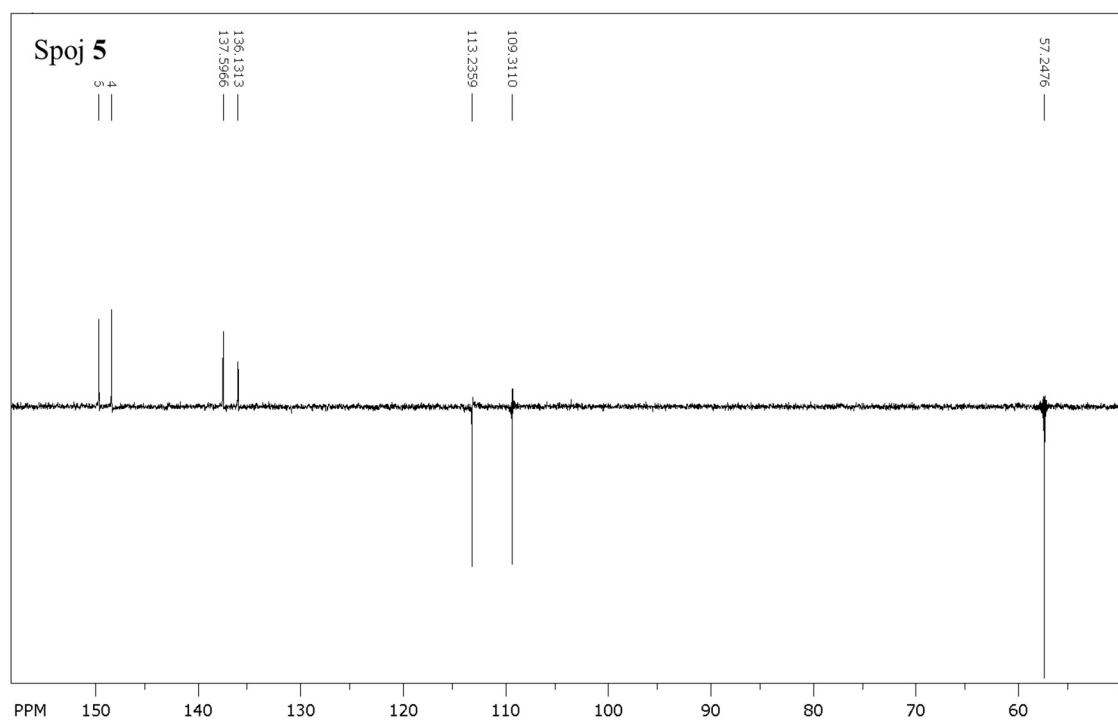
Slika D26. IR spektar spoja 4 (ATR).

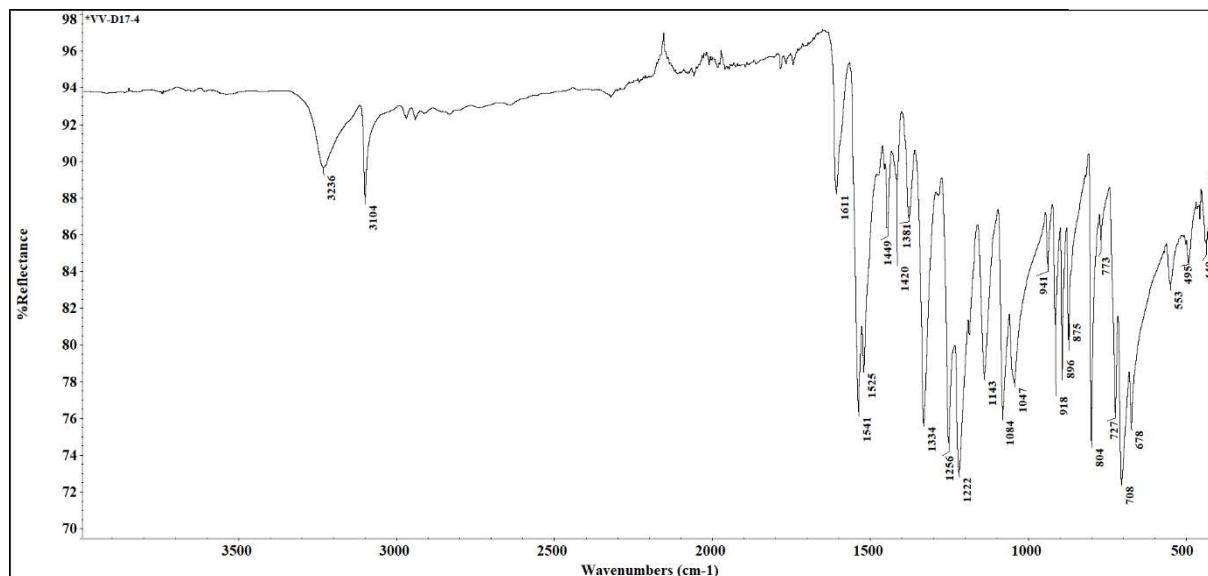


Slika D27. UHPLC kromatogram spoja 4.

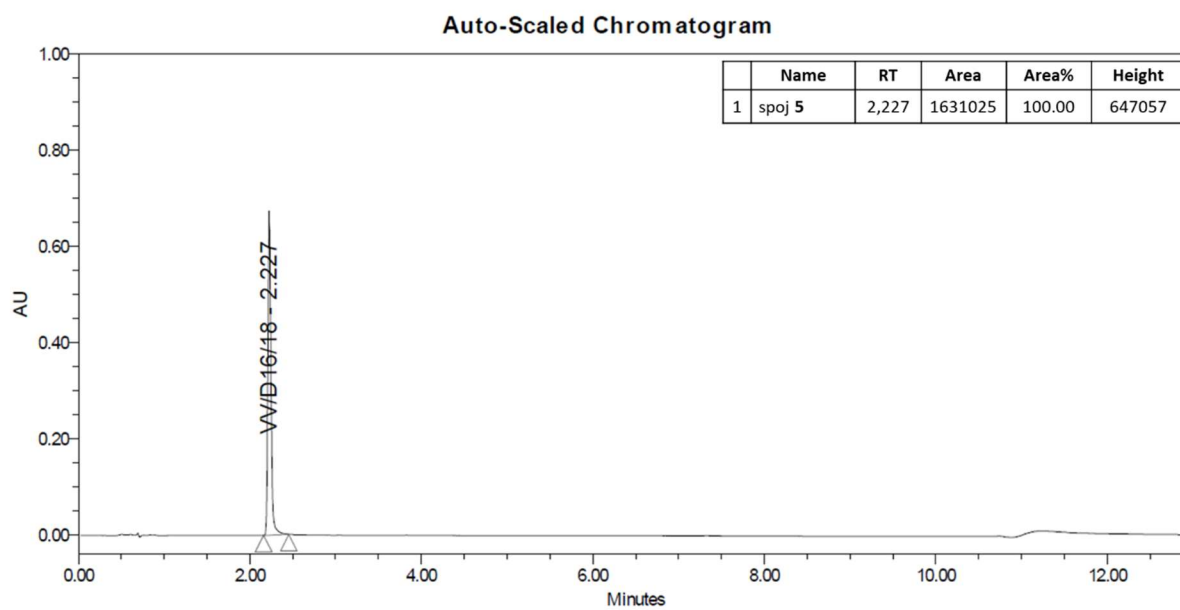


Slika D28. DSC spoja 4.

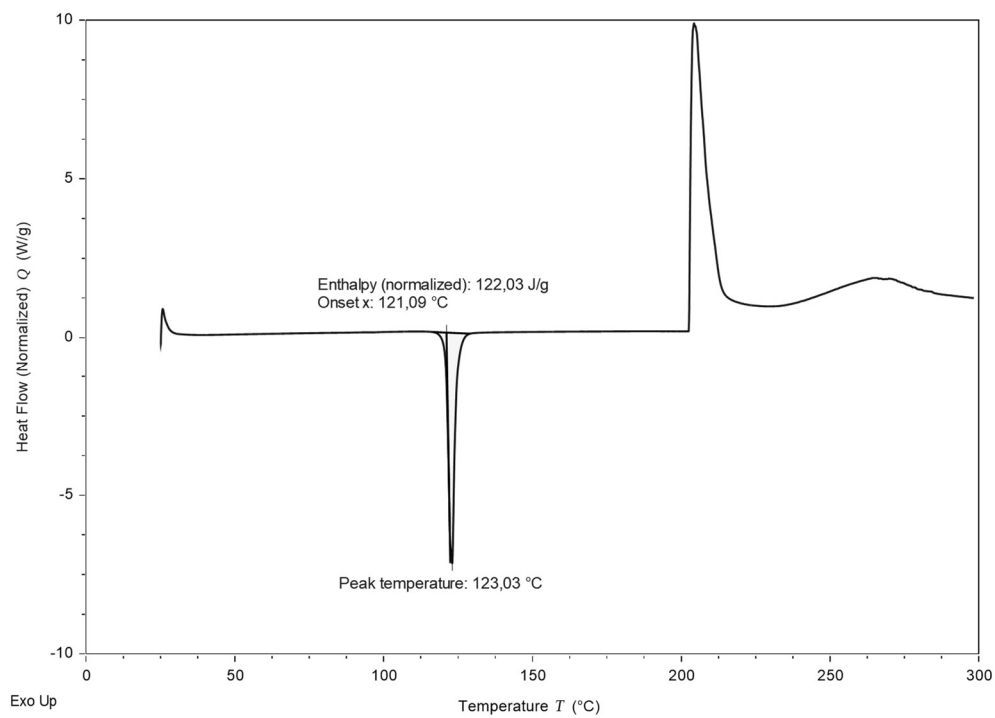
Slika D29. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).Slika D30. <sup>13</sup>C NMR spektar spoja 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).



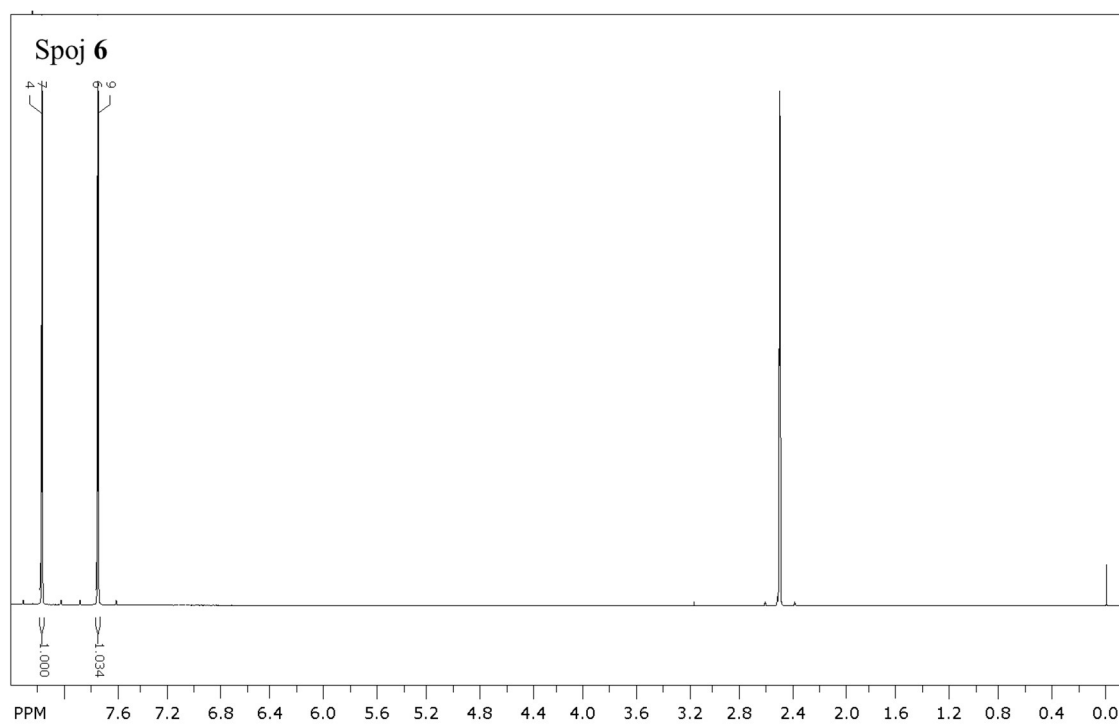
Slika D31. IR spektar spoja 5 (ATR).

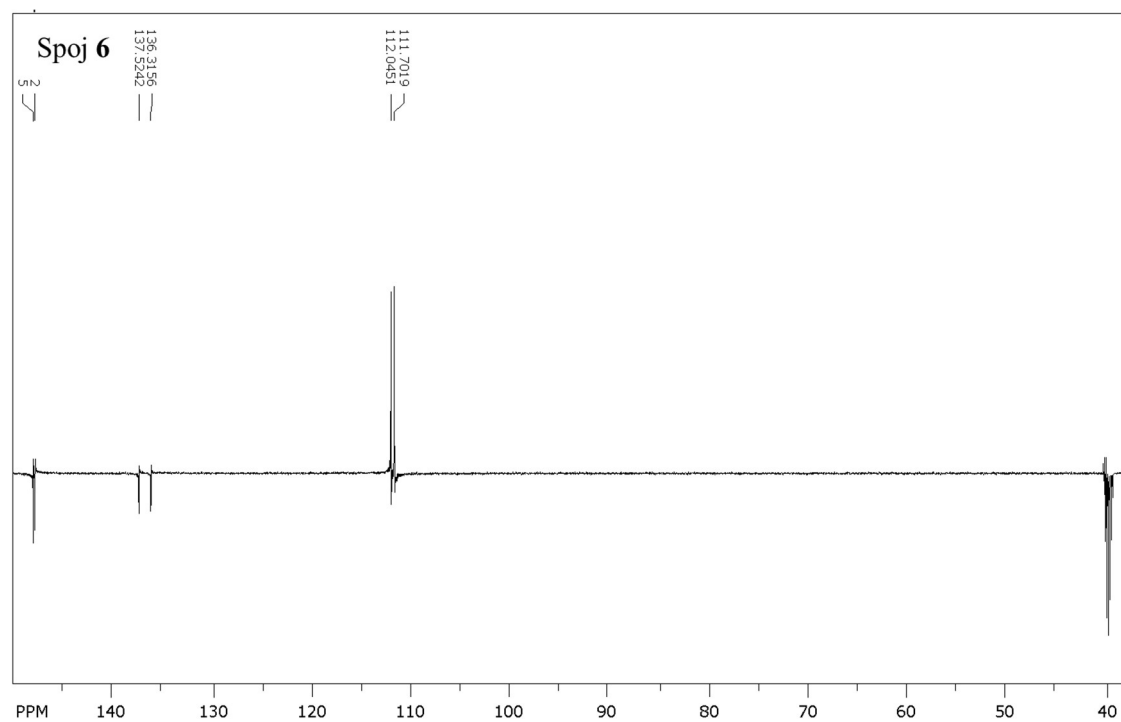
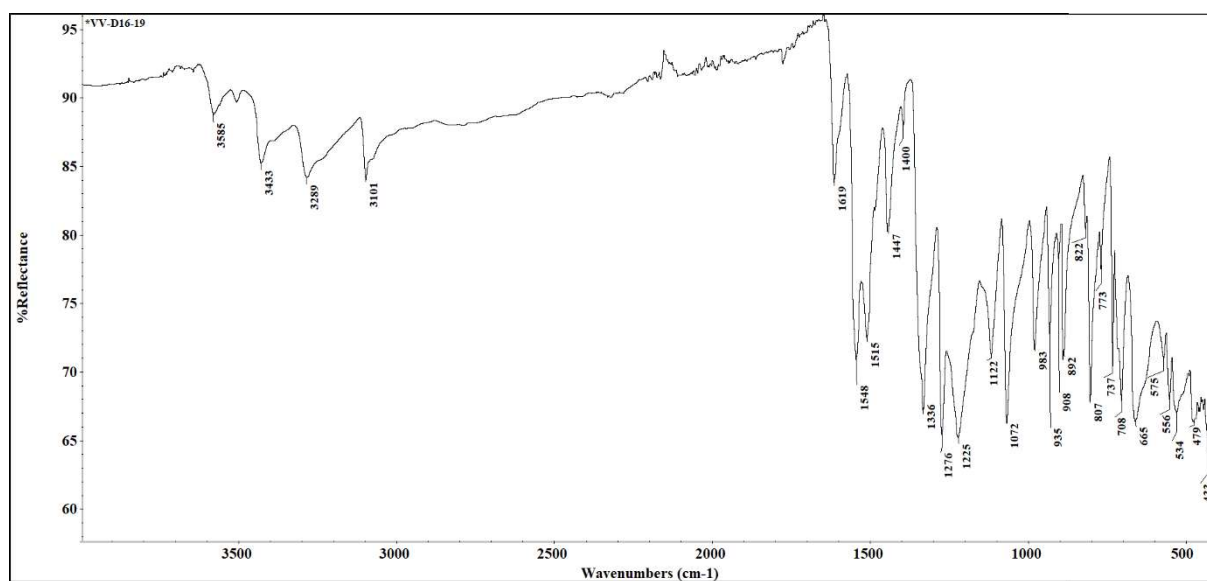


Slika D32. UHPLC kromatogram spoja 5.



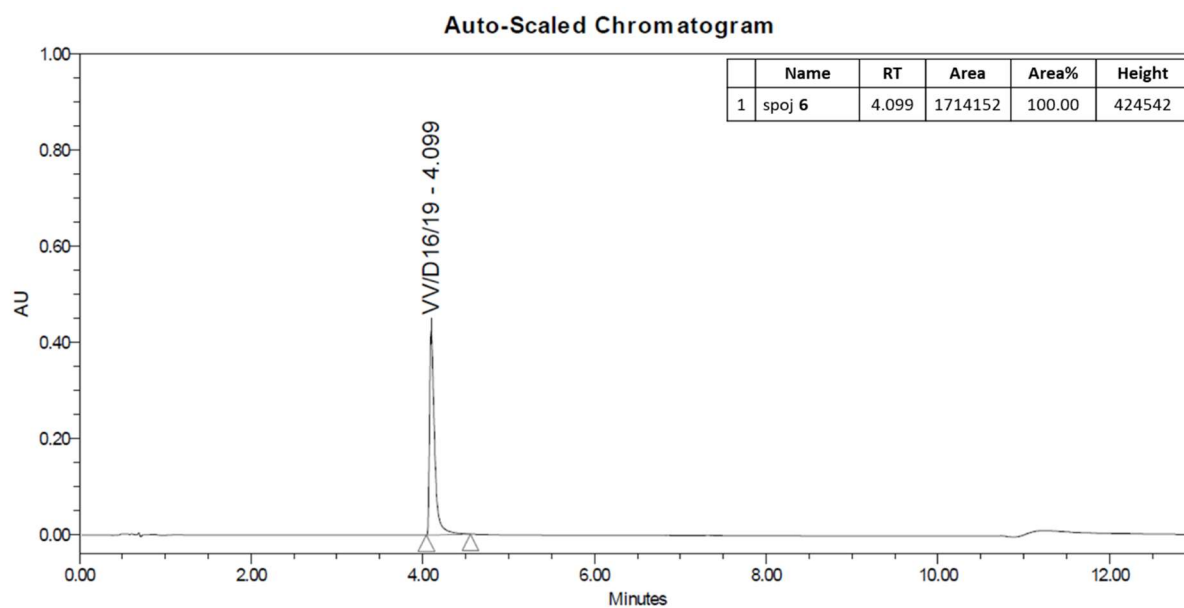
Slika D33. DSC spoja 5.

Slika D34. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 6 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

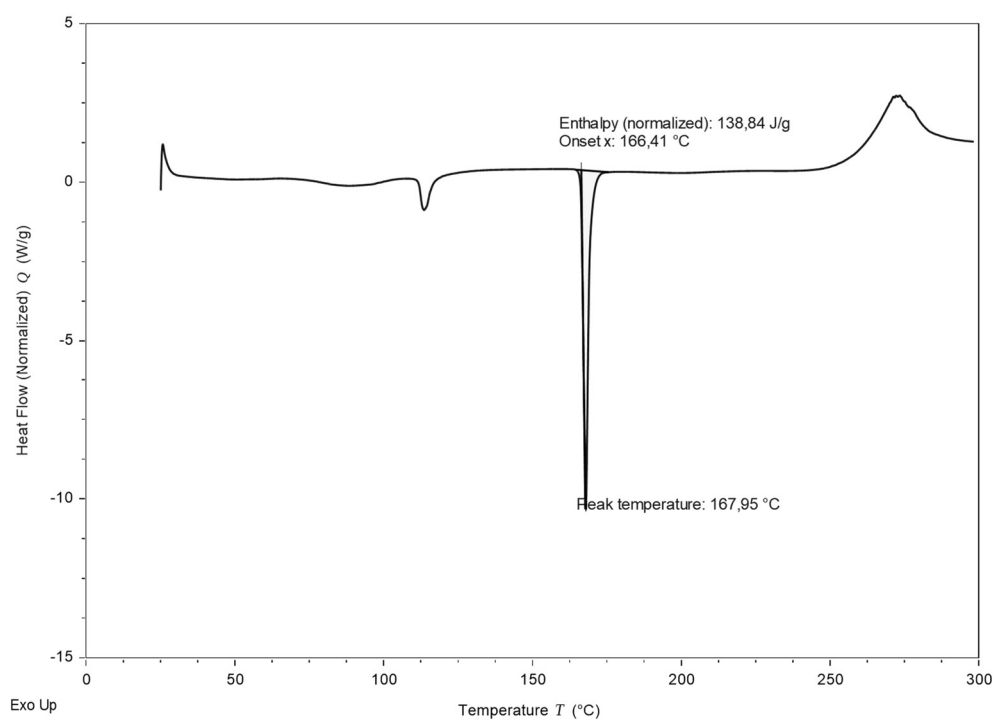
Slika D35.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 6 (DMSO- $d_6$ ).

Slika D36. IR spektar spoja 6 (ATR).

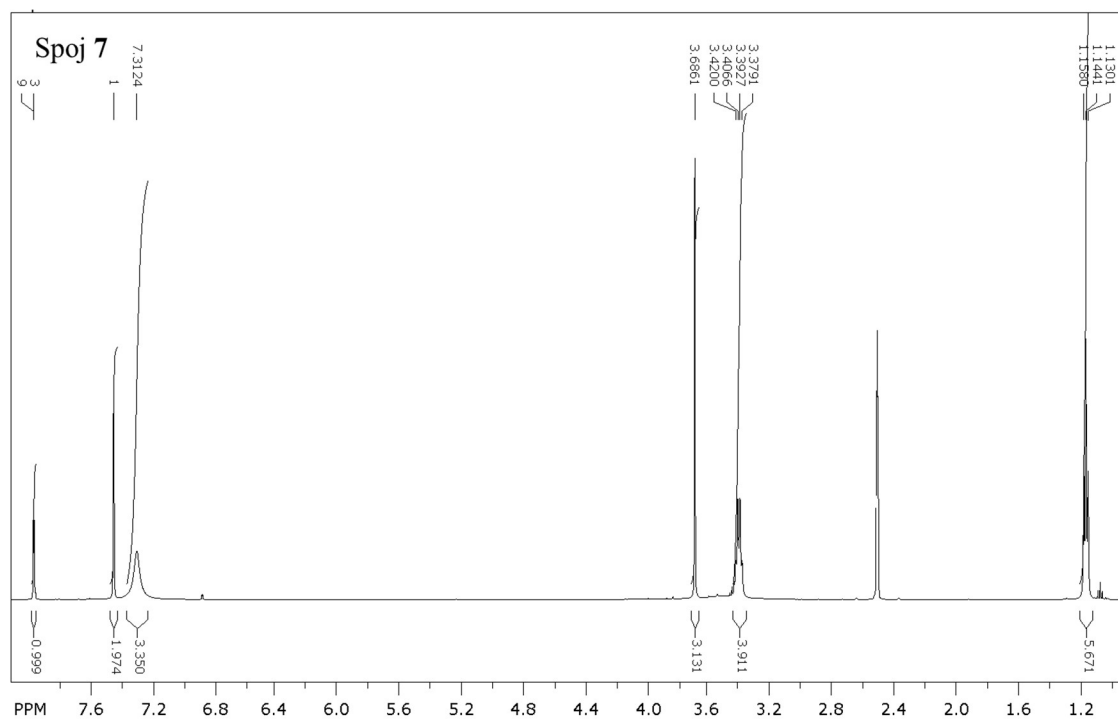
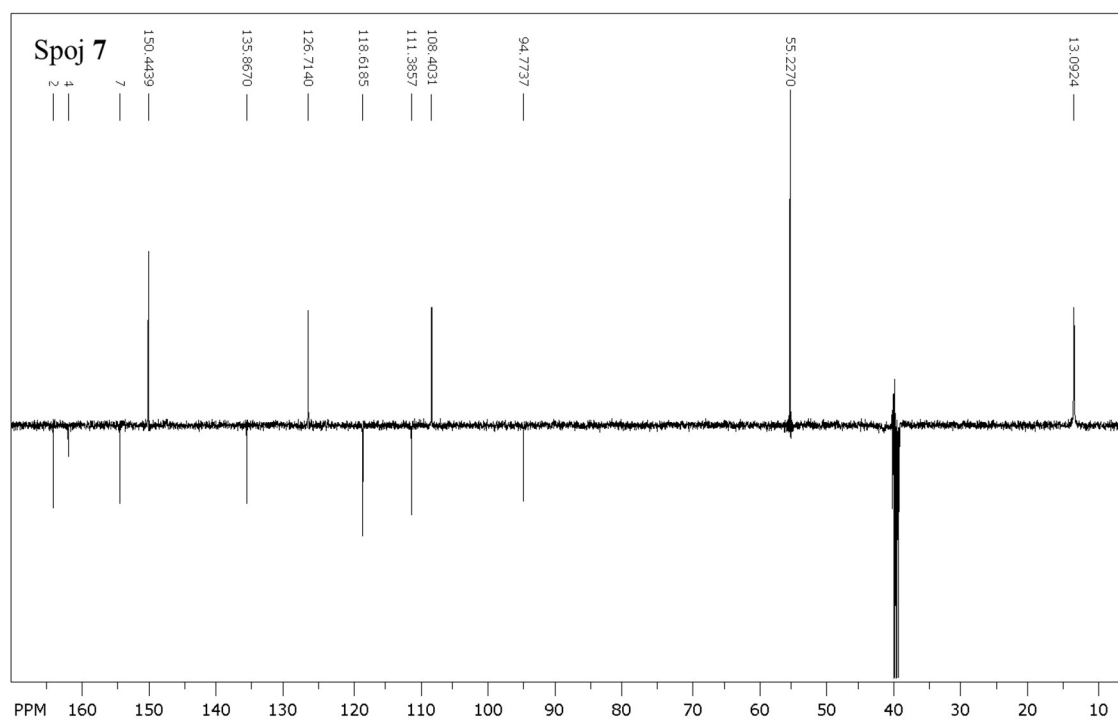


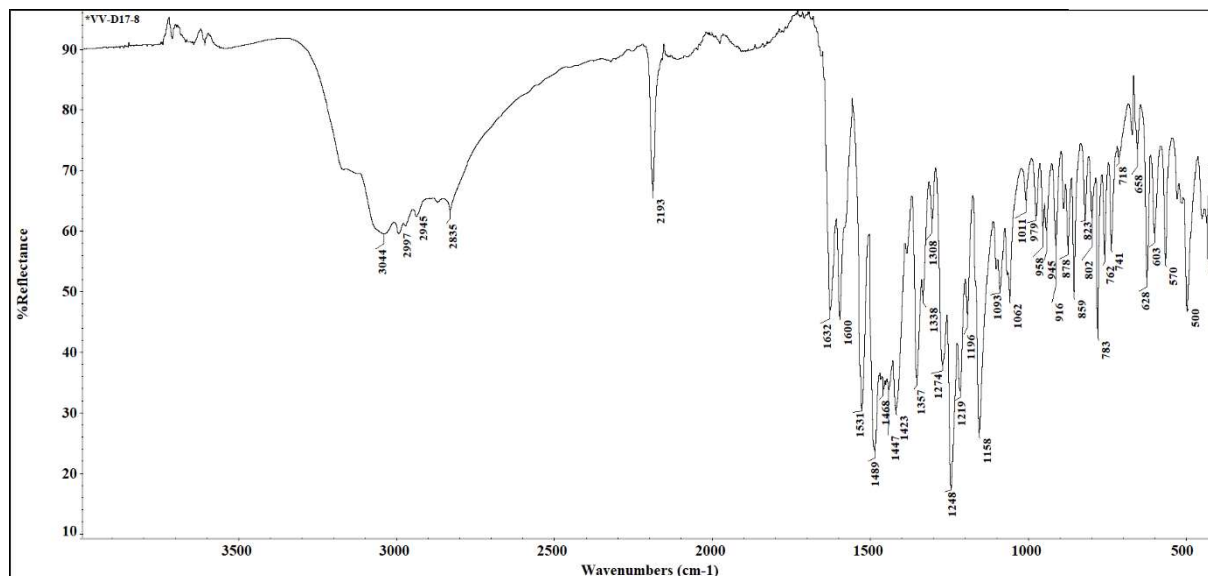


Slika D37. UHPLC kromatogram spoja 6.

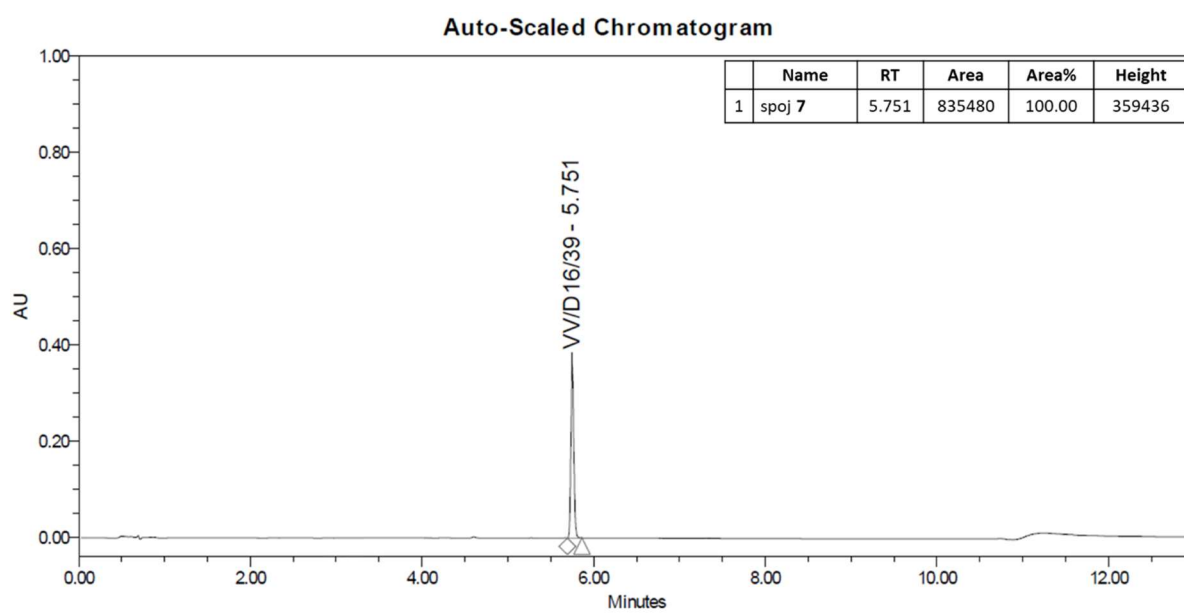


Slika D38. DSC spoja 6.

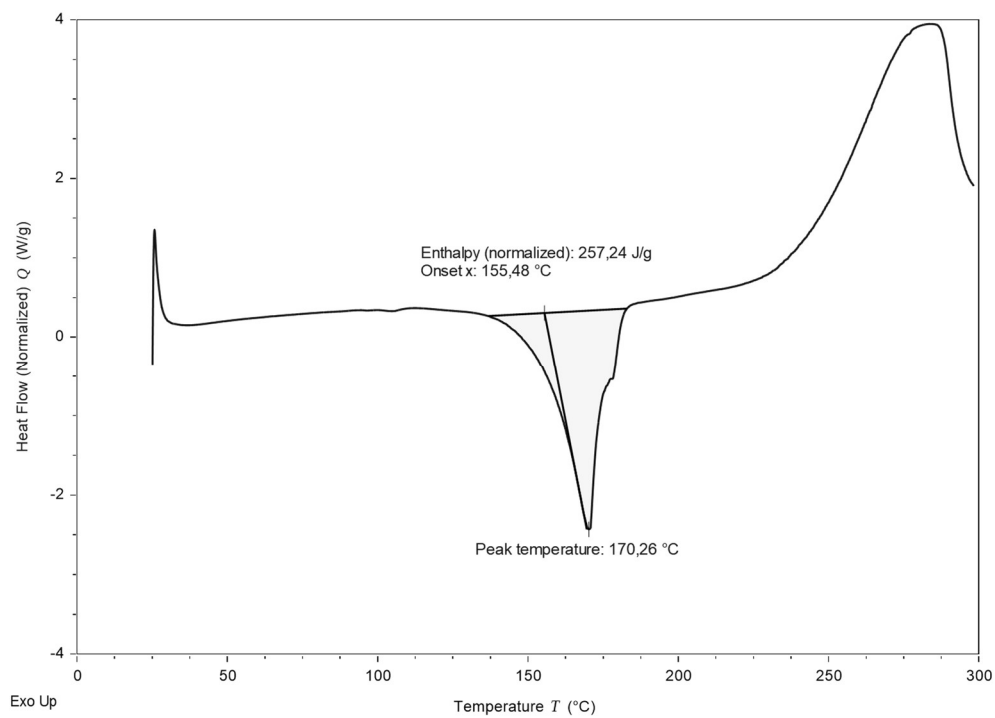
Slika D39.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 7 (DMSO- $d_6$ ).Slika D40.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 7 (DMSO- $d_6$ ).



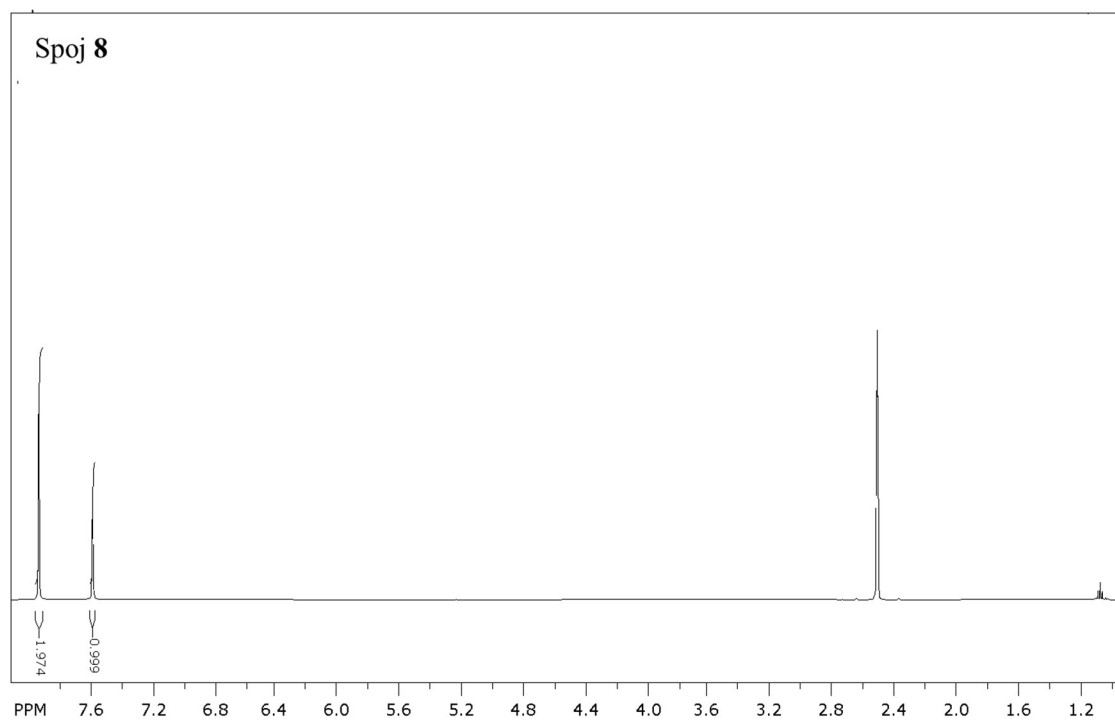
Slika D41. IR spektar spoja 7 (ATR).

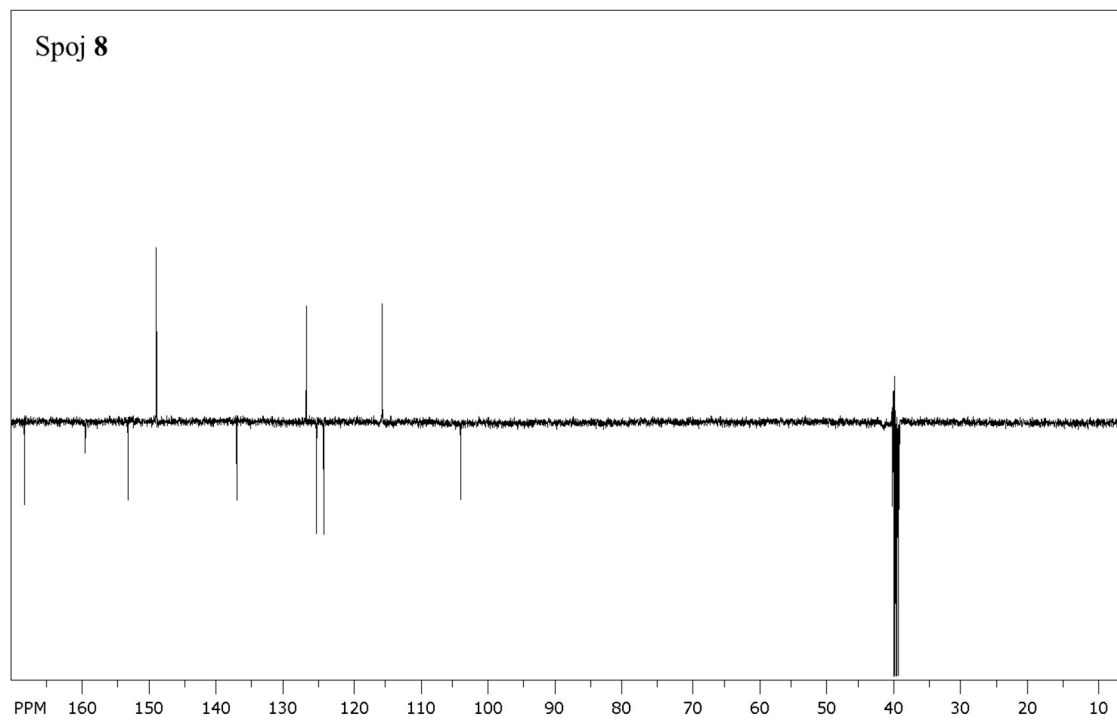
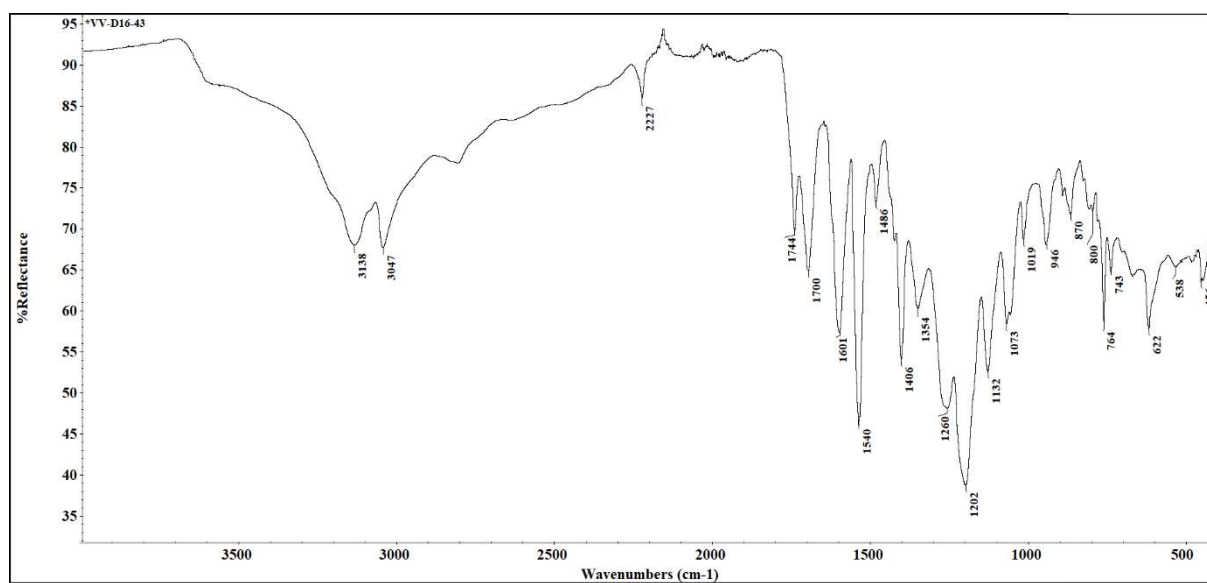


Slika D42. UHPLC kromatogram spoja 7.

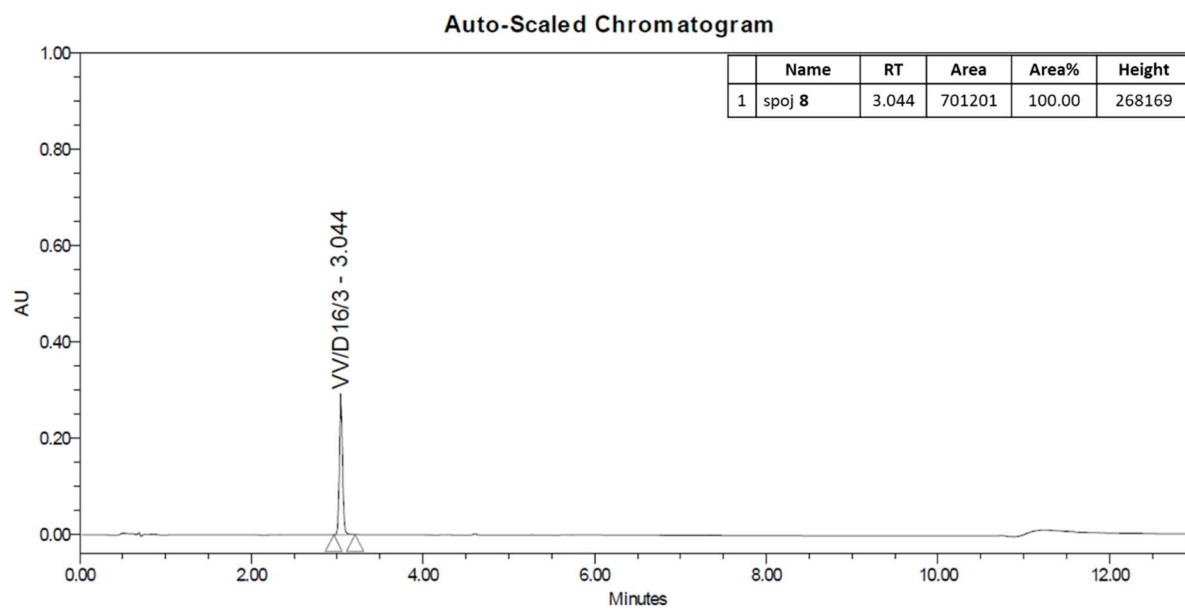


Slika D43. DSC spoja 7.

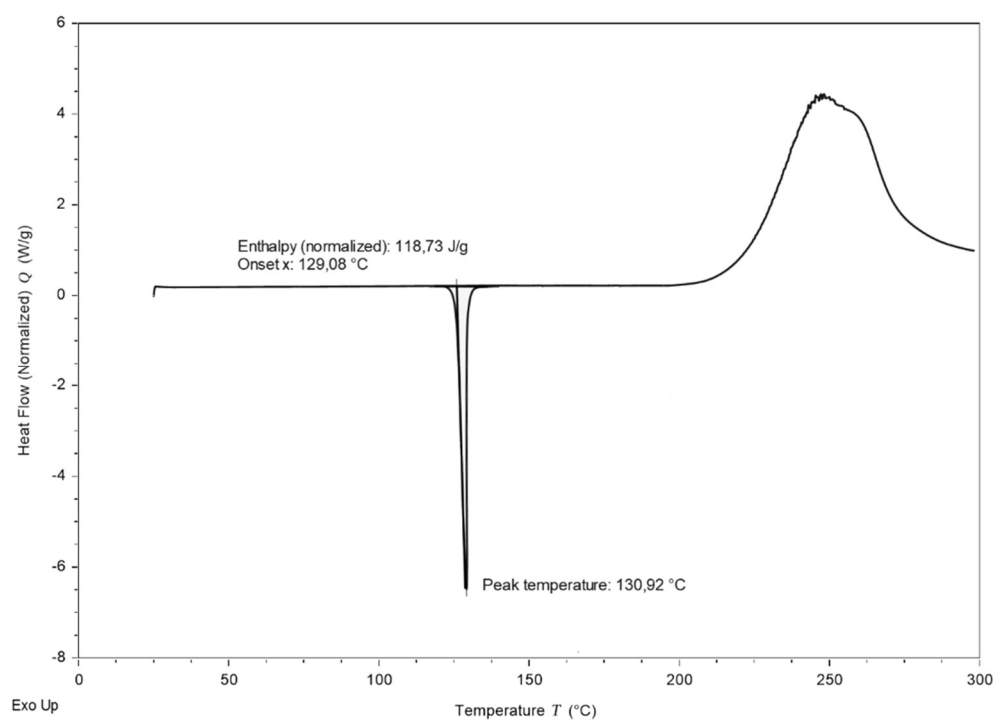
Slika D44. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 8 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Slika D45. <sup>13</sup>C NMR spektar spoja 8 (DMSO-d<sub>6</sub>).

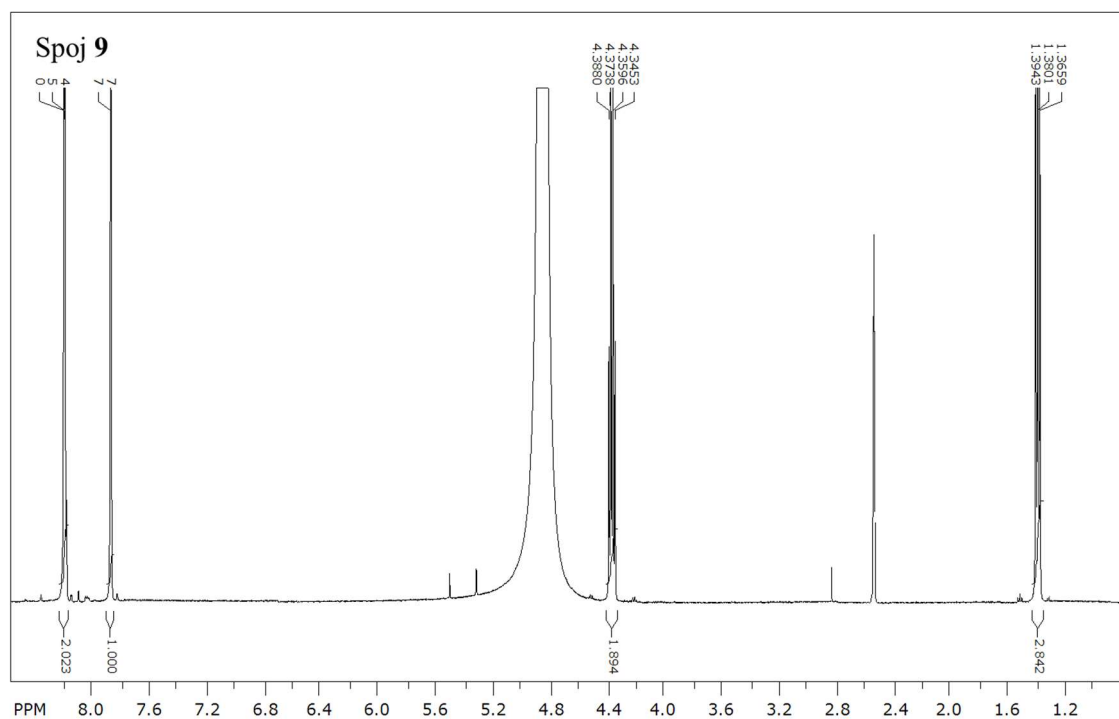
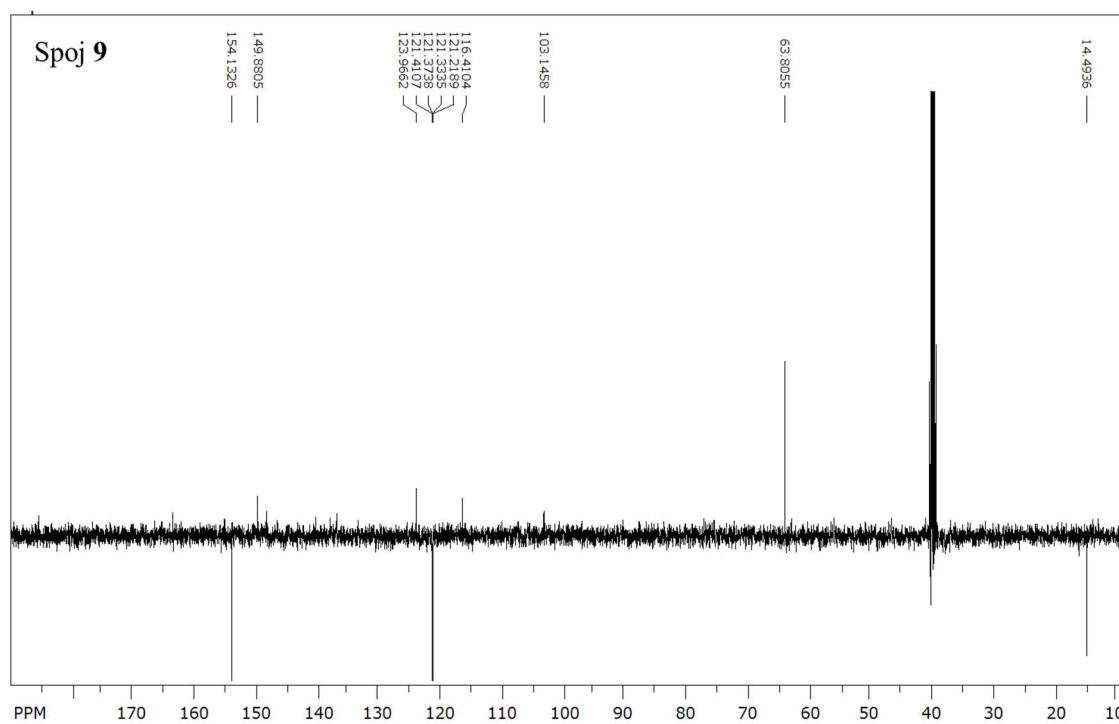
Slika D46. IR spektar spoja 8 (ATR).

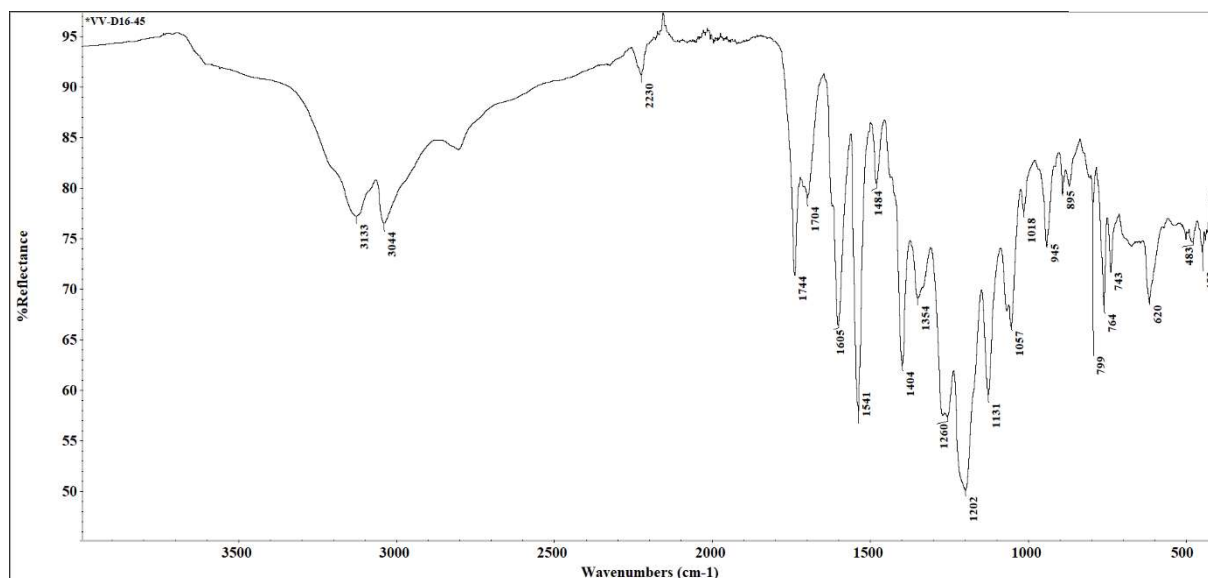


Slika D47. UHPLC kromatogram spoja 8.

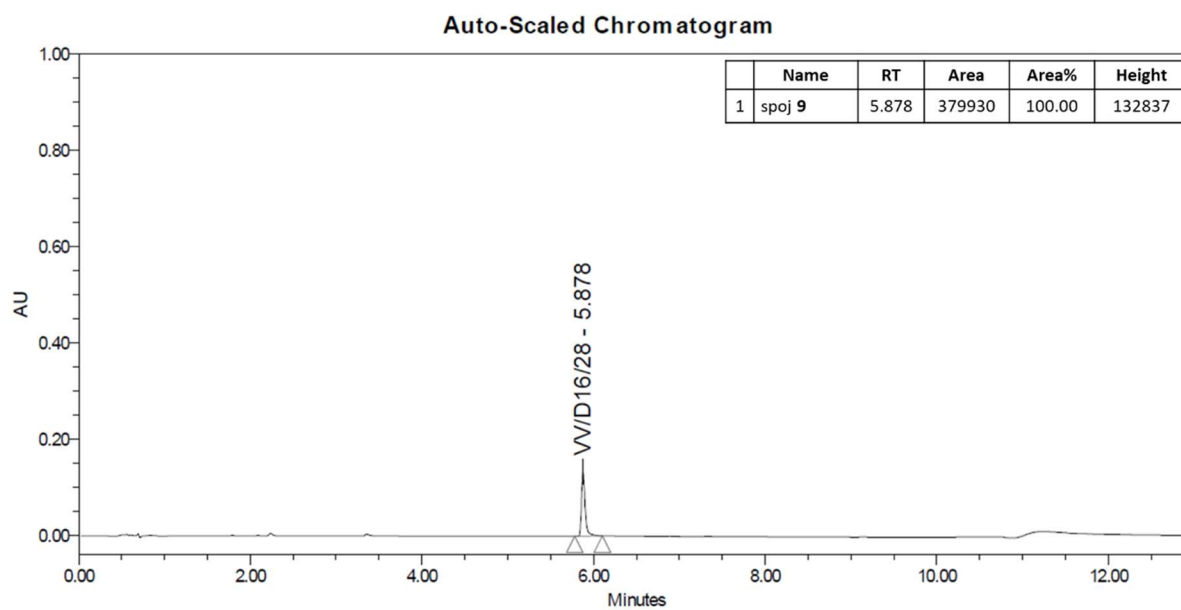


Slika D48. DSC spoja 8.

Slika D49.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 9 (DMSO- $d_6$ ).Slika D50.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 9 (DMSO- $d_6$ ).

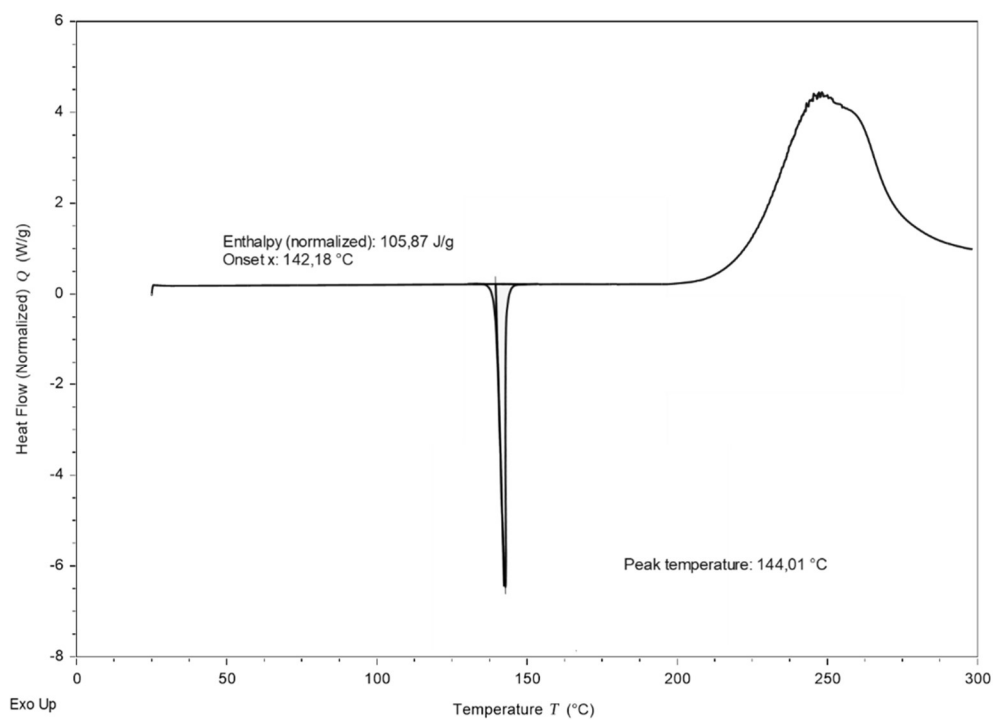


Slika D51. IR spektar spoja 9 (ATR).

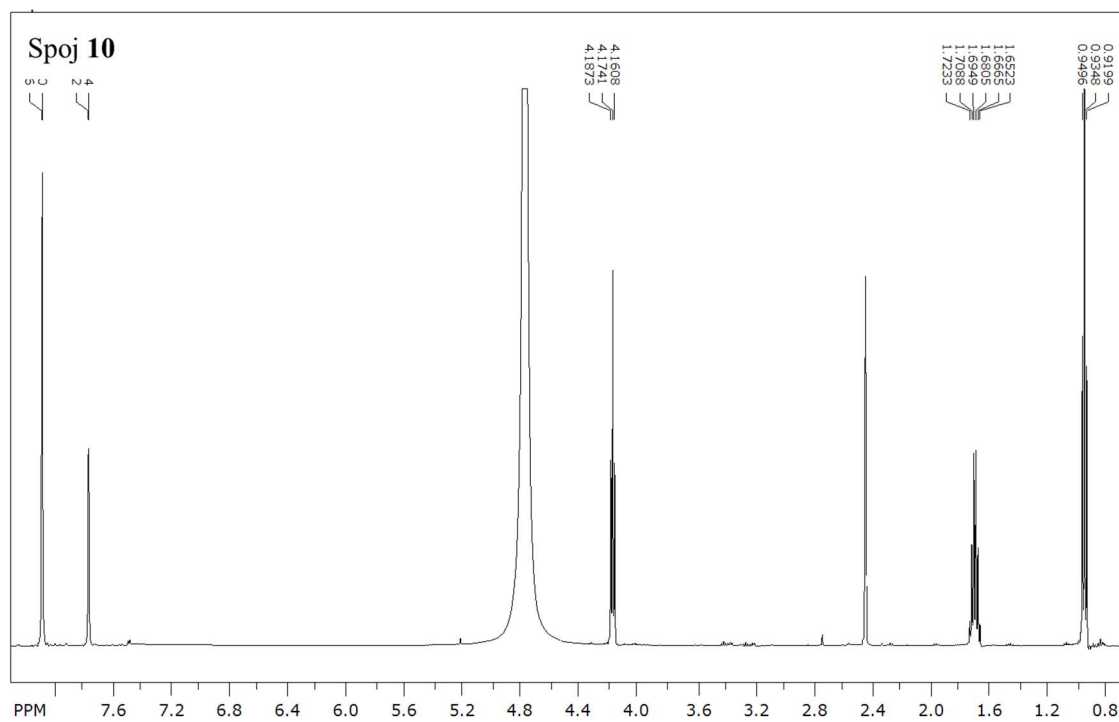


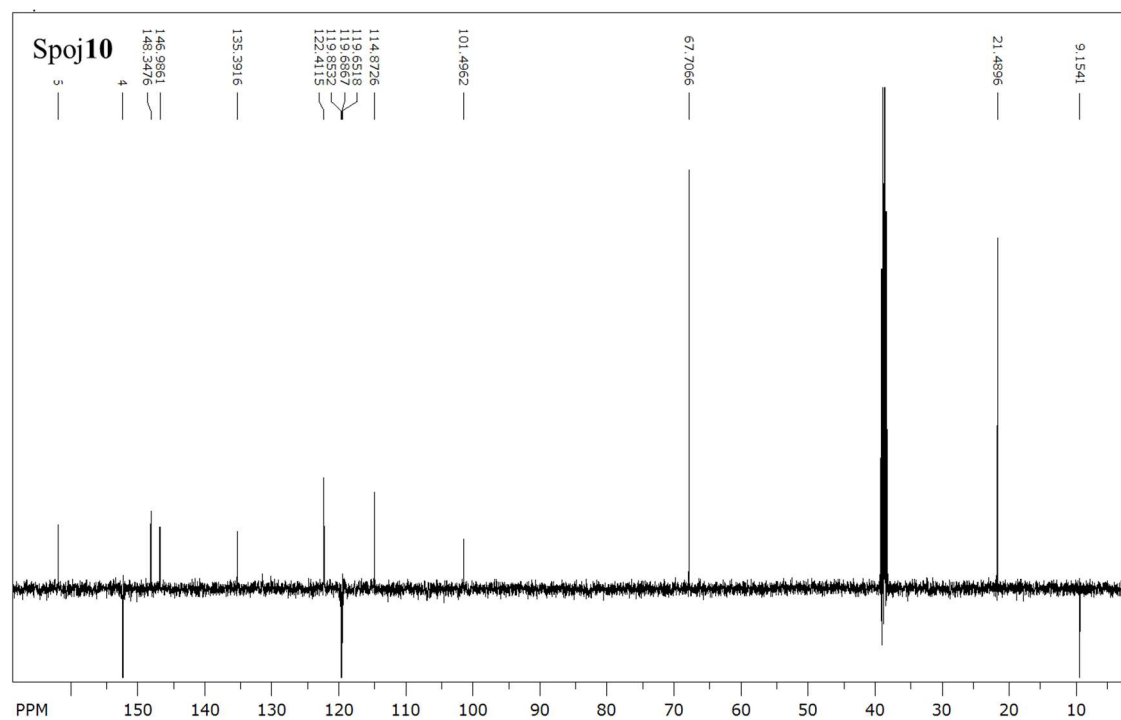
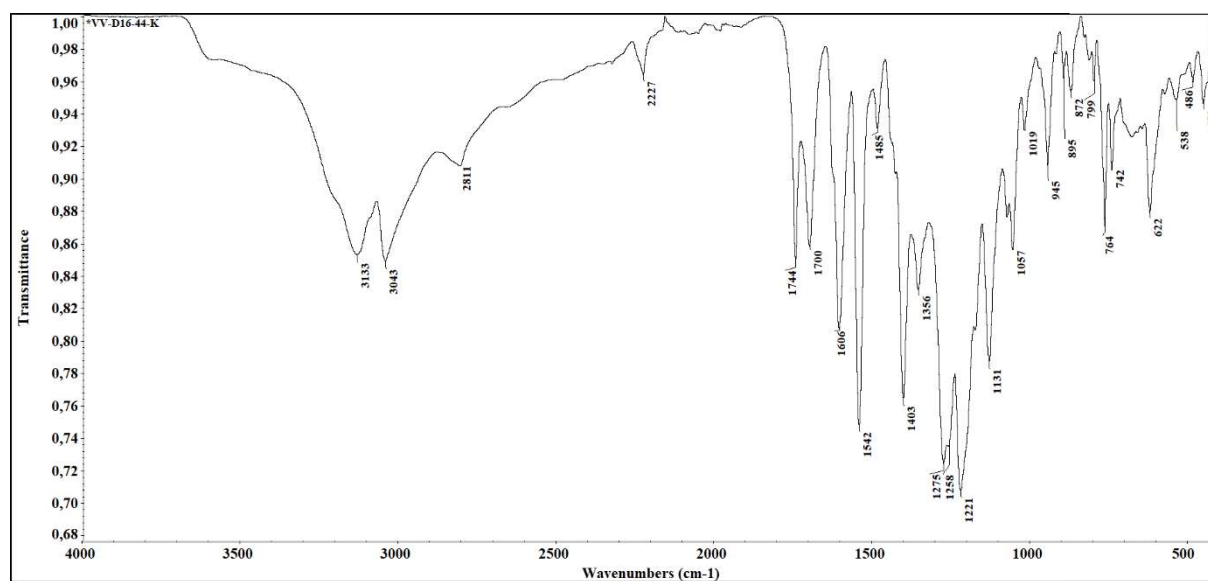
Slika D52. UHPLC kromatogram spoja 9.



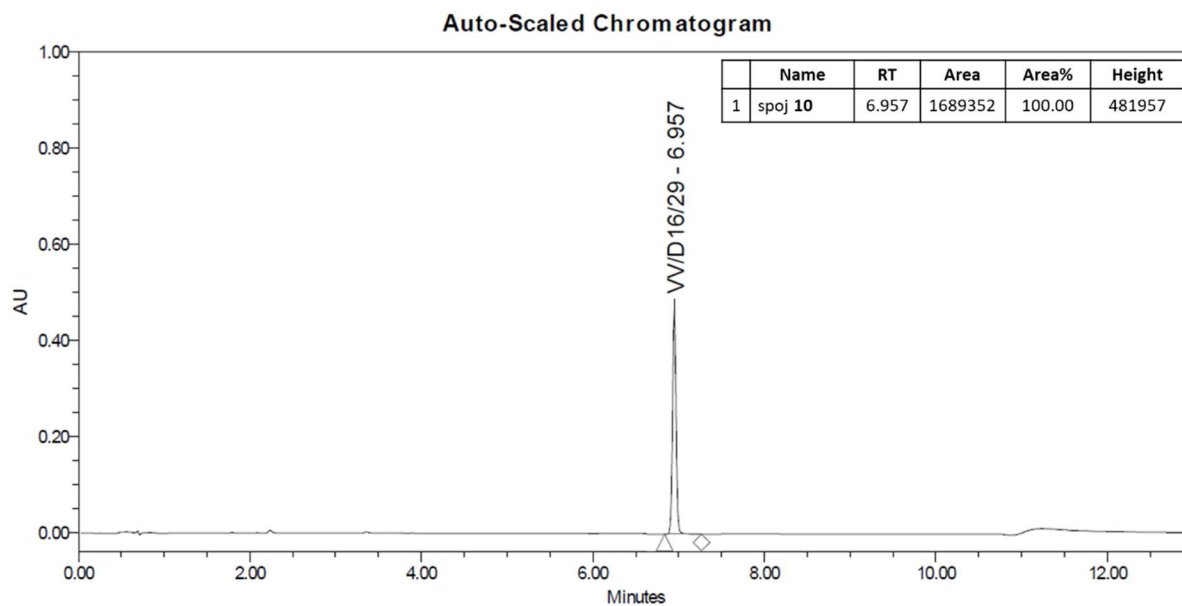


Slika D53. DSC spoja 9.

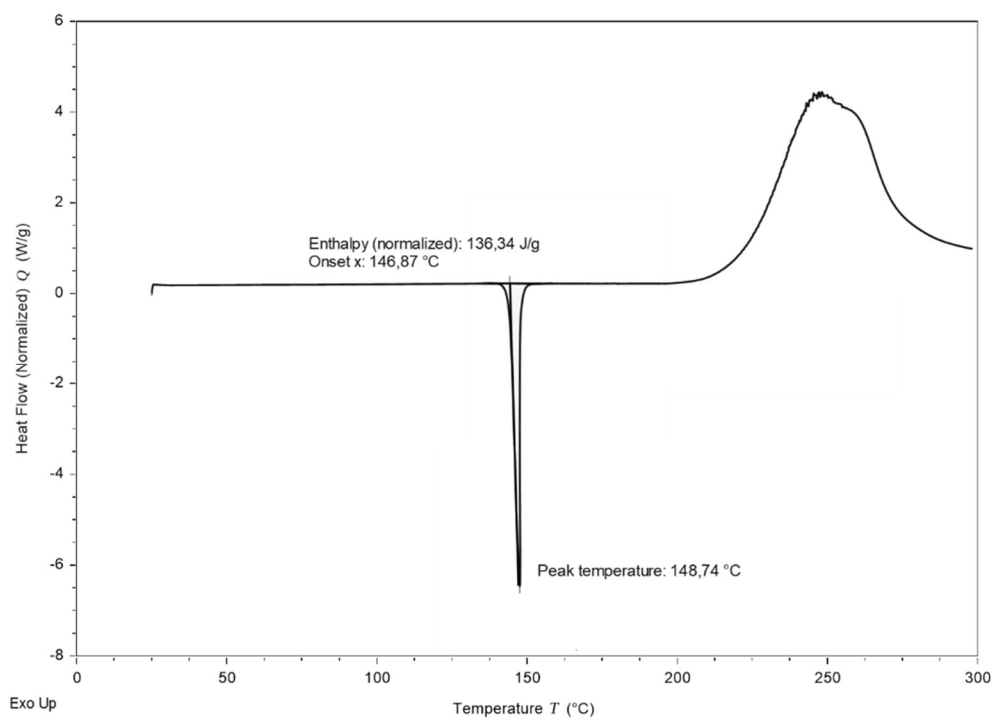
Slika D54. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 10 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Slika D55.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 10 (DMSO- $d_6$ ).

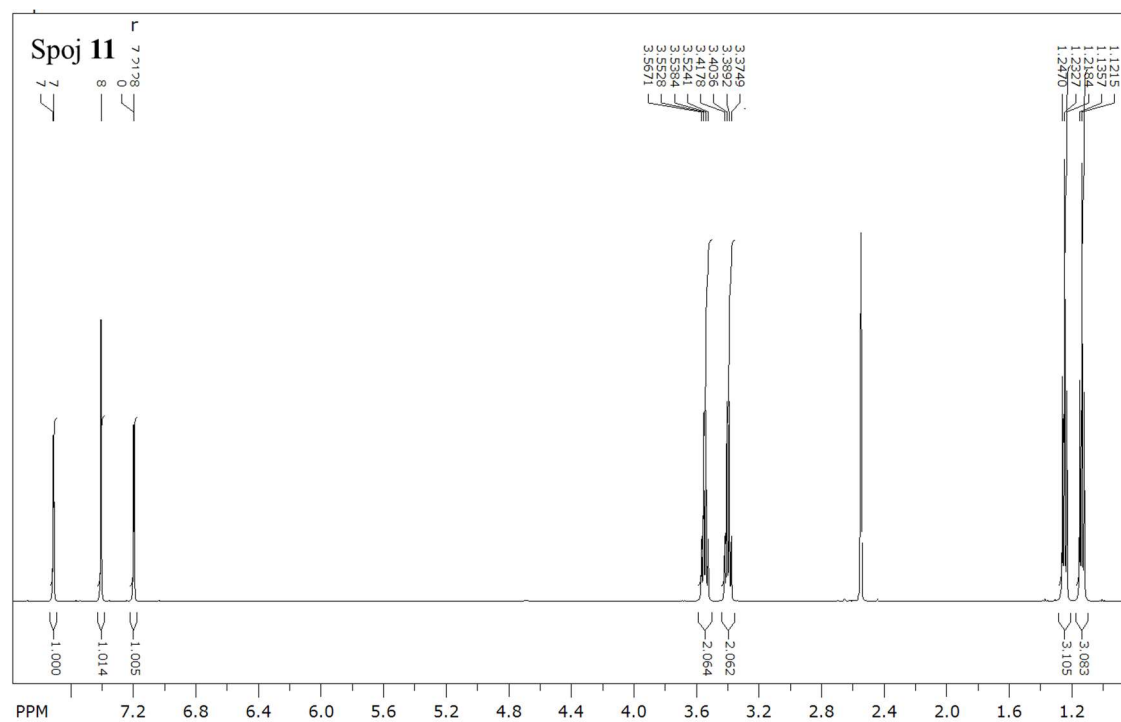
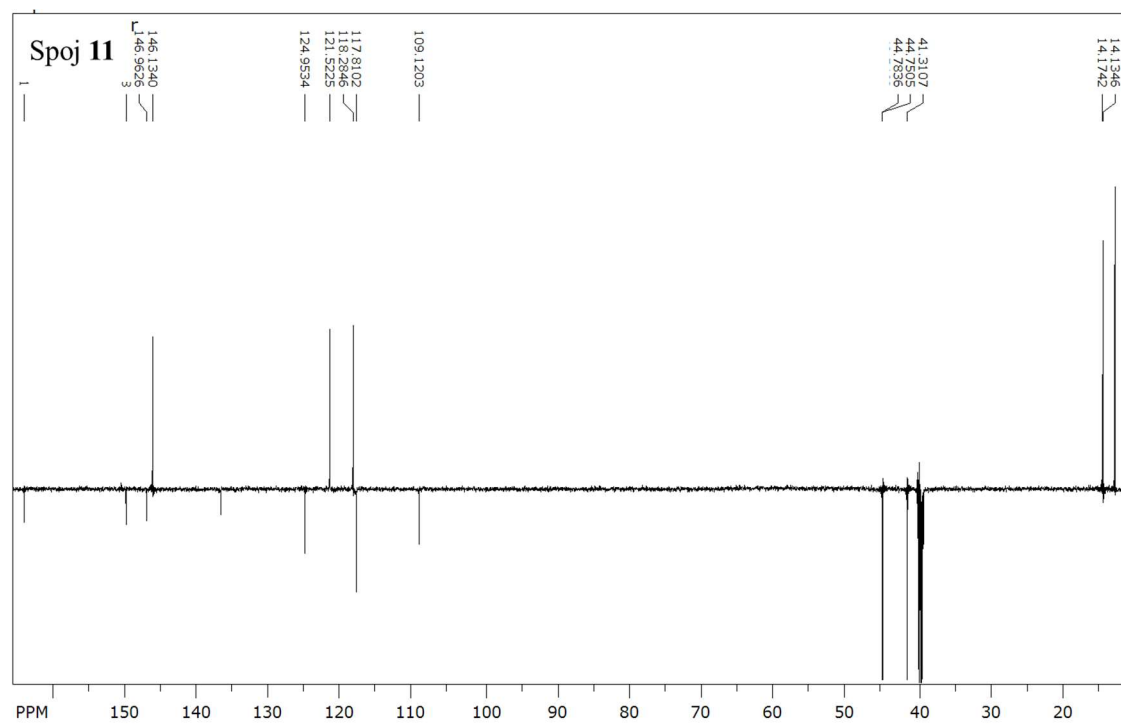
Slika D56. IR spektar spoja 10 (ATR).

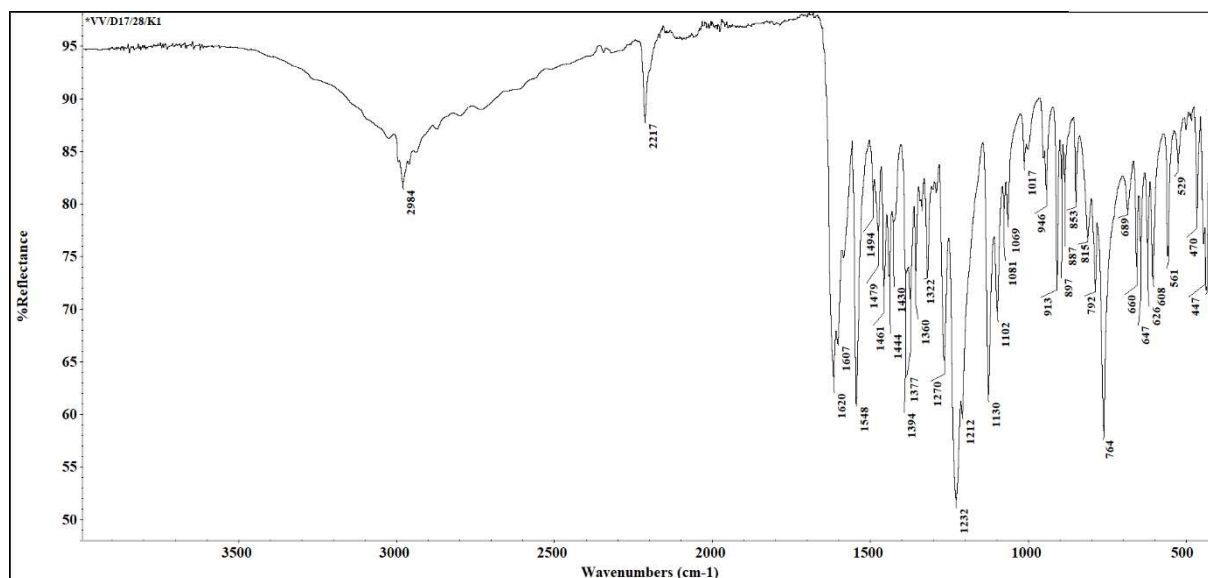


**Slika D57.** UHPLC kromatogram spoja 10.

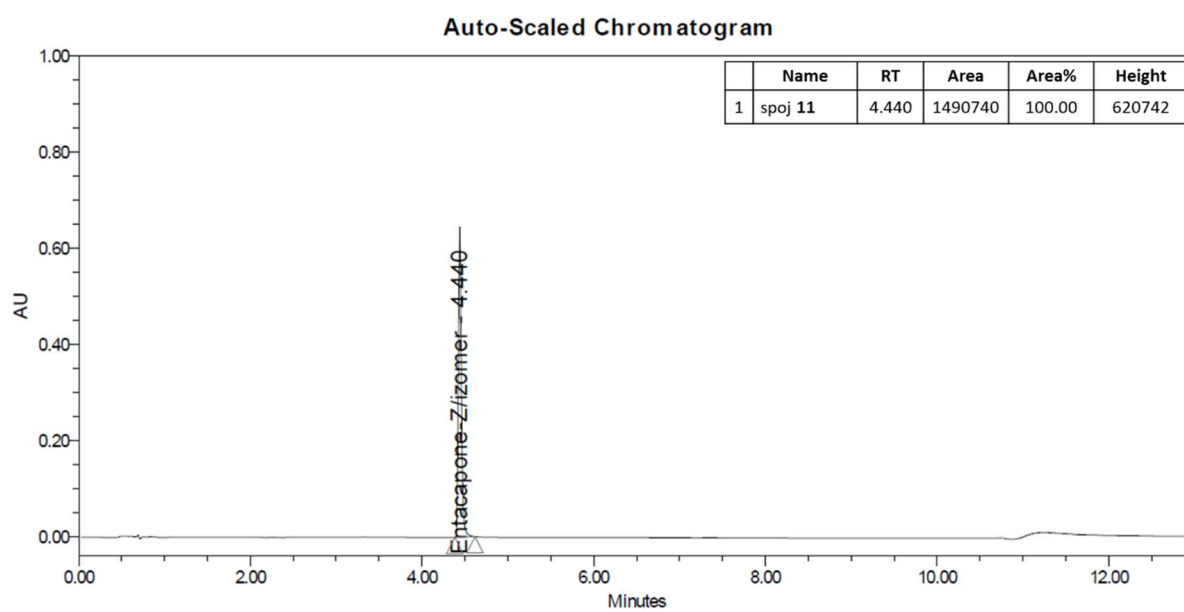


**Slika D58.** DSC spoja 10.

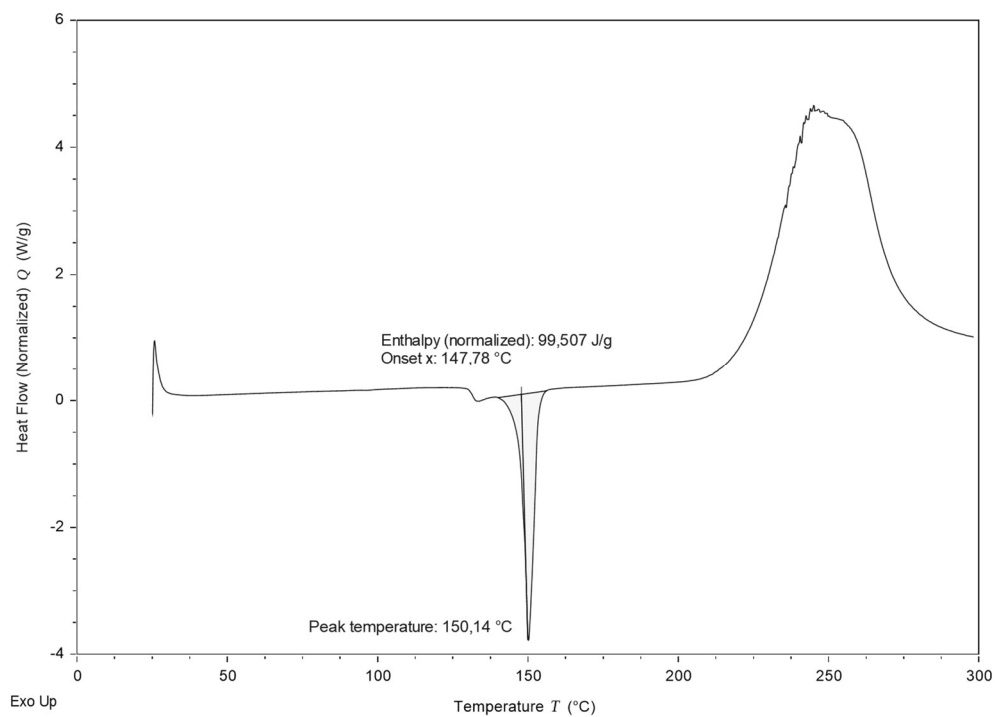
Slika D59.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 11 (DMSO- $d_6$ ).Slika D60.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 11 (DMSO- $d_6$ ).



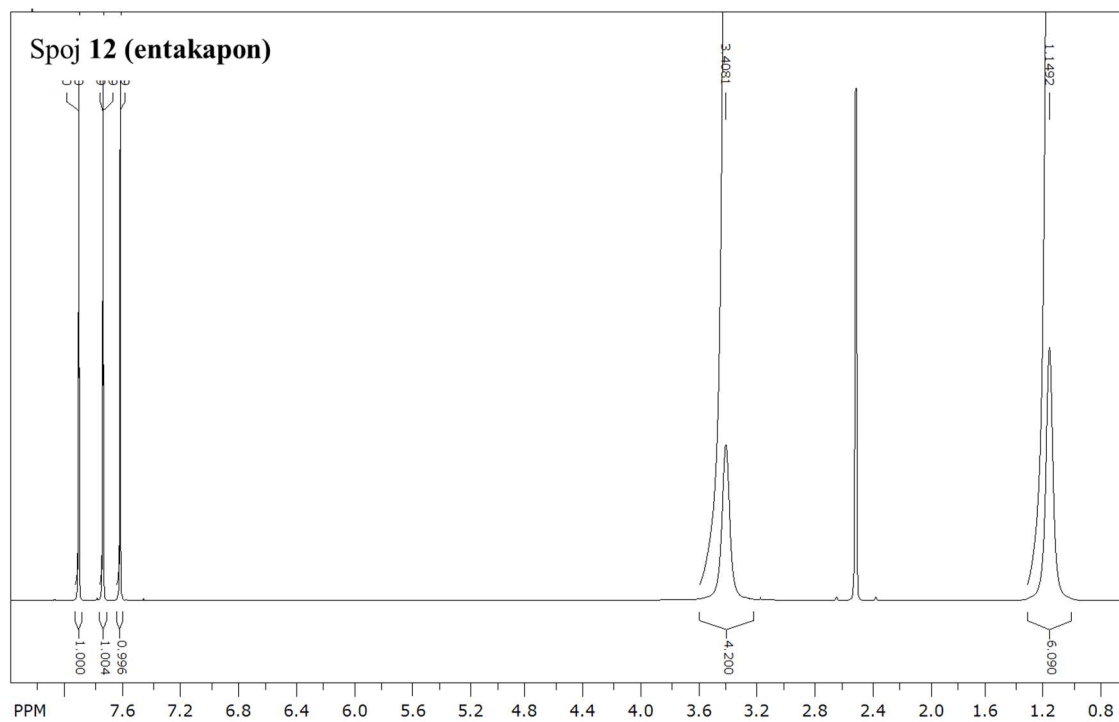
Slika D61. IR spektar spoja 11 (ATR).

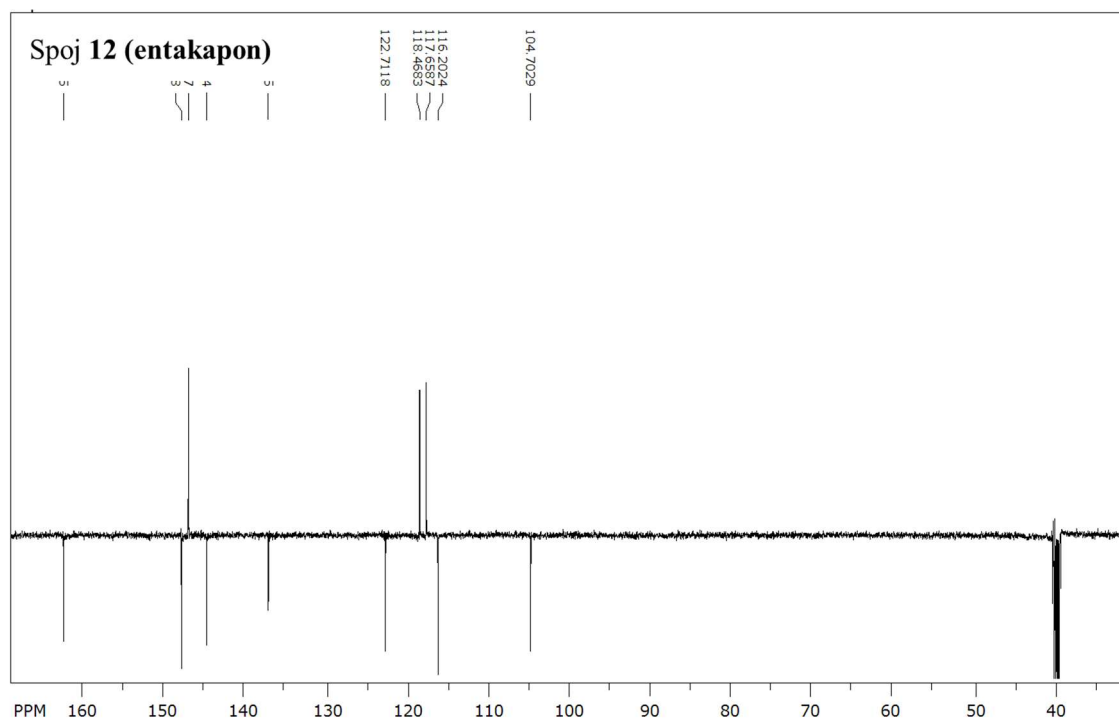
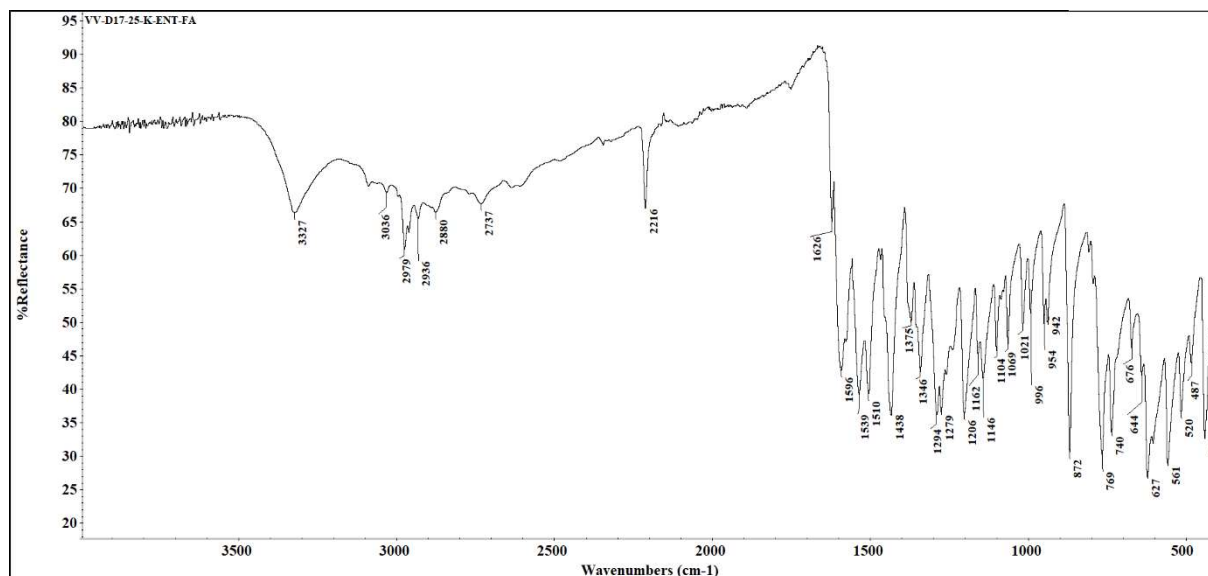


Slika D62. UHPLC kromatogram spoja 11.

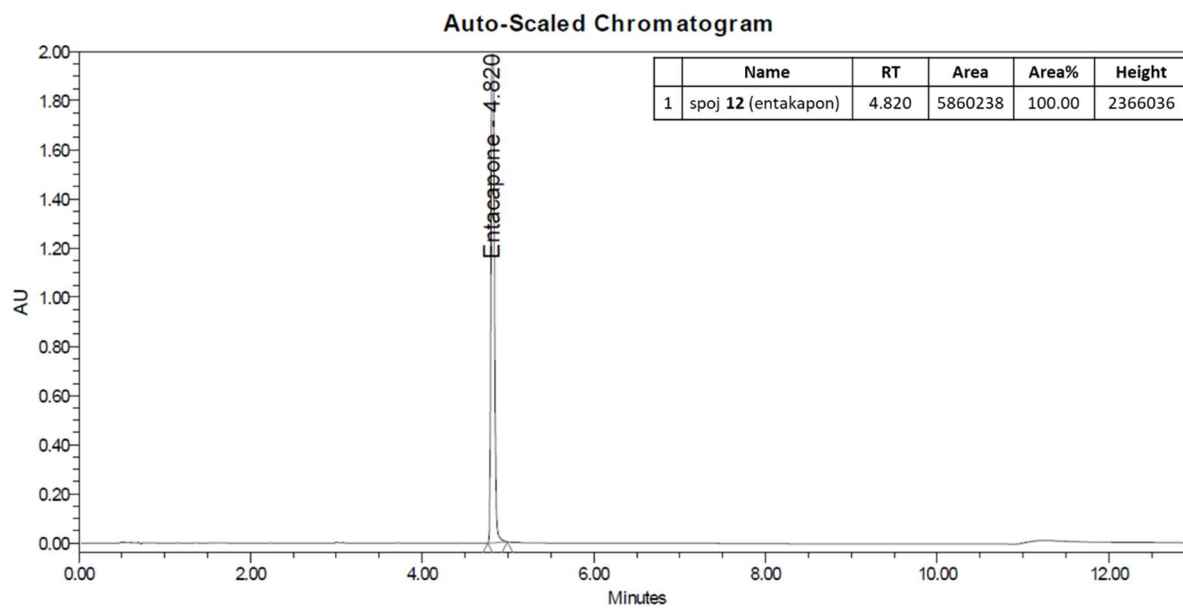


Slika D63. DSC spoja 11.

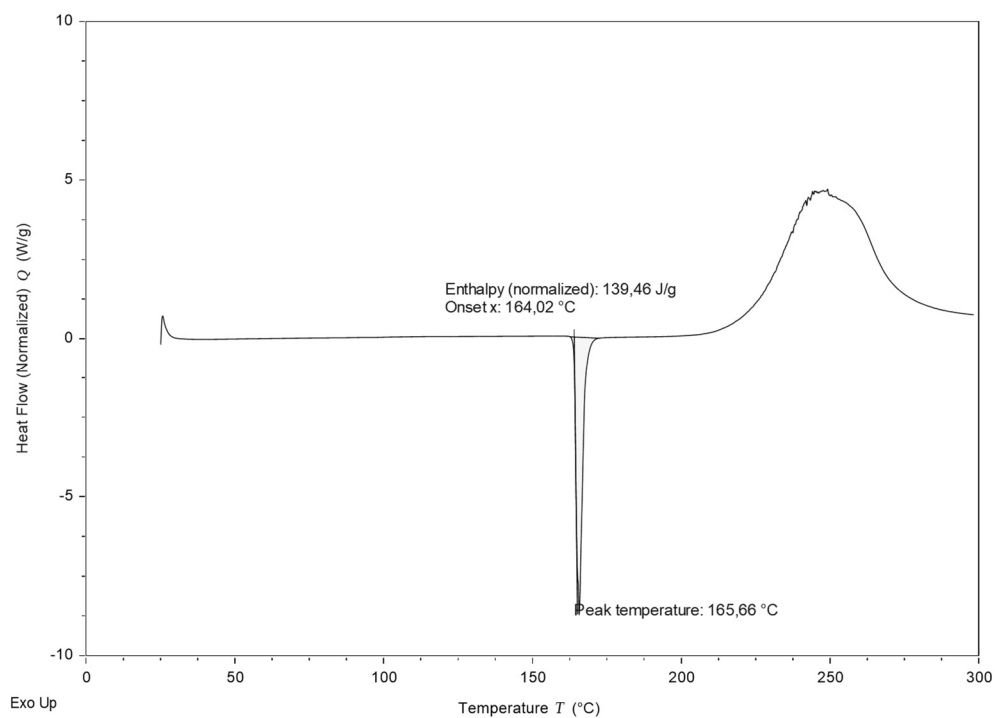
Slika D64. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 12 (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Slika D65.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 12 (DMSO- $d_6$ ).

Slika D66. IR spektar spoja 12 (ATR).

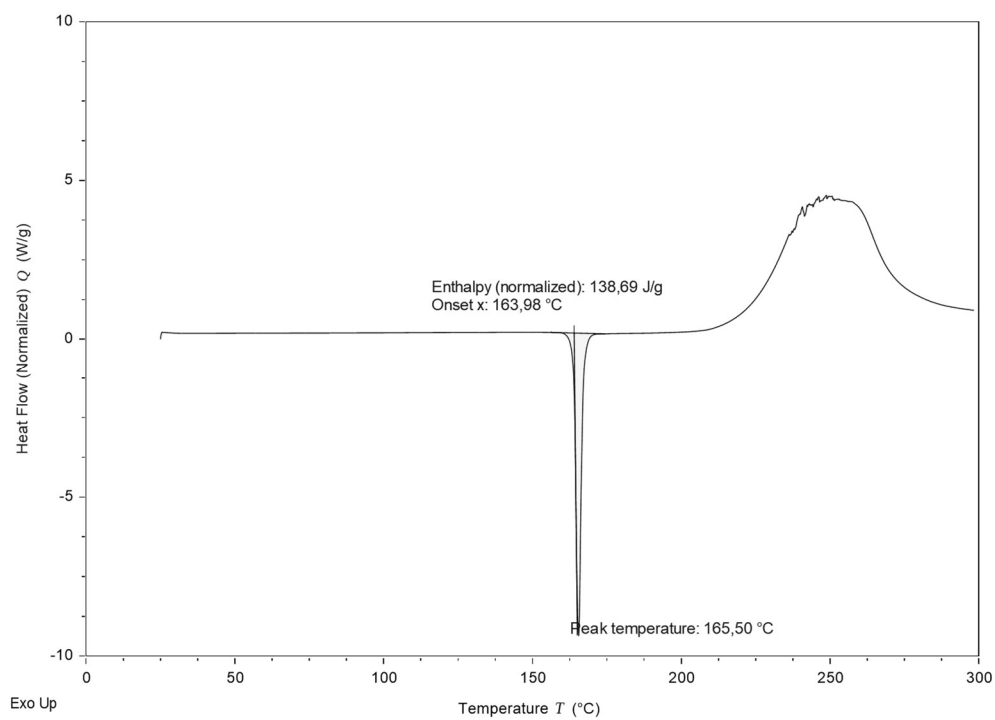


**Slika D67.** UHPLC kromatogram spoja 12.

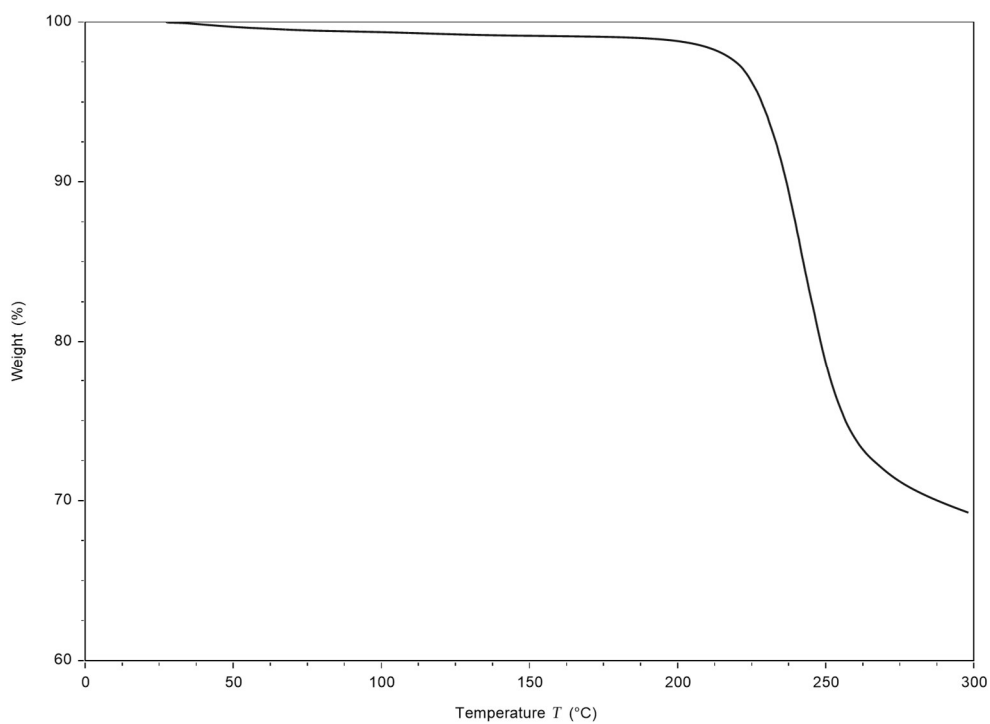


**Slika D68.** DSC spoja 12..

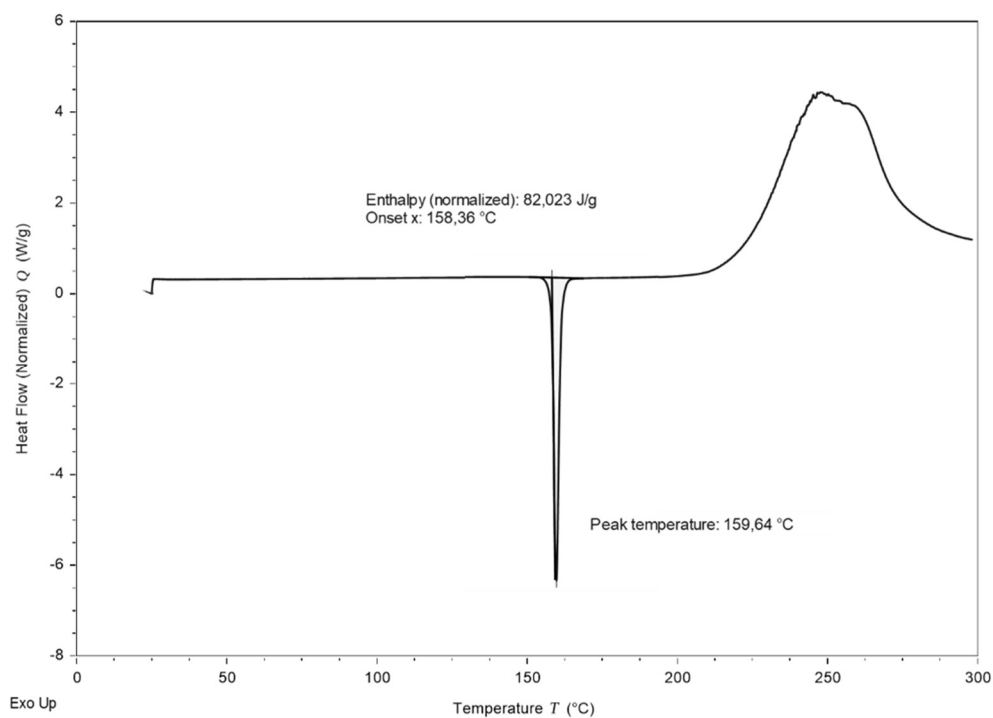




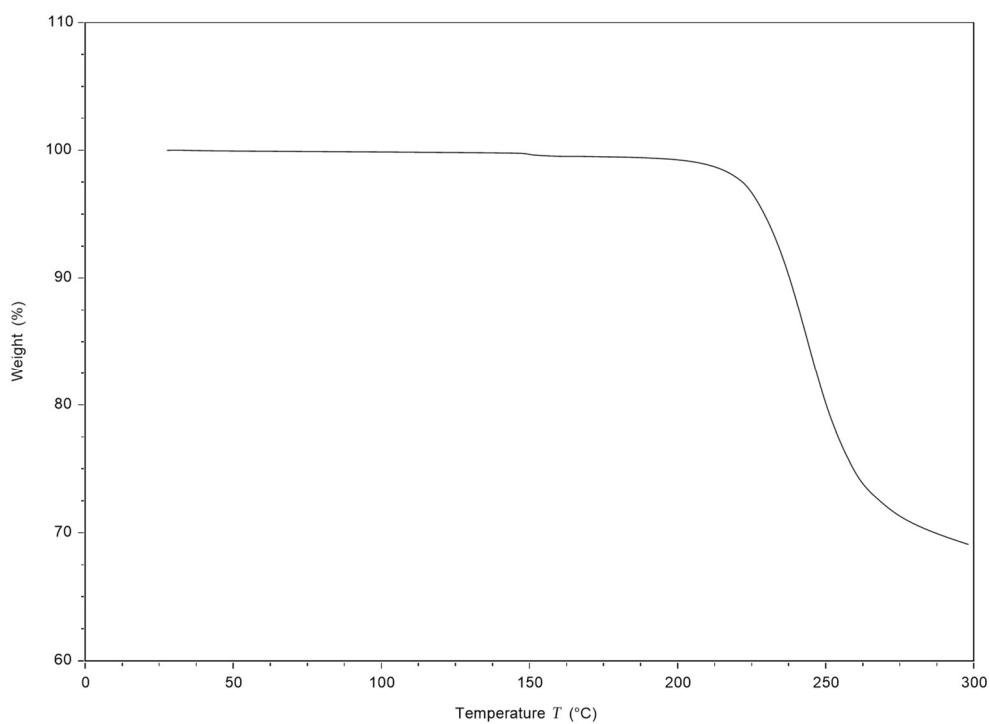
Slika D69. DSC forme A entakapona.



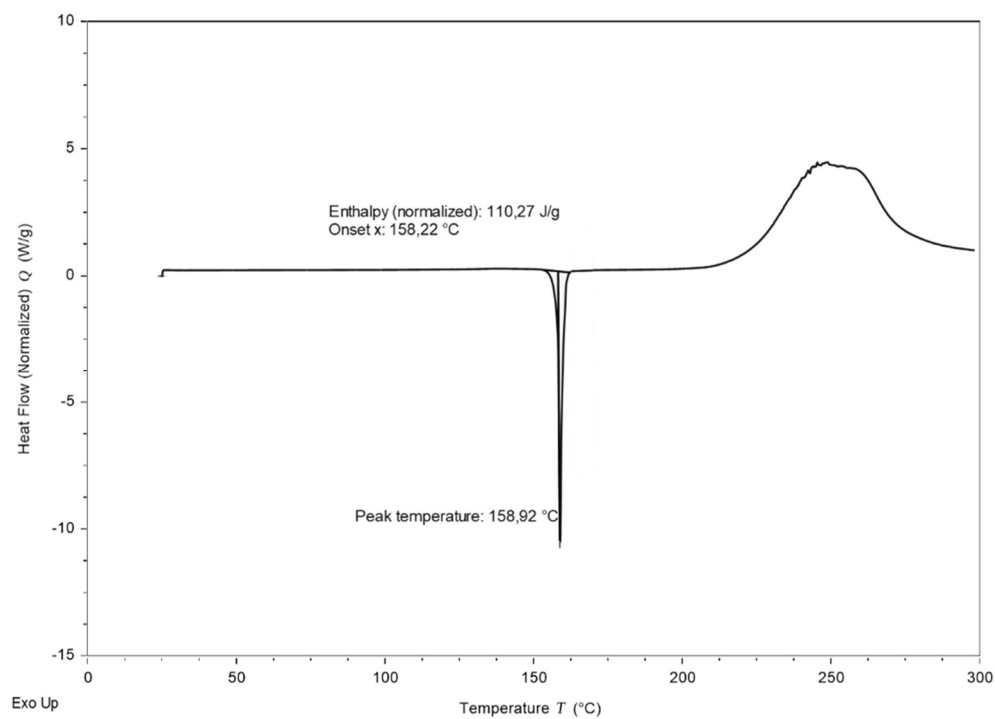
Slika D70. TG forme A entakapona.



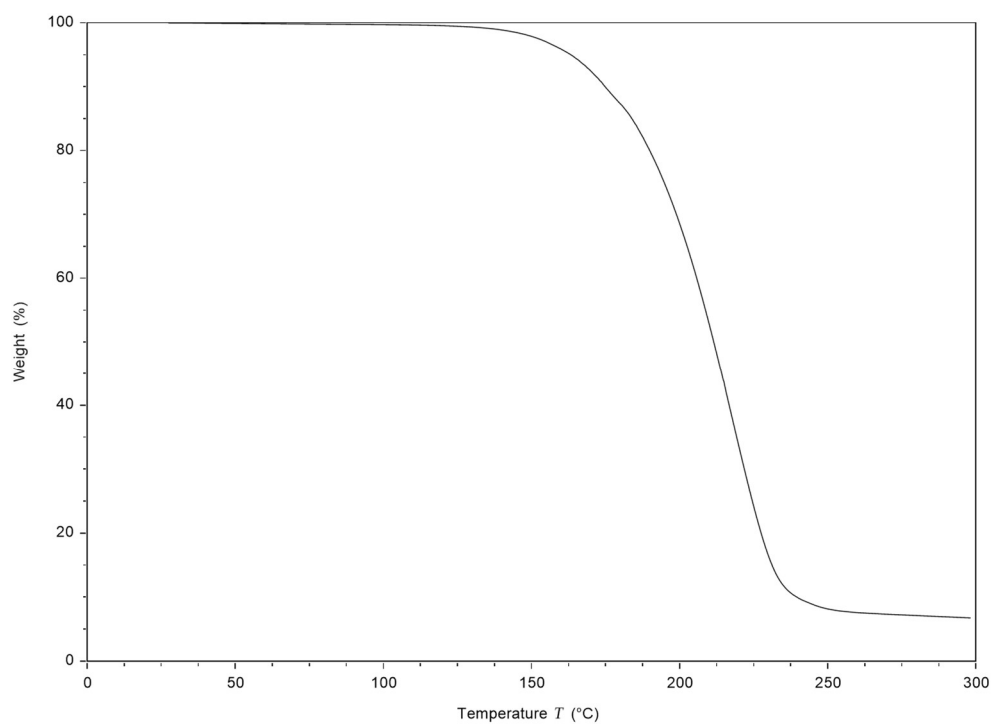
**Slika D71.** DSC forme D entakapona.



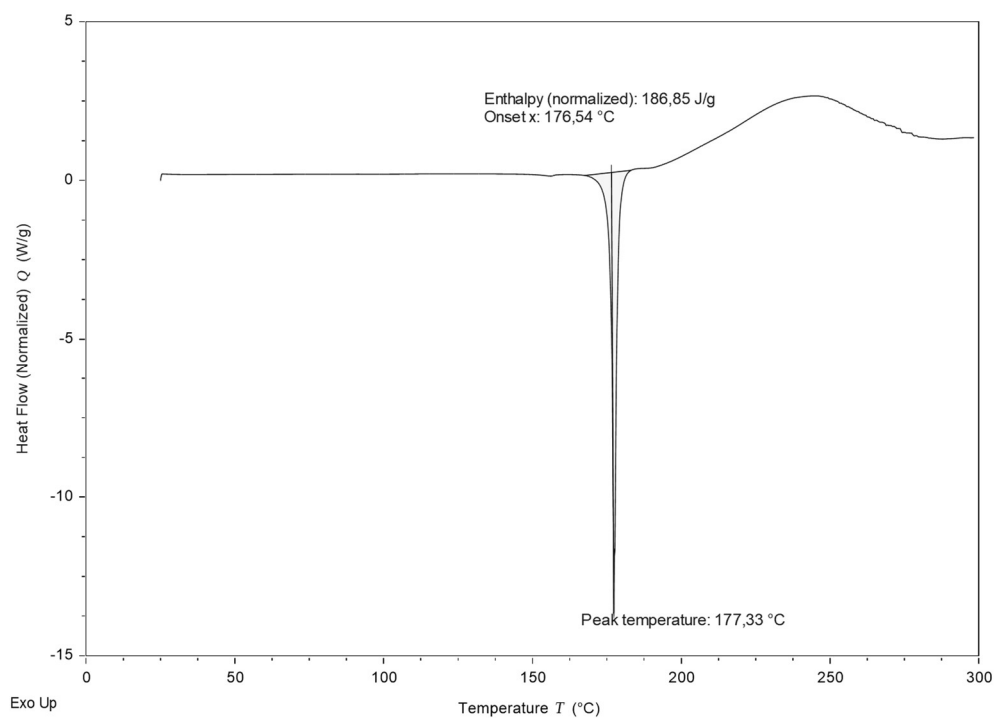
**Slika D72.** TG forme D entakapona.



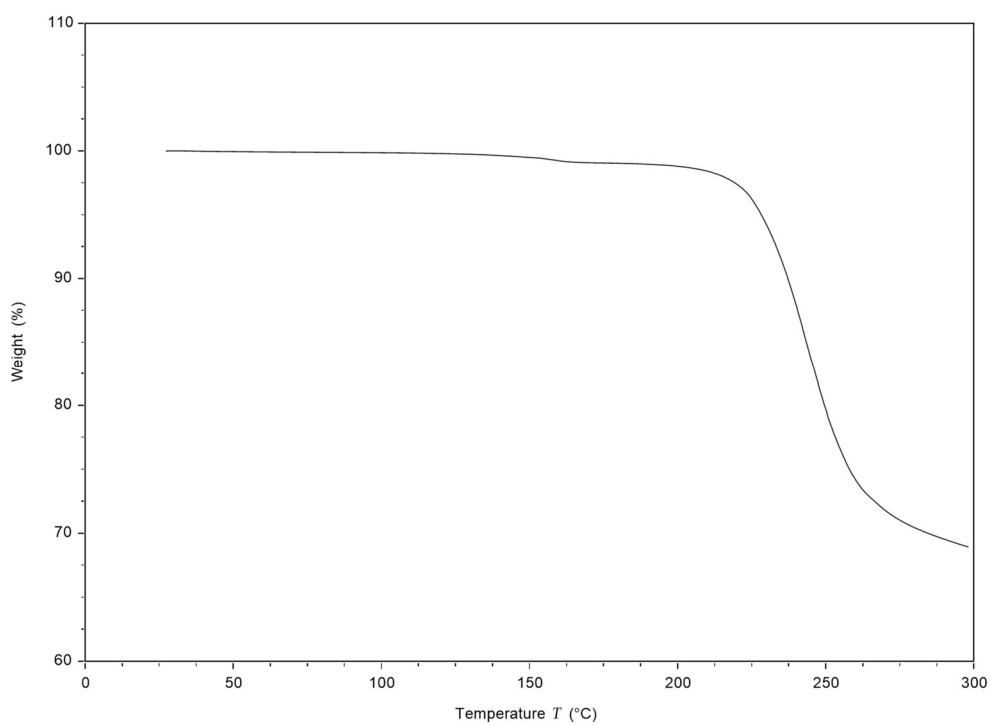
**Slika D73.** DSC forme E entakapona.



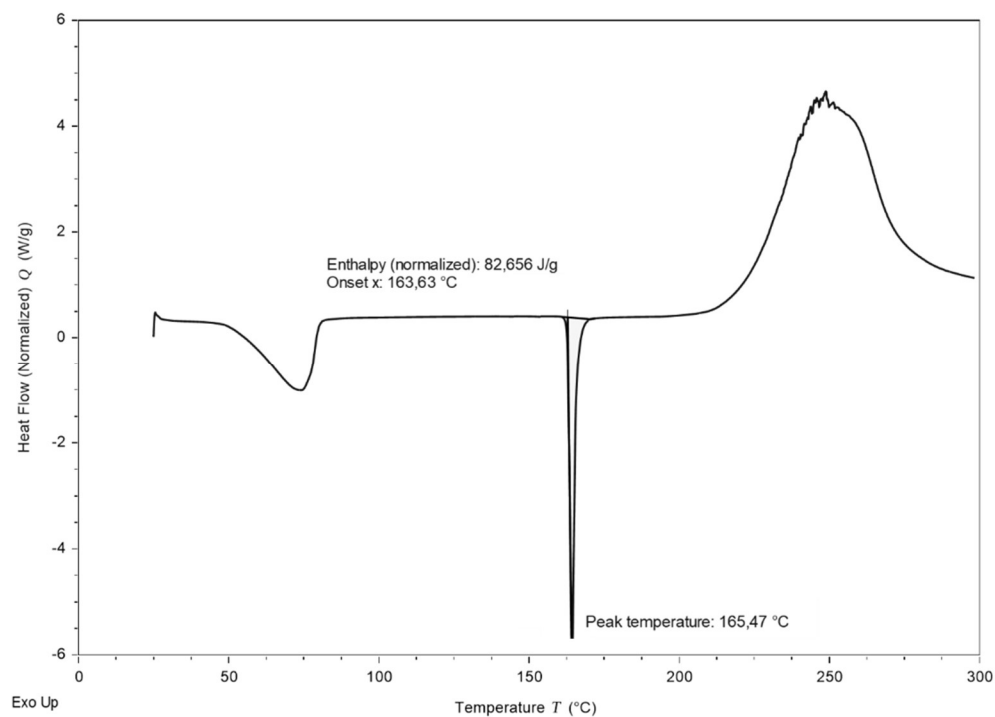
**Slika D74.** TG forme E entakapona.



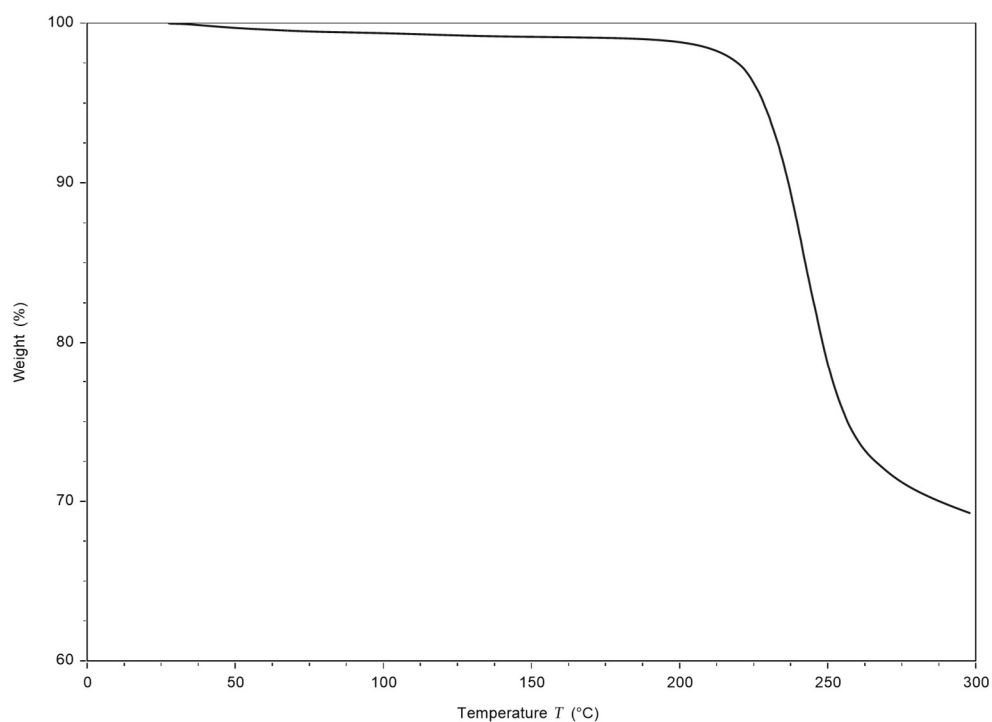
Slika D75. DSC forme  $\alpha$  entakapona.



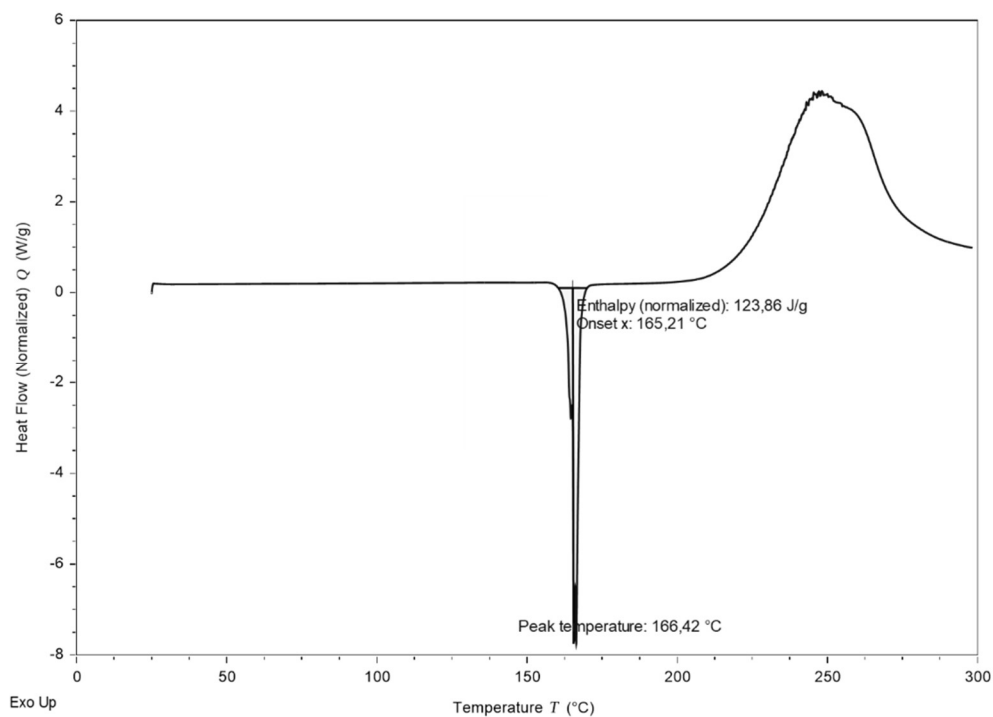
Slika D76. TG forme  $\alpha$  entakapona.



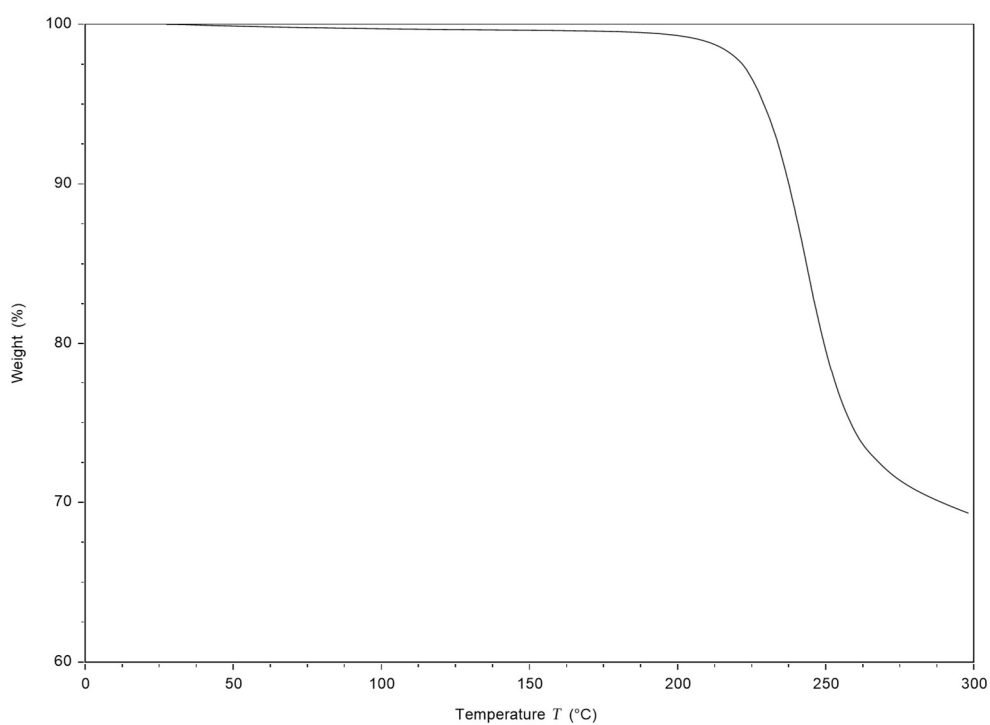
Slika D77. DSC forme  $\beta$  entakapona.



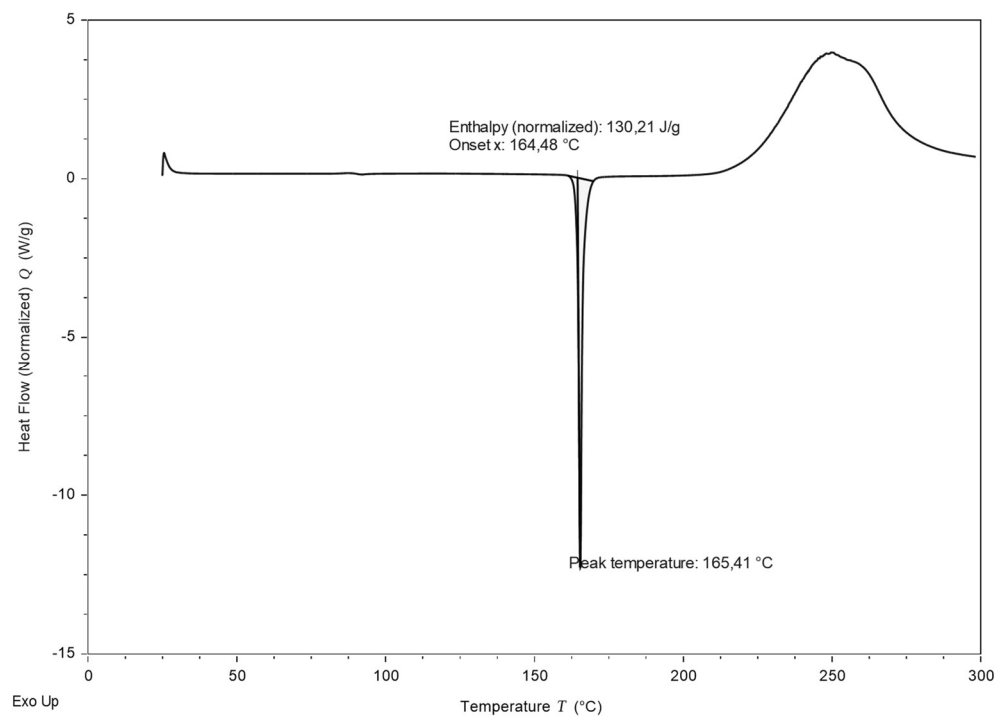
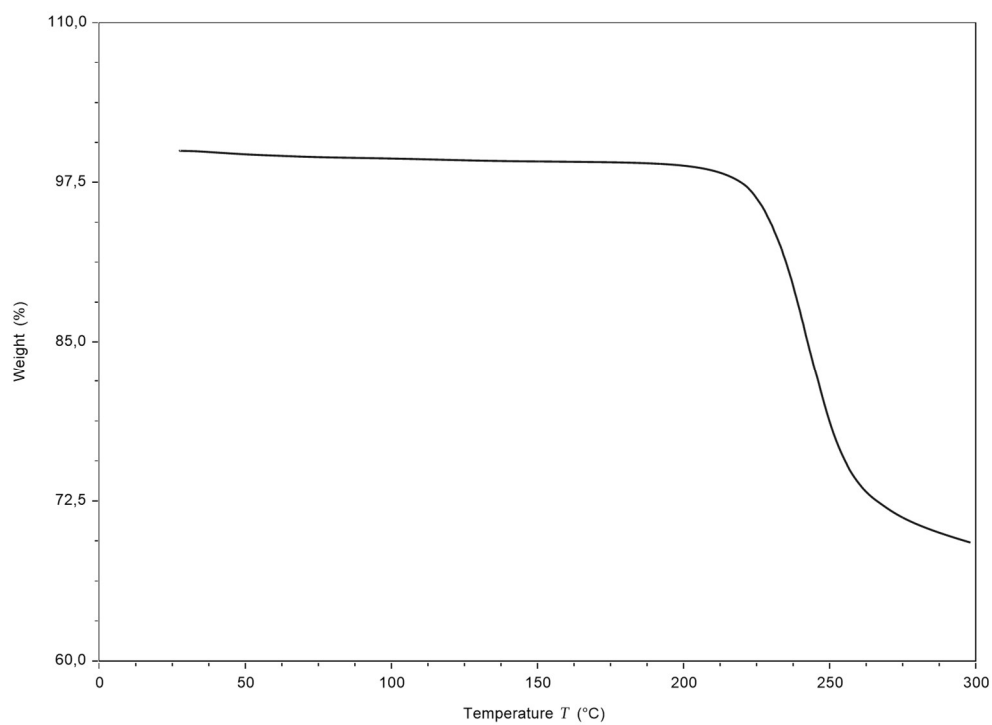
Slika D78. TG forme  $\beta$  entakapona.



**Slika D79.** DSC forme  $\delta$  entakapona.



**Slika D80.** TG forme  $\delta$  entakapona.

Slika D81. DSC forme  $\tau$  entakapona.Slika D82. TG forme  $\tau$  entakapona.

## § 9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 28. studenog 1984. godine u Zagrebu gdje sam pohađao osnovnu školu Jabukovac, a potom X. gimnaziju, prirodoslovno-matematički smjer. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kemijski odsjek, smjer dipl. inž. kemije, upisao sam 2003. godine. Diplomski rad pod naslovom „Kristalizacija vanadijevog(IV) i željezovog(III) kloro i bromo derivata inzulina“ izradio sam u laboratoriju Zavoda za anorgansku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Biserke Prugovečki i neposrednim vodstvom dr. sc. Ivice Đilovića. Diplomirao sam u srpnju 2009. godine.

Po završetku studija, u listopadu 2009. godine, zaposlen sam u PLIVA-i u odjelu Istraživanje i Razvoj odjel Kemije na radnom mjestu Suradnika u razvoju. Nakon godinu dana rada prelazim u odjel Unapređenje tehnoloških procesa i podrška proizvodnji (UTPPP). U svibnju 2015. godine prelazim na mjesto Višeg kemičara u odjelu Kemije te sam u travnju 2019. promoviran u Vodećeg kemičara. U srpnju 2021. promoviran sam u Voditelja grupe u odjelu Kemije gdje dobivam odgovornost vođenja projekata u vidu razvoja novih procesa pripreve aktivnih farmaceutskih supstanci gdje se intenzivno bavim razvojem i uvećanjem kontinuiranih procesa.

Doktorsku disertaciju sam izradio u laboratoriju odjela Kemije, Istraživanje i razvoj, Teva api Kemija, PLIVA Hrvatska d.o.o. pod mentorstvom prof. dr. sc. Ernesta Meštrovića.

Sudjelovao sam na različitim znanstvenim skupovima sa 7 posterskih priopćenja, objavio 2 znanstvena rada te 2 patenta.

### Popis znanstvenih radova:

A. Palčić, B. M. Szyja, M. Mičetić, T. Čendak, M. Akouche, K. Juraić, M. Čargonja, D. Mekterović, V. Vušak, V. Valtchev, *Inorg. Chem. Front.* **6** (2019), 2279-2290

**DOI:** 10.1039/C9QI00433E

V. Vušak, D. Vušak, K. Molčanov, E. Meštrović, *Acta Crystallogr. E* **76** (2020), 239-244

**DOI:** 10.1107/S2056989020000225