



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Tomislav Jednačak

**RAZVOJ METODOLOGIJE VIBRACIJSKE  
SPEKTROSKOPIJE *IN-LINE* ZA PRAĆENJE  
KEMIJSKIH REAKCIJA I KRISTALIZACIJE  
BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

Faculty of Science  
Department of Chemistry

Tomislav Jednačak

**DEVELOPMENT OF *IN-LINE* VIBRATIONAL  
SPECTROSCOPY METHODOLOGY FOR  
MONITORING OF CHEMICAL REACTIONS AND  
CRYSTALLIZATION OF BIOACTIVE MOLECULES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Tomislav Jednačak

**RAZVOJ METODOLOGIJE VIBRACIJSKE  
SPEKTROSKOPIJE *IN-LINE* ZA PRAĆENJE  
KEMIJSKIH REAKCIJA I KRISTALIZACIJE  
BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Predrag Novak, red. prof.

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

Faculty of Science  
Department of Chemistry

Tomislav Jednačak

**DEVELOPMENT OF *IN-LINE* VIBRATIONAL  
SPECTROSCOPY METHODOLOGY FOR  
MONITORING OF CHEMICAL REACTIONS AND  
CRYSTALLIZATION OF BIOACTIVE MOLECULES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Predrag Novak, Professor

Zagreb, 2013

Ova disertacija izrađena je na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka.

*Posebno zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na korisnim savjetima, razumijevanju, uloženom trudu i vremenu te pomoći pruženoj prilikom izrade doktorskog rada.*

*Puno hvala i Povjerenstvu, prof. dr. sc. Dubravki Matković-Čalogović i dr. sc. Goranu Baranoviću na konstruktivnim primjedbama i savjetima.*

*Zahvaljujem i kolegama s Tehničkog sveučilišta u Grazu na pruženoj pomoći prilikom mjerenja važnih za izradu ovog rada.*

*Hvala prof. dr. Klausu Zanggeru sa Sveučilišta Karl-Franzens u Grazu, dr. sc. Vilku Smrečkom iz NMR centra Instituta Ruđer Bošković te dr. sc. Jeleni Parlov Vučković iz INE d.d. na snimanju spektrara NMR u otopini.*

*Hvala prof. dr. Janezu Plavecu iz NMR centra Kemijskog instituta u Ljubljani na snimanju spektrara NMR u čvrstom stanju.*

*Hvala kolegama sa Zavoda za analitičku kemiju na podršci. Posebno bih izdvojio neke od njih koje smatram prijateljima i to abecednim redom da se nitko od njih na uvrijedi: Ivan, Katarina, Lovorka, Marina, Ratko; hvala Vam još jednom na svemu!*

*Veliko hvala mojoj obitelji na nesebičnoj pomoći i podršci u svim mojim planovima!*

*Hvala svima koji su imali povjerenja u mene.*

# SADRŽAJ

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA                                                       | x  |
| BASIC DOCUMENTATION CARD                                                               | xi |
| <b>1. SVRHA</b>                                                                        | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI UVOD</b>                                                               | 5  |
| 2.1. Procesne analitičke tehnike                                                       | 7  |
| 2.2. Optička vlakna                                                                    | 9  |
| 2.3. Vibracijska spektroskopija                                                        | 11 |
| 2.3.1. Infracrvena spektroskopija                                                      | 11 |
| 2.3.2. Ramanova spektroskopija                                                         | 12 |
| 2.4. Vibracijska spektroskopija <i>in-line</i>                                         | 14 |
| 2.4.1. NIR spektroskopija <i>in-line</i>                                               | 16 |
| 2.4.2. Ramanova spektroskopija <i>in-line</i>                                          | 17 |
| 2.5. Multivarijatne metode analize                                                     | 19 |
| 2.5.1. Metoda PCA                                                                      | 21 |
| 2.5.2. Metoda IHM                                                                      | 22 |
| 2.6. Spektroskopija NMR                                                                | 24 |
| 2.7. Tehnika SWAXS                                                                     | 27 |
| 2.8. Istraživanje i razvoj farmaceutskog proizvoda                                     | 28 |
| 2.8.1. Istraživanje                                                                    | 29 |
| 2.8.2. Razvoj                                                                          | 29 |
| 2.9. Kristalizacija                                                                    | 30 |
| 2.9.1. Priprava prezasićene otopine                                                    | 30 |
| 2.9.2. Nukleacija                                                                      | 32 |
| 2.9.3. Rast kristala i nastanak kristalnog taloga                                      | 32 |
| 2.10. Polimorfizam                                                                     | 33 |
| 2.10.1. Primjena NIR spektroskopije <i>in-line</i><br>za proučavanje polimorfizma      | 34 |
| 2.10.2. Primjena Ramanove spektroskopije <i>in-line</i><br>za proučavanje polimorfizma | 37 |

|           |                                                       |           |
|-----------|-------------------------------------------------------|-----------|
| 2.11.     | Entakapon                                             | 40        |
| 2.12.     | Salicilidenski derivati karbohidrazida                | 41        |
| <b>3.</b> | <b>EKSPERIMENTALNI DIO</b>                            | <b>45</b> |
| 3.1.      | Materijali                                            | 47        |
| 3.2.      | Reakcija sinteze entakapona                           | 47        |
| 3.3.      | Reakcija sinteze derivata karbohidrazida <b>1 i 2</b> | 48        |
| 3.4.      | Postupak kristalizacije entakapona                    | 49        |
| 3.5.      | Tehnike vibracijske spektroskopije <i>in-line</i>     | 49        |
| 3.5.1.    | Ramanova spektroskopija <i>in-line</i>                | 49        |
| 3.5.2.    | NIR spektroskopija <i>in-line</i>                     | 52        |
| 3.6.      | Multivarijatna analiza spektara <i>in-line</i>        | 52        |
| 3.6.1.    | Analiza Ramanovih spektara <i>in-line</i> metodom PCA | 52        |
| 3.6.2.    | Analiza NIR spektara <i>in-line</i> metodom PCA       | 53        |
| 3.6.3.    | Analiza Ramanovih spektara <i>in-line</i> metodom IHM | 53        |
| 3.7.      | Spektroskopija NMR u otopini                          | 54        |
| 3.7.1.    | Tehnika $^1\text{H}$ NMR                              | 54        |
| 3.7.2.    | Tehnika APT                                           | 55        |
| 3.7.3.    | Tehnika DEPT                                          | 56        |
| 3.7.4.    | Tehnika COSY                                          | 57        |
| 3.7.5.    | Tehnika HMQC                                          | 58        |
| 3.7.6.    | Tehnika HSQC                                          | 59        |
| 3.7.7.    | Tehnika HMBC                                          | 60        |
| 3.7.8.    | Tehnika NOESY                                         | 61        |
| 3.8.      | Spektroskopija NMR u čvrstom stanju                   | 62        |
| 3.8.1.    | Tehnika $^1\text{H}$ CRAMPS                           | 62        |
| 3.8.2.    | Tehnika $^{13}\text{C}$ CP-MAS                        | 64        |
| 3.9.      | SWAXS analiza                                         | 65        |

|                                                                                                          |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>                                                                           | 67   |
| 4.1. Sinteza entakapona                                                                                  | 69   |
| 4.1.1. Knoevenagelova kondenzacijska reakcija                                                            | 69   |
| 4.1.2. Spektri <i>off-line</i> izomera entakapona                                                        | 69   |
| 4.1.3. Praćenje Knoevenagelove kondenzacijske reakcije<br>Ramanovom spektroskopijom <i>in-line</i>       | 71   |
| 4.1.4. PCA analiza Ramanovih spektara <i>in-line</i>                                                     | 73   |
| 4.1.5. Identifikacija reakcijskih produkata <i>off-line</i>                                              | 74   |
| 4.2. Kristalizacija entakapona                                                                           | 78   |
| 4.2.1. Spektri <i>off-line</i> polimorfa <i>E</i> - izomera entakapona                                   | 79   |
| 4.2.2. Praćenje kristalizacije <i>E</i> - izomera entakapona<br>Ramanovom spektroskopijom <i>in-line</i> | 80   |
| 4.2.3. Identifikacija polimorfa u uzorcima <i>off-line</i>                                               | 91   |
| 4.3. Strukturna karakterizacija derivata karbohidrazida <b>1</b> i <b>2</b>                              | 94   |
| 4.3.1. Strukturna karakterizacija spoja <b>1</b>                                                         | 95   |
| 4.3.2. Strukturna karakterizacija spoja <b>2</b>                                                         | 103  |
| 4.4. Reakcija kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida                                              | 113  |
| 4.4.1. Identifikacija reakcijskih produkata u otopini                                                    | 113  |
| 4.4.2. Identifikacija reakcijskih produkata u čvrstom stanju                                             | 114  |
| 4.4.3. Praćenje reakcije kondenzacije vibracijskom<br>spektroskopijom <i>in-line</i>                     | 121  |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b>                                                                                      | 133  |
| <b>6. LITERATURA</b>                                                                                     | 137  |
| <b>7. DODATAK</b>                                                                                        | xii  |
| <b>8. ŽIVOTOPIS</b>                                                                                      | xxvi |
| <b>9. POPIS RADOVA</b>                                                                                   | xxx  |

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijjski odsjek  
Zavod za analitičku kemiju

Doktorski rad

### RAZVOJ METODOLOGIJE VIBRACIJSKE SPEKTROSKOPIJE *IN-LINE* ZA PRAĆENJE KEMIJSKIH REAKCIJA I KRISTALIZACIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA

Tomislav Jednačak

Vibracijska spektroskopija *in-line* primijenjena je za praćenje procesa sinteze i kristalizacije biološki aktivnih molekula *in situ*. Kao modelni sustav za razvoj metodologije odabrana je djelatna tvar entakapon. Sinteza entakapona u izobutil-acetatu, toluenu i heptanu praćena je Ramanovom spektroskopijom *in-line*. Multivarijatnom analizom Ramanovih spektara *in-line* procijenjeno je trajanje reakcije u svakom otapalu te su asignirane karakteristične vrpce. Ramanova spektroskopija *in-line* i multivarijatne metode dalje su korištene za praćenje kristalizacije entakapona u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol. Statističkom analizom spektara *in-line* procijenjen je početak i temperatura kristalizacije u pripremljenim otopinama te su preliminarno identificirani svi prisutni polimorfi. Daljnju identifikaciju dobivenih polimorfa omogućila je *off-line* analiza Ramanovom spektroskopijom i tehnikom SWAXS.

Ova metodologija testirana je i primijenjena za praćenje kemijske reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida kojom nastaje smjesa mono- (**1**) i bis(saliciliden)karbohidrazida (**2**). Prije korištenja tehnika *in-line*, čisti spojevi **1** i **2** strukturno su okarakterizirani u otopini i čvrstom stanju. Sastav reakcijskog produkta u pojedinom otapalu procijenjen je na temelju analize Ramanovih, NMR i SWAXS spektara *off-line*. Pojava karakterističnih *in-line* Ramanovih vrpca potvrdila je nastanak spojeva **1** i **2** u svim korištenim otapalima, dok je smanjenje *in-line* NIR vrpca ukazalo na potrošnju reaktanata. Brzina reakcije bila je proporcionalna temperaturi otapala, što je potvrđeno multivarijatnom analizom spektara *in-line*.

Prodiskutirane su prednosti i nedostaci ovakvog pristupa za praćenje procesa bioaktivnih spojeva.

(178 stranica, 101 slika, 13 tablica, 89 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: entakapon / multivarijatne metode analize / NIR spektroskopija *in-line* / Ramanova spektroskopija *in-line* / spektroskopija NMR / SWAXS

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

Mentor: Dr. sc. Predrag Novak, red. prof.

Ocjenitelji: Dr.sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Dr.sc. Predrag Novak, red. prof.

Dr.sc. Goran Baranović, zn. savj.

Rad prihvaćen: 06. studenog 2013.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry  
Laboratory of Analytical Chemistry

Doctoral Thesis

### **DEVELOPMENT OF *IN-LINE* VIBRATIONAL SPECTROSCOPY METHODOLOGY FOR MONITORING OF CHEMICAL REACTIONS AND CRYSTALLIZATION OF BIOACTIVE MOLECULES**

**Tomislav Jednačak**

*In-line* vibrational spectroscopy was applied for *in situ* monitoring of synthesis and crystallization processes involving bioactive molecules. To develop the methodology a model system, *e.g.* drug entacapone was used. Hence, *in-line* Raman spectroscopy was employed to monitor entacapone synthesis in different solvents, *e.g.* isobutyl-acetate, toluene and heptane. The spectra were further processed by using multivariate data analysis which enabled the estimation of reaction times and the assignment of vibrational bands characteristic for *E*- and *Z*- isomers. Subsequently, a combination of two techniques was used for monitoring of entacapone crystallization in acetone/water and toluene/methanol solutions. Statistical analysis of *in-line* spectra allowed for the determination of crystallization temperatures and preliminary polymorph identification. The obtained polymorphs were further identified *off-line* by using Raman spectroscopy and SWAXS.

The described methodology was then tested on a real carbonylhydrazide system including the condensation reaction between carbonylhydrazide and salicylaldehyde. The reaction yielded a mixture of mono- (**1**) and bis(salicylidene)carbonylhydrazide (**2**). Prior to *in-line* analysis, compounds **1** and **2** were structurally characterized in solution and solid state by using *off-line* Raman, NMR and SWAXS analysis. The appearance of characteristic *in-line* Raman bands and intensity decreasing of *in-line* NIR bands confirmed the formation of compounds **1** and **2** in all solvents used. The multivariate analysis of *in-line* spectra confirmed that the reaction rate was proportional to the solvent temperature.

Advantages and disadvantages of this approach for process monitoring were discussed.

(178 pages, 101 figures, 13 tables, 89 references, original in Croatian)

Key words: entacapone / *in-line* NIR spectroscopy / *in-line* Raman spectroscopy / multivariate analysis methods / NMR spectroscopy / SWAXS

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

Supervisor: Dr. sc. Predrag Novak, Professor

Reviewers: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, Professor

Dr. sc. Predrag Novak, Professor

Dr. sc. Goran Baranović, Senior Scientist

Thesis accepted: November 6<sup>th</sup> 2013

## **1. SVRHA**



Svrha ovih znanstvenih istraživanja je razviti metodologiju vibracijske spektroskopije *in-line* za *in situ* praćenje procesa sinteze i kristalizacije biološki aktivnih molekula. Primjena NIR i Ramanove spektroskopije *in-line* omogućit će bolju kontrolu i podešavanje procesnih parametara u realnom vremenu s ciljem povećanja učinkovitosti i selektivnosti proučavanih procesa. Posebna pozornost bit će posvećena uvjetima u kojima se izvode reakcije sinteze. Na temelju rezultata dobivenih analizom *in-line* pokušat će se optimirati fizičko-kemijska svojstva reakcijskih produkata u svrhu poboljšanja njihovih karakteristika. S obzirom da se velik broj djelatnih tvari u čvrstom stanju pojavljuje u različitim polimorfnim oblicima, jedan od ciljeva ovog rada je i usmjeravanje procesa kristalizacije prema farmaceutski najzanimljivijem polimorfnom obliku. Polimorfni sastav smjese odredit će se kombinacijom vibracijske spektroskopije *in-line*, statističkih metoda i analize *off-line*. Planirana istraživanja će prvo obuhvatiti djelatnu tvar entakapon kao modelni sustav. Takva metodologija će se dalje testirati i primijeniti za praćenje sinteze, određivanje strukture i identifikaciju polimorfa realnih sustava kao što su bioaktivni salicilidenski derivati karbohidrazida.

Novi istraživački pristup korišten u ovoj disertaciji unaprijedit će primjenu vibracijske spektroskopije *in-line* kao procesne analitičke tehnike. Razvoj novih metodologija temeljenih na NIR i Ramanovoj spektroskopiji *in-line* omogućit će bolje razumijevanje procesa, a time i poboljšanje kvalitete dobivenih proizvoda. Sinergijom različitih eksperimentalnih i statističkih tehnika istražiti će se mogućnosti egzaktnog praćenja promjena tijekom fizičkih i kemijskih procesa vibracijskom spektroskopijom *in-line*.



## **2. TEORIJSKI UVOD**



## 2.1. Procesne analitičke tehnike

Procesne analitičke tehnike (PAT) obuhvaćaju kontrolu i praćenje fizičkih i kemijskih procesa u svrhu dobivanja proizvoda odgovarajućih svojstava. One uključuju identifikaciju i optimiranje parametara koji utječu na pojedini proces, praćenje procesa u realnom vremenu, dobivanje podataka koji se mogu obraditi statističkim metodama analize te razvoj procesne kontrolne strategije.<sup>1-3</sup> Takvim pristupom dobiva se uvid u trenutni sastav smjese i procesna odstupanja, poboljšava efikasnost i sigurnost industrijskih procesa, smanjuje njihovo trajanje te osigurava kvaliteta konačnog proizvoda.

Procesne analitičke tehnike se prema mjestu određivanja mogu podijeliti na:

1. Tehnike *off-line* gdje se analiza provodi u dislociranom laboratoriju
2. Tehnike *at-line* gdje se analiza provodi u laboratoriju u mjestu proizvodnje
3. Tehnike *on-line* koje uključuju uzorkovanje, analizu i vraćanje uzoraka u proces proizvodnje
4. Tehnike *in-line* gdje se analiza odvija u realnom vremenu, a omogućava se mjerenje *in situ* pomoću sonde, bez uzorkovanja

Najznačajniji nedostaci mjerenja *off-line* i *at-line* su nemogućnost dobivanja podataka u realnom vremenu te prisutnost statističkih i fizikalnih pogrešaka prilikom uzorkovanja. Statističke pogreške se pojavljuju ako analizirani uzorak nije reprezentativan, dok fizikalne greške nastaju zbog promjena u materijalu uslijed procesa uzorkovanja.

S druge strane, analiza *in-line* omogućava praćenje fizikalnih i kemijskih procesa *in situ*. Prednosti takvog pristupa su snimanje u realnom vremenu, manje izlaganje opasnim materijalima, te manja mogućnost kontaminacije ili uništavanja uzorka.<sup>4</sup> Tijekom analize *in-line* nema potrebe za uzimanjem alikvota i narušavanjem ravnoteže u reakcijskom sustavu.

Zbog svih svojih prednosti, PAT *in-line* se uspješno primjenjuju u brojnim industrijskim granama, poput industrije nafte, polimera, katalizatora, poluvodiča, stakla te prehrambene i farmaceutske industrije.<sup>2,3</sup> Nadalje, regulatorne agencije sve više nameću korištenje analitičkih tehnika *in line* za praćenje procesa u farmaceutskoj industriji kao tehnike izbora.<sup>1</sup>

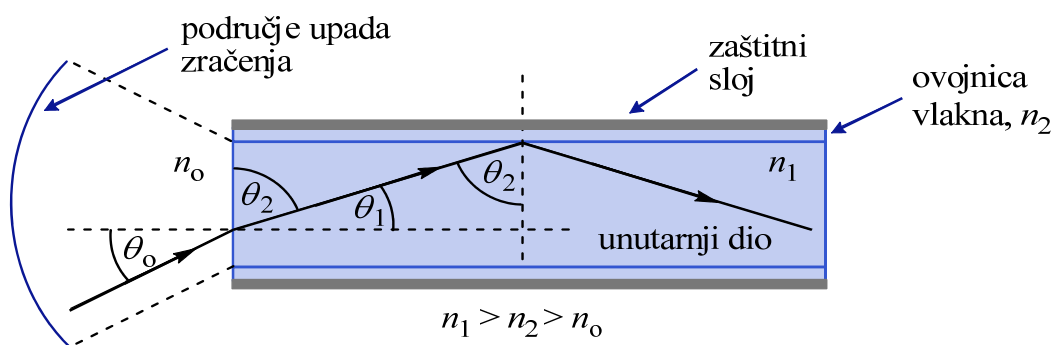
Stoga je u posljednje vrijeme razvijen velik broj PAT *in-line* koje se temelje na:

- Spektroskopiji u ultraljubičastom i vidljivom području (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV-Vis)
- Flourescenciji, fosforescenciji i kemiluminescenciji
- Infracrvenoj spektroskopiji u bliskom infracrvenom području (engl. *near infrared spectroscopy*, NIR)
- Infracrvenoj spektroskopiji u srednjem infracrvenom području (engl. *middle infrared spectroscopy*, MIR)
- Ramanovoj spektroskopiji
- Kemijskom oslikavanju infracrvenom spektroskopijom u bliskom infracrvenom području (engl. *near infrared chemical imaging*, NIR-CI), infracrvenom spektroskopijom u srednjem infracrvenom području (engl. *middle infrared chemical imaging*, MIR-CI) te Ramanovom spektroskopijom (engl. *Raman chemical imaging*, Raman-CI)
- Elektroanalitičkim metodama poput voltametrije, potenciometrije i konduktometrije

Značajno mjesto među navedenim tehnikama PAT *in-line* zauzimaju one koje se temelje na vibracijskoj spektroskopiji. Eksperimentalni podaci dobiveni njihovim korištenjem vrlo često se zbog složenosti dalje obrađuju korištenjem statističkih metoda poput analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) i neizravnog tvrdog modeliranja (engl. *indirect hard modelling*, IHM).<sup>2,5</sup> Na taj način dobiva se statistički opis pojedinih procesnih parametara koje je potrebno optimirati s ciljem unaprijeđenja fizičkih i kemijskih procesa te osiguranja kvalitete konačnog proizvoda.

## 2.2. Optička vlakna

Jedan od preduvjeta za uspješnu primjenu spektroskopskih tehnika *in-line* je učinkovit prijenos zračenja između sonde i spektrometra. Takav prijenos može se izvesti na dva načina: pomoću sustava zrcala ili korištenjem optičkih vlakana. U suvremenim tehnikama *in-line* najviše se koriste optička vlakna koja su zbog svoje fleksibilnosti, robusnosti i male gustoće prilagodljiva eksperimentalnim uvjetima. Optičkim vlaknima zračenje se prenosi na velike udaljenosti uz minimalni gubitak intenziteta snopa, što omogućava udaljeno senzoriiranje pomoću sonde.<sup>6</sup> Presjek građe optičkog vlakna te geometrija upada zrake svjetlosti prikazani su na Slici 2.1.



Slika 2.1. Prikaz građe optičkog vlakna i geometrije upada zrake svjetlosti.

Optičko vlakno se sastoji od unutarnjeg dijela indeksa loma  $n_1$ , ovojnice vlakna indeksa loma  $n_2$  te zaštitnog sloja. Unutarnji dio vlakna izrađen je od materijala velikog indeksa loma, primjerice kvarca, polistirena ili stakla, koji ne apsorbira elektromagnetno zračenje u području frekvencija koje se prenose vlaknom. Ovojnica vlakna napravljena je od materijala manjeg indeksa loma (npr. polimetil-metakrilata), a debljine je 3–4 % promjera unutarnjeg dijela vlakna. Oko ovojnice se nanosi zaštitni sloj koji nema optičku ulogu, a služi za fizičku i kemijsku zaštitu od vanjskih utjecaja.

Zraka svjetlosti ulazi u vlakno iz okolnog medija indeksa loma  $n_o$  pod kutom  $\theta_o$  koji osigurava potpunu unutarnju refleksiju na dodirnoj plohi unutarnjeg dijela i ovojnice vlakna (Slika 2.1).

Prilikom ulaska u unutarnji dio vlakna indeksa loma  $n_1$ , zraka se lomi pod kutom  $\theta_1$  te potom potpuno reflektira pod kutom  $\theta_2$  na dodirnoj plohi unutarnjeg dijela i ovojnice. Da bi došlo do potpune unutarnje refleksije, kut  $\theta_2$  treba biti veći od kritičnog kuta  $\theta_k$ :

$$\theta_2 > \theta_k \quad (2.1.)$$

Lom svjetlosti na ulazu u vlakno može se opisati Snellovim zakonom:

$$n_o \sin \theta_o = n_1 \sin \theta_1 \quad (2.2.)$$

Zbog potpune unutarnje refleksije na dodirnoj plohi unutarnjeg dijela i ovojnice vlakna, zraka putuje uzduž granice faza te je kut loma jednak  $90^\circ$ :

$$n_1 \sin \theta_2 = n_2 \sin 90^\circ \quad (2.3.)$$

Kombinacijom prethodnih jednadžbi dobiva se izraz za numerički otvor (engl. *Numerical Aperture*, NA):

$$NA = n_o \sin \theta_o = \sqrt{(n_1^2 - n_2^2)} \quad (2.4.)$$

Numerički otvor određuje područje upada zračenja, a ovisi o indeksima loma okolnog medija, unutarnjeg dijela i ovojnice vlakna (Slika 2.1). Veličina numeričkog otvora je mjera učinkovitosti prikupljanja zračenja, a utječe na intenzitet signala u spektrima *in-line*.<sup>7</sup> Optička vlakna koja se uobičajeno koriste u tehnikama *in-line* imaju numeričke otvore u rasponu od 0,1–0,5 što u zraku odgovara rasponu upadnih kuteva od  $6^\circ$ – $30^\circ$ .

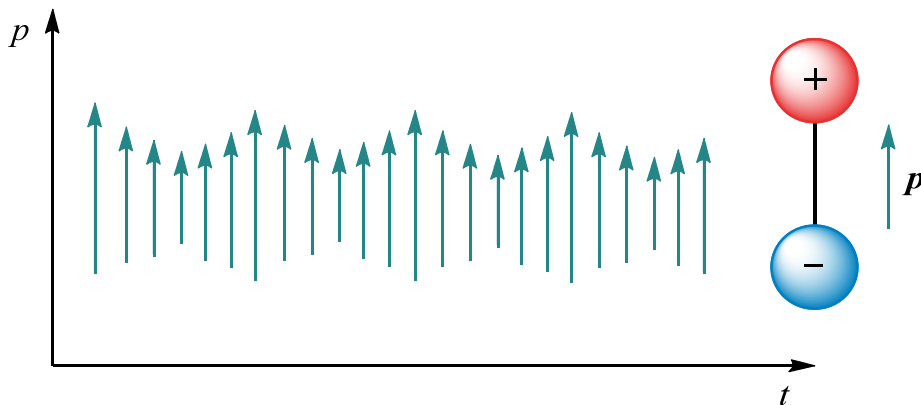
## 2.3. Vibracijska spektroskopija

Tehnike vibracijske spektroskopije mogu se temeljiti na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetnog zračenja te stoga razlikujemo infracrvenu odnosno Ramanovu spektroskopiju. Vibracijska spektroskopija se koristi za identifikaciju molekula na temelju vibracija njihovih atoma, odnosno periodičkih promjena kuteva (vibracije svijanja) i međuatomskih udaljenosti (vibracije istezanja).<sup>8,9</sup>

### 2.3.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (engl. *infrared spectroscopy*, IR) proučava interakcije tvari s elektromagnetnim zračenjem u rasponu valnih brojeva od  $12500\text{ cm}^{-1}$  do  $10\text{ cm}^{-1}$ , odnosno valnih duljina od  $0,8\text{ }\mu\text{m}$  do  $1000\text{ }\mu\text{m}$ . IR spektar pokazuje ovisnost apsorbancije ili transmitancije o valnom broju ili valnoj duljini. Područje IR spektra može se podijeliti na blisko ( $12500\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ ), srednje ( $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ ) i daleko ( $400\text{ cm}^{-1}$  do  $10\text{ cm}^{-1}$ ). Za analizu organskih spojeva najzanimljivije je srednje područje infracrvenog spektra gdje se nalaze vrpce karakteristične za pojedine spojeve. Navedeno područje može se podijeliti na područje funkcijskih skupina ( $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $1400\text{ cm}^{-1}$ ) i područje otiska prsta ( $1400\text{ cm}^{-1}$  do  $10\text{ cm}^{-1}$ ) koje je specifično za svaki uzorak.

Infracrvena spektroskopija proučava molekulske vibracije koje uključuju pomake atoma pri određenim uvjetima. Vibracije su posljedica apsorpcije elektromagnetnog zračenja u molekuli. Pritom molekula prelazi iz osnovnog u pobuđeno vibracijsko stanje, što se u spektru detektira kao vrpca. Vrpce u infracrvenom spektru odgovaraju samo onim vibracijama kod kojih dolazi do vremenski periodične promjene električnog dipolnog momenta  $\mathbf{p}$  (Slika 2.2).



Slika 2.2. Titrajući dipol uzrokuje vremenski periodičnu promjenu električnog polja u svojoj blizini.

Električni dipolni moment je vektor usmjeren od težišta negativnog prema težištu pozitivnog naboja, a definiran je kao:

$$\mathbf{p} = \sum_{i=1}^N q_i \mathbf{r}_i \quad (2.5.)$$

gdje je  $q_i$  naboj  $i$ -te čestice, a  $\mathbf{r}_i$  vektor njezinog položaja.

Ovisno o energiji apsorbiranog kvanta zračenja, u molekuli će se pobuditi točno određene vibracije pojedinih funkcijskih skupina. Zbog općenito slabe sprege s ostalim vibracijama, one se mogu promatrati odvojeno, što omogućava analitičku primjenu infracrvene spektroskopije.

### 2.3.2. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom (Ramanovom) raspršenju elektromagnetnog zračenja uslijed interakcije s uzorkom. Razlika u energiji sustava prije i nakon Ramanovog raspršenja uglavnom odgovara srednjem infracrvenom području elektromagnetnog zračenja. Stoga se Ramanova spektroskopija može upotrijebiti kao tehnika komplementarna infracrvenoj spektroskopiji za analizu molekula na temelju njihovih vibracija.

Da bi vibracija molekule bila aktivna u Ramanovom spektru, tijekom vibracije se mora mijenjati polarizabilnost,  $\alpha$ . Polarizabilnost je svojstvo molekule da se polarizira u prisutnosti električnog polja (Slika 2.3). Pritom se u molekuli inducira električni dipolni moment,  $\mathbf{p}_i$  proporcionalan električnom polju,  $\mathbf{E}$ :

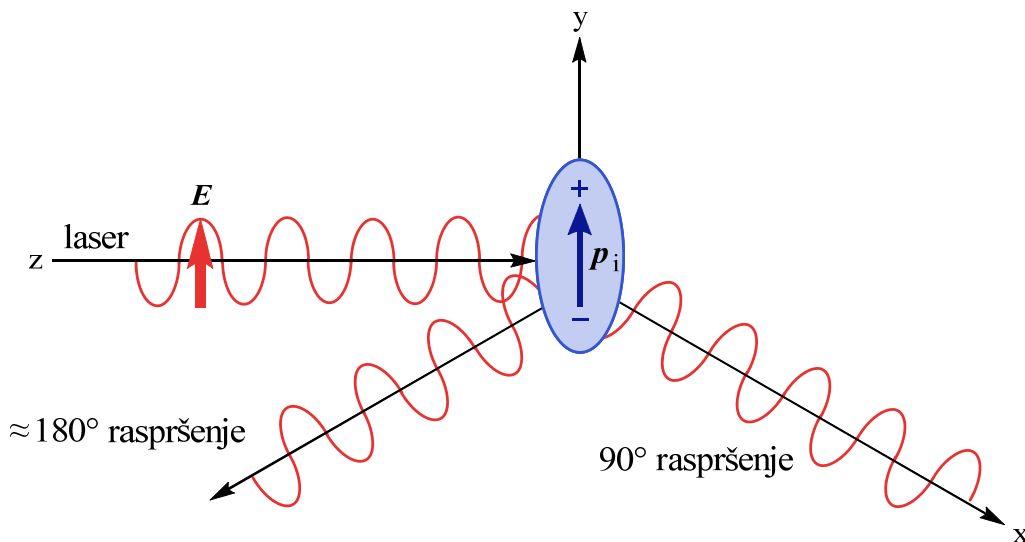
$$\mathbf{p}_i = \alpha \mathbf{E} \quad (2.6.)$$

Polarizabilnost je u pravilu anizotropno svojstvo koje ovisi o vrsti i obliku molekule, a može se prikazati matricom:

$$\begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.7.)$$

gdje  $\alpha_{ij}$  predstavljaju udjele polarizabilnosti pridružene komponentama električnog polja  $\mathbf{E}$ .

Pobudno lasersko zračenje se, uslijed interakcije s uzorkom, može raspršiti pod različitim kutovima (Slika 2.3). Prilikom raspršenja zračenja mijenja se polarizabilnost molekule, što uzrokuje pojavu karakterističnih vrpca u Ramanovom spektru.

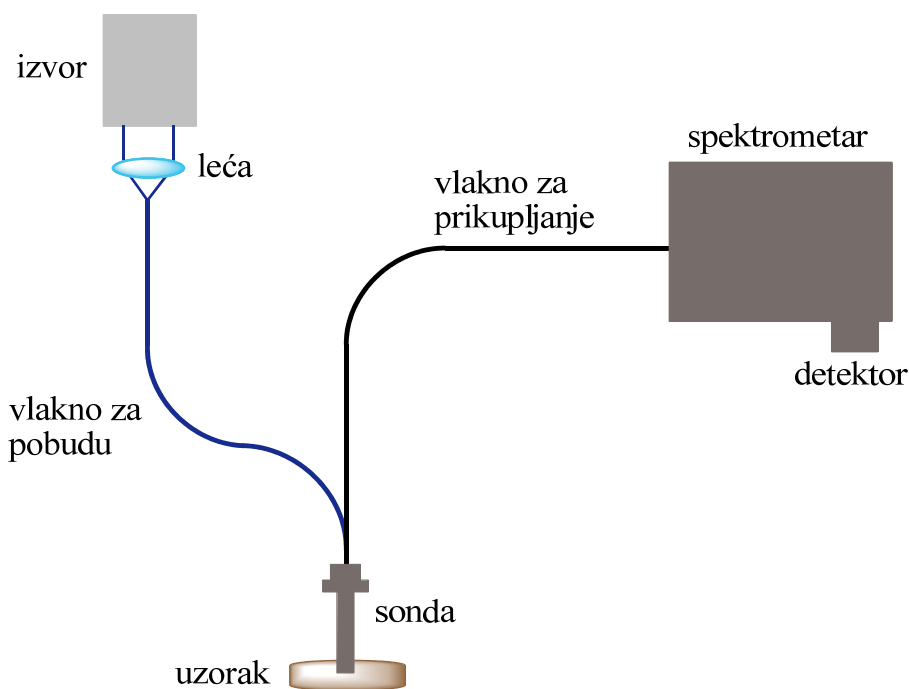


Slika 2.3. Raspršenje zračenja pod kutovima od 90° i približno 180°. Električno polje inducira električni dipolni moment u molekuli.

Osim što može dati informacije komplementarne infracrvenoj spektroskopiji, Ramanova spektroskopija ima i nekoliko prednosti od kojih treba istaknuti jednostavnu pripremu uzoraka, mogućnost snimanja u vodenim otopinama te malu količinu uzorka potrebnog za analizu.

## 2.4. Vibracijska spektroskopija *in-line*

Vibracijska spektroskopija *in-line* omogućava praćenje i kontrolu procesa na temelju promjena u intenzitetu karakterističnih vibracijskih vrpca. Vibracijski spektri *in-line* se snimaju *in situ*, odnosno u realnom vremenu, pomoću spektrometra opremljenog sondom i optičkim vlaknima (Slika 2.4). Pobudno zračenje iz izvora usmjerava se prema vlaknu prolaskom kroz leću i prenosi preko sonde do uzorka. Nakon interakcije s uzorkom, zračenje se prikuplja pomoću sonde te odgovarajućim vlaknom prenosi do spektrometra i na kraju do detektora.



Slika 2.4. Shematski prikaz spektrometra sa sondom i optičkim vlaknima.

U ovoj disertaciji korištene su dvije tehnike vibracijske spektroskopije *in-line*:

- NIR spektroskopija *in-line*
- Ramanova spektroskopija *in-line*

Njihova usporedba prikazana je u Tablici 2.1.

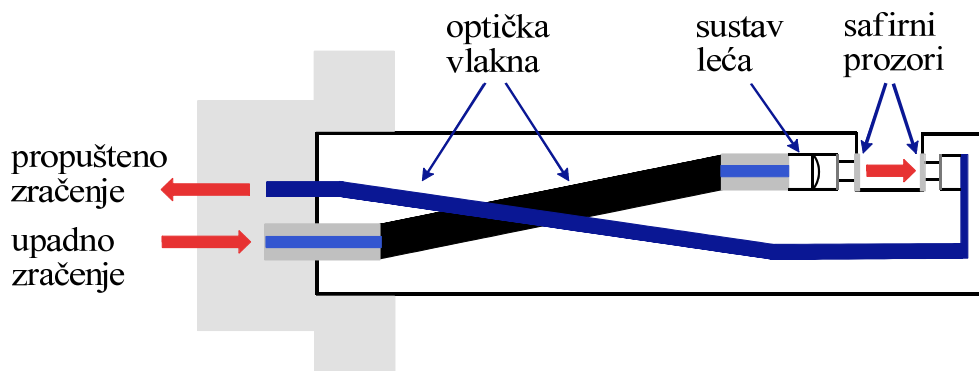
Tablica 2.1. Usporedba tehnika vibracijske spektroskopije *in-line* korištenih u ovoj disertaciji.<sup>2</sup>

| Svojstvo                            | NIR spektroskopija <i>in-line</i>                                                                  | Ramanova spektroskopija <i>in-line</i>                                                             |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Podaci dobiveni asignacijom spektra | Kombinacijske vibracije i viši tonovi                                                              | Osnovne vibracije; kombinacijske vibracije i viši tonovi; vibracijsko-rotacijska struktura         |
| Vrste spektrometara                 | Disperzivan; FTIR                                                                                  | Disperzivan; FT-Raman                                                                              |
| Razlučivanje                        | $< 8 \text{ cm}^{-1}$                                                                              | $> 4 \text{ cm}^{-1}$                                                                              |
| Omjer signala i šuma                | Vrlo visok                                                                                         | Visok                                                                                              |
| Metode interpretacije               | Multivarijatne metode; usporedba s bazama podataka                                                 | Omjer intenziteta signala; multivarijatne metode; usporedba s bazama podataka                      |
| Izvori zračenja                     | Laseri; štapić od silicijevog karbida (Globar); Nernstov štapić                                    | Laseri                                                                                             |
| Detektori                           | Jednokanalni: poluvodički detektori (Ge, InGaAs)<br>Višekanalni: CCD detektor, ploča s fotodiodama | Jednokanalni: poluvodički detektori (Ge, InGaAs)<br>Višekanalni: CCD detektor, ploča s fotodiodama |
| Vrste sonde                         | Transmisijska NIR sonda; ATR-NIR sonda                                                             | Ramanova sonda                                                                                     |
| Način spajanja sonde i spektrometra | Optička vlakna                                                                                     | Optička vlakna                                                                                     |
| Udaljenost sonde i spektrometra     | $< 100 \text{ m}$                                                                                  | $< 100 \text{ m}$                                                                                  |

### 2.4.1. NIR spektroskopija *in-line*

NIR spektroskopija *in-line* obuhvaća područje od  $12500\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ , gdje se pojavljuju vrpce viših tonova (harmonika) i kombinacijske vrpce. Koristi se za praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa te brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji sudjeluju u procesu.<sup>1,10</sup> Postoji u nekoliko izvedbi, od kojih se najviše primjenjuje transmisijaska NIR spektroskopija *in-line*. Navedenom tehnikom moguće je pratiti procese u realnom vremenu, pomoću sonde koja je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom.

Presjek transmisijske NIR sonde prikazan je na Slici 2.5. Infracrveno zračenje iz izvora prenosi se optičkim vlaknom do sustava leća te usmjerava prema uzorku gdje dolazi do njegove djelomične apsorpcije. Propušteno zračenje se zatim pomoću optičkog vlakna prenosi natrag do detektora. Safirni prozori i obloga od kemijski inertnog metala štite sondu od vanjskih utjecaja tijekom mjerenja *in situ*.



Slika 2.5. Presjek transmisijske NIR sonde.

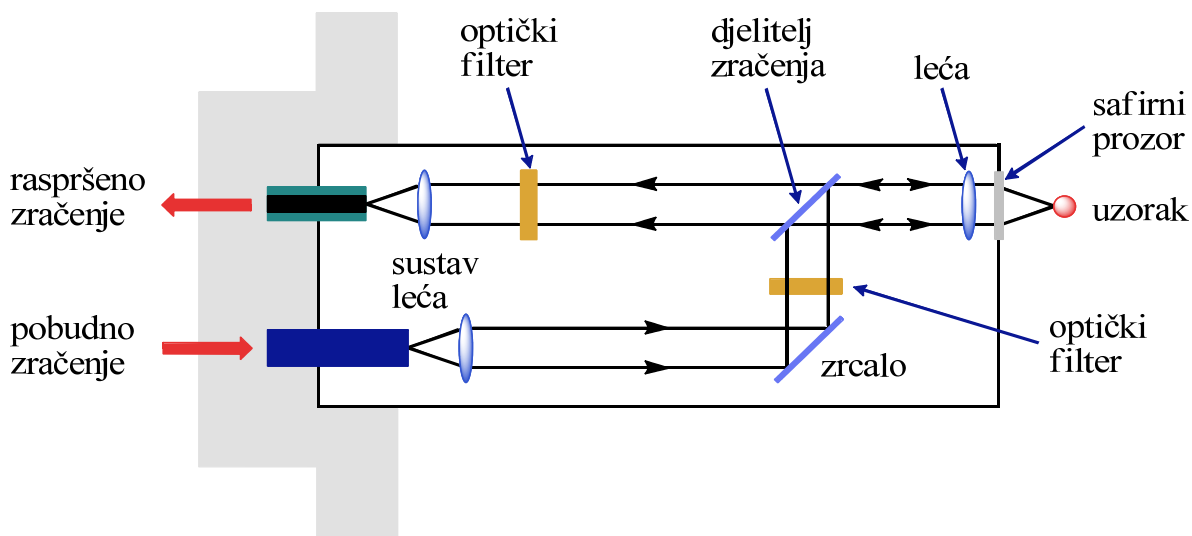
NIR spektri odlikuju se vrlo visokim omjerom signala i šuma, a intenzitet i položaj pojedinih vrpce može se vrlo točno odrediti, što je posebno važno za kvantitativnu analizu. Zbog slabe apsorpcije vode i stakla, moguće je snimanje spektara vodenih otopina uzoraka u staklenim tikvicama ili reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala.

Međutim, vrpce u NIR spektrima su manje informativne od vrpce koje se pojavljuju u MIR području, a u mnogim slučajevima dolazi i do njihovog preklapanja. Stoga se dobiveni podaci u pravilu obrađuju multivarijantnim metodama analize.

NIR spektroskopija *in-line* uspješno se primjenjuje za praćenje i kontrolu procesa proizvodnje polimera<sup>10</sup>, obrade mesnih prerađevina<sup>11</sup>, kemijskih reakcija<sup>12</sup> te pojedinih koraka prilikom razvoja lijekova.<sup>13-15</sup> Zbog velike točnosti, NIR spektroskopija *in-line* se može koristiti i za kvantitativnu analizu. U kombinaciji s multivarijantnim metodama analize podataka, ova tehnika se može primijeniti za određivanje sastava i fizičkih svojstava farmaceutskih pastila tijekom procesa proizvodnje te klasifikaciju uzoraka prema količini djelatne tvari.<sup>16,17</sup>

#### 2.4.2. Ramanova spektroskopija *in-line*

Vibracijska karakterizacija tvari koje sudjeluju u nekom fizičkom ili kemijskom procesu može se na robustan, jednostavan i siguran način izvoditi tehnikom Ramanove spektroskopije *in-line*, pomoću Ramanove sonde (Slika 2.6).<sup>2,7,18</sup>



Slika 2.6. Presjek Ramanove sonde.

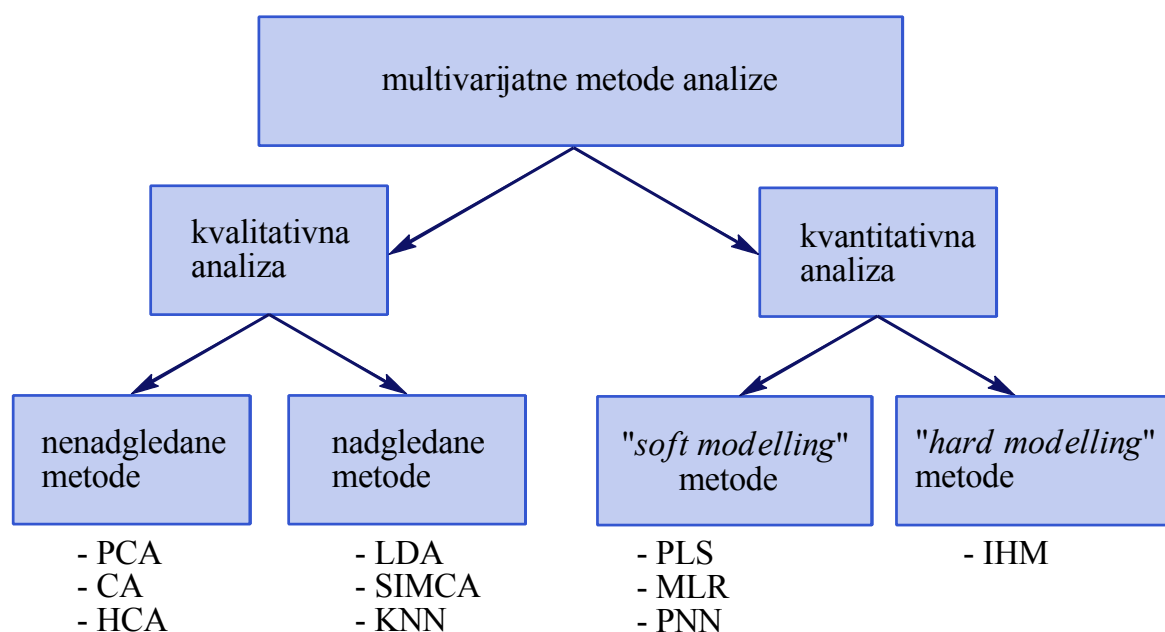
Grada procesne Ramanove sonde shematski je prikazana na Slici 2.6. Pobudno zračenje iz izvora prenosi se optičkim vlaknom te se pomoću sustava leća i zrcala usmjerava prema optičkom filtru koji propušta zračenje točno određene valne duljine. Dobiveno monokromatsko zračenje prolazi kroz djelatelj zračenja i leću te se djelomično raspršuje na uzorku. Raspršeno zračenje se zatim fokusira pomoću leće, prolazi kroz djelatelj zračenja i optički filter te usmjerava prema odgovarajućem optičkom vlaknu koje ga prenosi do detektora. Sonda je od vanjskih utjecaja zaštićena prozorom od safira ili kvarca te oblogom od kemijski inertne legure metala.

Ramanova spektroskopija *in-line* omogućava nedestruktivnu analizu *in situ* pomoću sonde. Široko spektralno područje i mogućnost snimanja u vodenim otopinama čine Ramanovu spektroskopiju *in-line* jednom od tehnika izbora za praćenje i kontrolu industrijskih procesa. Stoga ova tehnika pronalazi primjenu u biokemiji za praćenje kristalizacije enzima i reakcija kataliziranih pomoću enzima<sup>19,20</sup>, kemiji materijala<sup>21</sup> te industriji polimera za kontrolu procesa kristalizacije, otapanja i proizvodnje.<sup>22,23</sup> Nadalje, Ramanovom spektroskopijom *in-line* moguće je pratiti procese u farmaceutskoj industriji poput sinteze, kristalizacije, homogenizacije i granulacije djelatnih tvari.<sup>24-30</sup>

Najvažniji nedostaci Ramanove spektroskopije *in-line* su osjetljivost na nehomogenosti u uzorku zbog malog promjera laserske zrake te nizak omjer signala i šuma. Utjecaj nehomogenosti uzorka može se umanjiti postupkom osvjetljavanja na širokoj površini (engl. *wide area illumination*, WAI).<sup>31</sup> Zračenje se pritom fokusira pri većoj žarišnoj daljini na šire područje. Nadalje, omjer signala i šuma se može povećati primjenom pobudnog zračenja kraće valne duljine i veće snage. S druge strane, takvo zračenje može uzrokovati fluoresenciju i degradaciju uzorka. Danas postoje različite modifikacije ove spektroskopske tehnike kojima se navedeni učinci mogu umanjiti.<sup>2,7,31</sup>

## 2.5. Multivarijatne metode analize

Multivarijatne metode analize koriste se za dobivanje informacija iz eksperimentalnih podataka pomoću statističkih postupaka. Za razliku od univarijatnih metoda, koje uzimaju u obzir samo jednu varijablu, multivarijatnim metodama se istovremeno analiziraju podaci koji pripadaju različitim varijablama.<sup>32–34</sup> Multivarijatna analiza podataka može biti kvalitativna ili kvantitativna (Slika 2.7).



PCA: engl. *principal components analysis*  
CA: engl. *cluster analysis*  
HCA: engl. *hierarchial cluster analysis*  
LDA: engl. *linear discriminant analysis*  
SIMCA: engl. *soft independent modelling of class analogies*  
KNN: engl. *K-nearest neighbour*

PLS: engl. *partial least squares*  
MLR: engl. *multiple linear regression*  
PNN: engl. *probabilistic neural networks*  
IHM: engl. *indirect hard modelling*

Slika 2.7. Podjela multivarijatnih metoda analize.

Ciljevi kvalitativne multivarijatne analize su identifikacija sastojaka u uzorku, utvrđivanje razlika između pojedinih uzoraka te njihovo grupiranje. Postupak identifikacije uključuje klasifikaciju sastojaka prema vrijednostima mjerenih varijabli. Za klasifikaciju se mogu primijeniti nenadgledane i nadgledane metode. Nenadgledane metode grupiraju uzorke i klasificiraju njihove sastojke bez prethodnog znanja o sustavu ili procesu, dok nadgledane metode u tu svrhu koriste model dobiven na temelju analize poznatih uzoraka.

Količina pojedinih sastojaka u uzorku može se odrediti metodama kvantitativne multivarijatne analize. Za utvrđivanje egzaktnog kvantitativnog odnosa između količine sastojka i mjerenih varijabli potrebna je izrada kalibracijskog modela. Kalibracijski model može biti linearan ili nelinearan, a konstruira se na temelju vrijednosti dobivenih analizom uzoraka poznatih koncentracija. Dobivene vrijednosti se mogu obraditi tzv. "*soft modelling*" ili "*hard modelling*" metodama (Slika 2.7). "*Soft modelling*" metode obrađuju podatke kao vektore i matrice ne uzimajući u obzir funkcijski oblik signala. S druge strane, "*hard modelling*" metode prikazuju dobivene podatke kao linearnu kombinaciju funkcija koje odgovaraju signalima pojedinih sastojaka.<sup>35,36</sup>

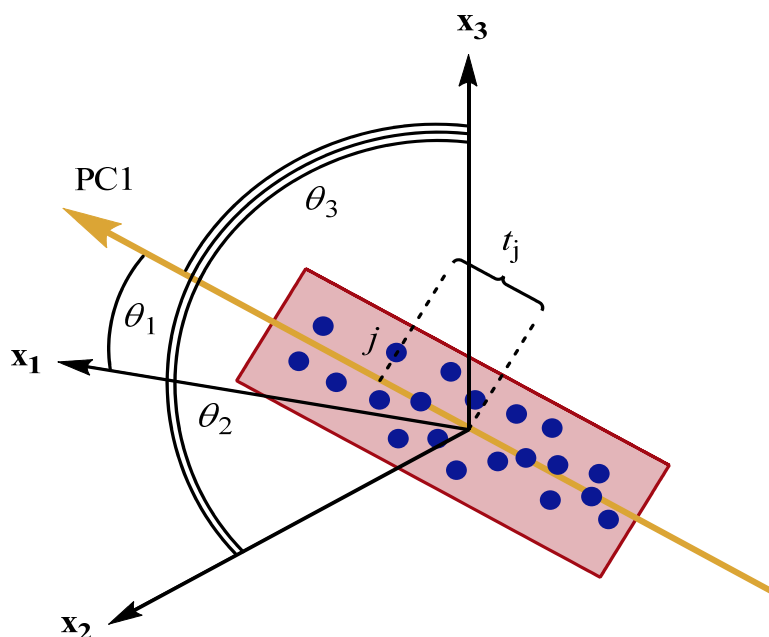
Multivarijatnom analizom vibracijskih spektara *in-line* mogu se nedvojbeno asignirati karakteristične vibracijske vrpce te dobiti kvalitativni i kvantitativni podaci o pojedinim komponentama u uzorku. Nadalje, primjenom multivarijatnih metoda moguće je detektirati i okarakterizirati pogreške u kalibraciji instrumenta, analitičkom postupku i dinamici procesa.<sup>1</sup> Otklanjanjem uzroka navedenih pogrešaka optimiraju se procesni parametri te osigurava kvaliteta konačnog proizvoda.

Za statističku interpretaciju NIR i Ramanovih spektara *in-line* u ovoj disertaciji su korištene sljedeće metode:

- Analiza glavnih komponenti (engl. *principal components analysis*, PCA)
- Neizravno tvrdo modeliranje (engl. *indirect hard modelling*, IHM)

### 2.5.1. Metoda PCA

Metoda PCA omogućava kvalitativnu analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Koristi se i za brzu procjenu strukture podataka prije detaljne analize ili kvantifikacije fizičkog ili kemijskog procesa. Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u  $n$ -dimenzijskom prostoru gdje svaki vektor  $\mathbf{x}_i$  predstavlja određenu varijablu  $i$ . Uvođenjem glavnih komponenti (engl. *principal components*, PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavljuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3,...). Glavne komponente su međusobno ortogonalne. Udaljenost  $t_j$  projekcije točke  $j$  na glavnu komponentu od ishodišta koordinatnog sustava (Slika 2.8) odgovara vrijednosti tzv. faktorskog boda (engl. *score*) za podatak  $j$ . Korelacija između originalnih varijabli i glavnih komponenti može se opisati tzv. opterećenjem (eng. *loading*), što predstavlja kosinus kuta  $\theta_i$  između vektora glavne komponente i vektora  $\mathbf{x}_i$  pridruženog varijabli  $i$ .

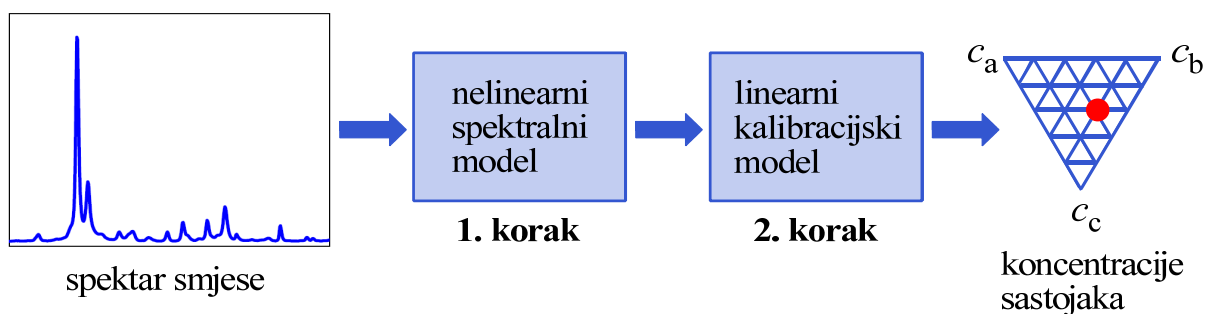


Slika 2.8. Prva glavna komponenta (PC1) u trodimenzijskom prostoru, odgovarajući faktorski bod  $t_j$  za točku  $j$  te kutevi između PC1 i vektora  $\mathbf{x}_1$ ,  $\mathbf{x}_2$  i  $\mathbf{x}_3$ .

Statistički podaci dobiveni metodom PCA mogu se vizualizirati pomoću tzv. faktorskih bodova (eng. *score plots*). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava i njihovo grupiranje. Metoda PCA se može primijeniti za obradu podataka dobivenih NIR i Ramanovom spektroskopijom *in-line*, primjerice prilikom sinteze i kristalizacije djelatnih tvari.<sup>24,29,37</sup> Na taj način dobiva se potpuniji uvid u tijek proučavanog procesa, kao i procjena njegovog trajanja.

### 2.5.2. Metoda IHM

Koncentracije pojedinih sastojaka koji sudjeluju u procesu mogu se odrediti na temelju promjena u intenzitetu ili položaju karakterističnih *in-line* vibracijskih vrpce.<sup>5,35,36</sup> Međutim, preklapanje vrpce te pojava nelinearnih efekata u spektrima može otežati kvantitativnu analizu. U takvim slučajevima se za točno predviđanje sastava smjese koristi metoda IHM. Postupak analize ovom metodom sastoji se od dva koraka (Slika 2.9).



Slika 2.9. Postupak analize metodom IHM.

Prvi korak započinje izradom nelinearnih modela spektara čistih sastojaka. Oblik pojedine vrpce u spektru čistog sastojka može se opisati Voigtovom funkcijom:

$$V(\nu, \alpha, \beta, \gamma, \omega) = \beta \alpha \exp \left[ -\frac{4 \ln 2 (\nu - \omega)^2}{\gamma^2} \right] + (1 - \beta) \alpha \frac{\gamma^2}{(\nu - \omega)^2 + \gamma^2} \quad (2.8.)$$

pri čemu je  $\nu$  valni broj,  $\beta$  težinski koeficijent, dok su  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\omega$  visina, širina i položaj vrpce.

Model spektra čistog sastojka  $A^P$  odgovara zbroju  $n$  Voigtovih funkcija  $V_i$ :

$$A^P(\nu, \theta_P) = \sum_{i=1}^n V_i(\nu, \alpha_i, \beta_i, \gamma_i, \omega_i) \quad (2.9.)$$

gdje vektor  $\theta_P$  obuhvaća sve individualne parametre  $(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i, \omega_i)$ .

Model spektra smjese dobiva se linearnom kombinacijom  $m$  srednjih vrijednosti modela spektara čistih sastojaka  $\bar{A}_j^P$  i funkcije bazne linije  $B$  određene valnim brojem  $\nu$  i parametrima  $\theta_B$ :

$$A^P(\nu, \theta) = B(\nu, \theta_B) + \sum_{j=1}^m t_j \bar{A}_j^P(\nu, \theta_{P,j}) \quad (2.10.)$$

Udjeli sastojaka u smjesi opisani su njihovim težinskim koeficijentima  $t_j$  čije se vrijednosti optimiraju nelinearnom metodom najmanjih kvadrata.

Drugi korak obuhvaća izradu linearnog kalibracijskog modela s odgovarajućim težinskim  $(t_i, t_j)$  odnosno kalibracijskim  $(K_{ij})$  koeficijentima:

$$\frac{t_i}{t_j} = K_{ij} \frac{c_i}{c_j}, \quad i, j \in \{1, \dots, n\} \quad (2.11.)$$

Iz linearnog kalibracijskog modela dobiva se procjena koncentracija sastojaka  $(c_i, c_j)$  u uzorku.

Metoda IHM koristi kombinaciju "*hard modelling*" postupka i metode najmanjih kvadrata za kvantitativnu obradu podataka dobivenih vibracijskom spektroskopijom *in-line*. Omogućava preciznu asignaciju spektara bez obzira na preklapanje vrpce i nizak omjer signala i šuma, učinkovitu korekciju nelinearnih efekata u spektrima, ekstrapolaciju podataka izvan područja dobivenog kalibracijskim modelom te brzo i objektivno predviđanje koncentracija pojedinih sastojaka u smjesi. Najznačajnija ograničenja ove metode su potreba za poznavanjem spektara čistih sastojaka te velik broj parametara koje je potrebno optimirati. Danas postoje modifikacije metode IHM koje korištenjem posebnih matematičkih postupaka prepoznaju parametre ovisne o molekulskim interakcijama te tako smanjuju njihov broj, a time i ukupno trajanje analize.

## 2.6. Spektroskopija NMR

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) temelji se na interakciji uzorka s elektromagnetnim zračenjem u rasponu frekvencija od 100 MHz do 1 GHz, odnosno valnih duljina od 300 cm do 30 cm, što odgovara radiovalnom području spektra.<sup>38,39</sup> Do apsorpcije radiovalova dolazi ako se u uzorku nalaze jezgre čiji je spin različit od nule, primjerice  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$  ili  $^{15}\text{N}$ .

Jezgra posjeduje dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina  $I$  koji može biti cijeli ili polucijeli broj (npr. 0, 1/2, 1, 3/2) te nuklearni magnetni spinski kvantni broj  $m_I$  koji govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetnom polju. Broj mogućih orijentacija iznosi  $2I + 1$ . Kvantni broj nuklearnog spina određuje iznos vektora spinske kutne količine gibanja,  $P$ :

$$P = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (2.12.)$$

dok je s kvantnim brojem  $m_I$  povezana z komponenta vektora kutne količine gibanja:

$$P_z = m_I \hbar \quad (2.13.)$$

Stoga se magnetni moment ( $\mu$ ) određene jezgre može izraziti kao:

$$\mu = \gamma P \quad (2.14.)$$

pri čemu  $\gamma$  označava magnetožirni omjer koji je karakteristika pojedine jezgre.

Energija interakcije magnetnog momenta s magnetnim poljem  $\mathbf{B}$  iznosi:

$$E = -\mu \cdot \mathbf{B} \quad (2.15.)$$

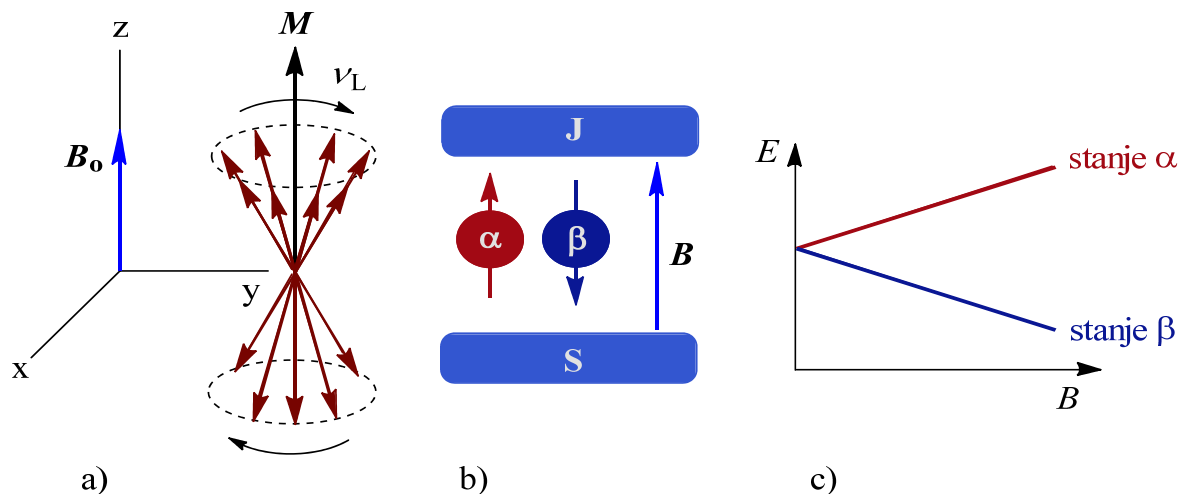
Za prijelaz iz stanja  $m_I$  u stanje  $m_{I+1}$  potrebna je energija fotona koja mora biti jednaka razlici energija između dvaju spinskih stanja:

$$\Delta E = E(m_{I+1}) - E(m_I) = h\nu_L = h\nu_{\text{fotona}} = E_{\text{fotona}} \quad (2.16.)$$

Frekvencija fotona ( $\nu_{\text{fotona}}$ ) je pritom jednaka Larmorovoj frekvenciji ( $\nu_L$ ), odnosno frekvenciji precesije spinova jezgri oko vektora vanjskog magnetnog polja ( $\mathbf{B}_0$ ), pa dolazi do rezonancije:

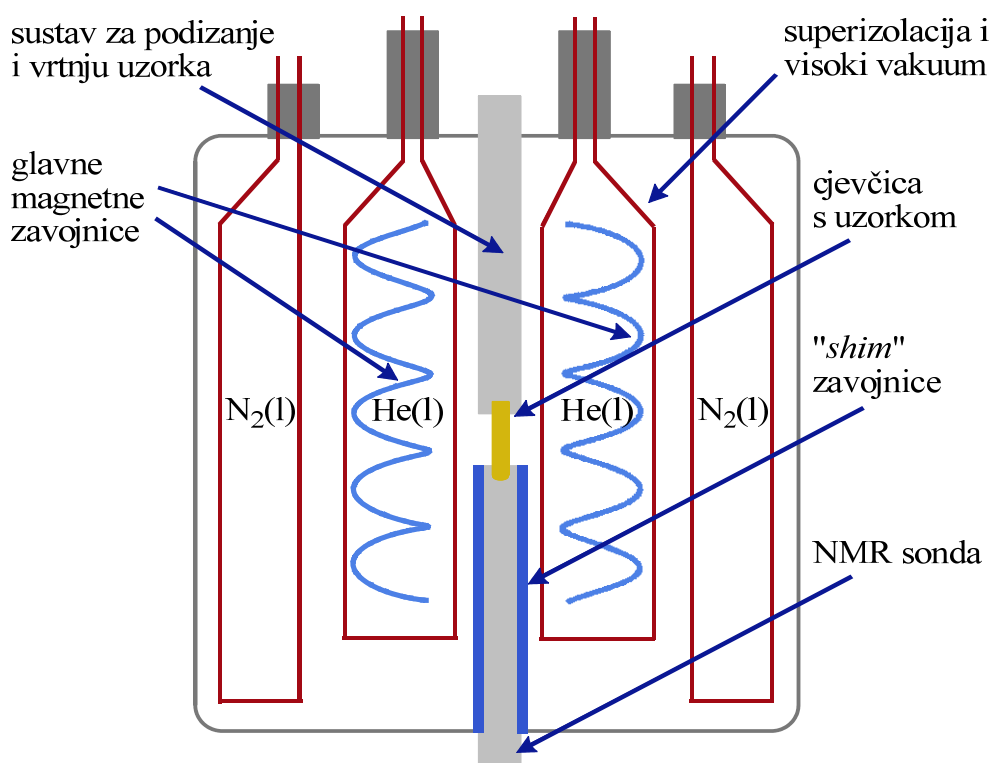
$$\nu_{\text{fotona}} = \nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.17.)$$

Poznato je više modela kojima se može objasniti efekt NMR. Najjednostavniji je vektorski model koji se temelji na vektorskom prikazu spinova u dogovorno odabranom koordinatnom sustavu. Vanjsko magnetno polje  $\mathbf{B}_0$  je vektor koji prema dogovoru ima smjer osi +z. Spinovi precesiraju oko vanjskog magnetnog polja Larmorovom frekvencijom ( $\nu_L$ ), a mogu zauzeti različita spinska stanja koja se razlikuju u energiji (Slika 2.10). U slučaju protona ili neke druge jezgre koja ima spin  $I = 1/2$ , spin orijentiran u smjeru magnetnog polja (stanje  $\alpha$ ) ima nižu energiju od onog u suprotnom smjeru (stanje  $\beta$ ). Razlika u energiji dvaju stanja, a time i osjetljivost spektroskopije NMR proporcionalna je jakosti primijenjenog magnetnog polja  $B_0$ . Prema Boltzmannovoj funkciji raspodjele, stanje niže energije ima veću napučenost. Razlika u napučenosti između ovih dvaju stanja kod protona je vrlo mala (otprilike jedan na milijun), ali dovoljna da vektor ukupne magnetizacije ima smjer osi +z.



Slika 2.10. Spinovi protona u vanjskom magnetnom polju  $\mathbf{B}_0$ : a) precesija spinova; b) orijentacija spinova (S - sjever, J - jug); c) ovisnost razlike energije stanja  $\alpha$  i  $\beta$  o jakosti magnetnog polja.

Da bi se postigao efekt NMR i snimio spektar analiziranog spoja, cjevčica s uzorkom se postavlja na NMR sondu smještenu u središnjem otvoru magneta NMR spektrometra (Slika 2.11). Cjevčica s uzorkom je povezana sa sustavom za podizanje i vrtnju uzorka. Oko NMR sonde nalaze se tzv. "shim" zavojnice za podešavanje homogenosti polja. Glavne magnetne zavojnice koriste se za generiranje vanjskog magnetnog polja  $B_0$ . Izrađene su od supravodljivog materijala i smještene u spremnik s tekućim helijem pri temperaturi od približno 4 K. Spremnik je okružen tekućim dušikom i sustavom za izolaciju koji se nalazi pod sniženim tlakom.



Slika 2.11. Unutrašnjost magneta NMR spektrometra.

Spektroskopija NMR koristi se za određivanje strukture i konformacije organskih, anorganskih i bioloških molekula u otopini i u čvrstom stanju.<sup>40–42</sup> Strukture malih organskih molekula nerijetko se mogu odrediti samo analizom njihovih spektara NMR. Nadalje, spektroskopijom NMR mogu se proučavati intra- i inter-molekulske interakcije<sup>43</sup>, deuterijski izotopni efekti<sup>44</sup> i tautomerne ravnoteže<sup>45</sup> u biološki aktivnim molekulama.

## 2.7. Tehnika SWAXS

Tehnika SWAXS (engl. *small and wide angle X-ray scattering*) upotrebljava dva neovisna detektora koji istovremeno prikupljaju raspršeno rentgensko zračenje s istog uzorka pod malim (SAXS) i velikim (WAXS) kutom.<sup>46</sup> Na temelju analize SAXS odnosno WAXS spektara mogu se dobiti podaci o strukturi polikristalnog uzorka.

Signali u SAXS spektru rezultat su razlika u elektronskoj gustoći unutar uzorka. Razlike u elektronskoj gustoći pojavljuju se na granici faza, primjerice na međupovršini između čvrste tvari i zraka. Granična vrijednost intenziteta raspršenog zračenja  $I(q)$  pri velikim  $q$ -vrijednostima proporcionalna je funkciji međupovršine između dviju faza  $k$ , a obrnuto proporcionalna  $q$ -vrijednosti:

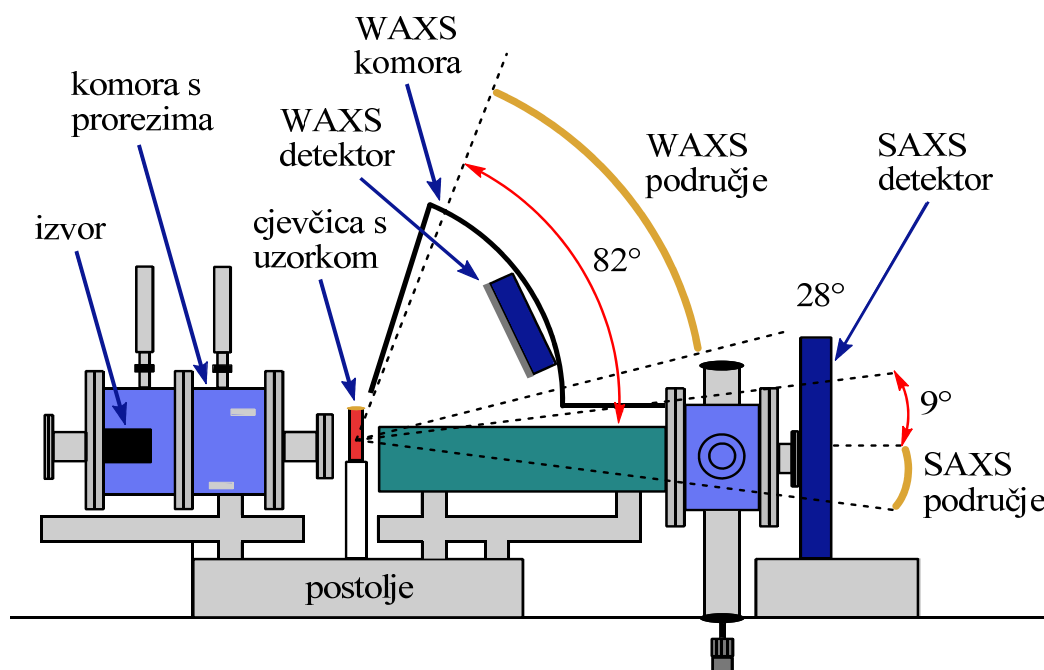
$$\lim_{q \rightarrow \infty} I(q) = \frac{k}{q^4} \quad (2.18.)$$

pri čemu  $q$ -vrijednost odgovara iznosu vektora raspršenja, a može se izraziti preko kuta raspršenja  $\theta$  i valne duljine raspršenog zračenja  $\lambda$ :

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (2.19.)$$

S druge strane, položaj i intenzitet signala u WAXS spektru određen je razmještajem atoma u kristalnoj strukturi. WAXS spektar odgovara "otisku prsta" polikristalnog uzorka, a može ukazati na promjene u kristalnom sastavu i strukturi nastale tijekom proučavanog procesa te na prisutnost različitih polimorfni formi.

SWAXS instrument shematski je prikazan na Slici 2.12. Rentgensko zračenje iz izvora prolazi kroz komoru s prorezima te se u uskom snopu usmjerava prema cjevčici s uzorkom. Uslijed interakcije s uzorkom zračenje se raspršuje pod malim ( $0,06^\circ < 2\theta < 9^\circ$ ) i velikim ( $28^\circ < 2\theta < 82^\circ$ ) kutevima te se istovremeno detektira pomoću SAXS odnosno WAXS detektora.

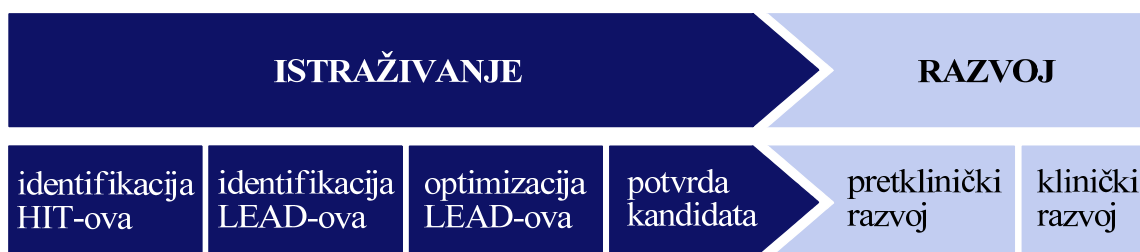


Slika 2.12. Shematski prikaz SWAXS instrumenta.

Tehnika SWAXS primjenjuje se u farmaceutskoj industriji za procjenu sastava djelatnih tvari<sup>47</sup>, istraživanje utjecaja procesnih parametara na strukturu polikristalnih uzoraka, granula i tableta<sup>48</sup> te za proučavanje interakcija membrana s biološki aktivnim tvarima.<sup>49–51</sup>

## 2.8. Istraživanje i razvoj farmaceutskog proizvoda

U farmaceutskoj industriji se u svrhu dobivanja djelatne tvari s optimalnim svojstvima koristi proces koji se vremenski može podijeliti na fazu istraživanja i fazu razvoja (Slika 2.13).<sup>52</sup>



Slika 2.13. Faze istraživanja i razvoja farmaceutskog proizvoda.

### 2.8.1. Istraživanje

U fazi istraživanja sintetiziraju se molekule koje bi mogle biti učinkovite za liječenje određene bolesti. Testira se njihovo vezanje na ciljanu molekulu te utjecaj na njezinu aktivnost. Ponekad se uzimaju u obzir i ostali parametri, primjerice selektivnost. Molekule kandidati sa specifičnom aktivnošću za određeno terapijsko djelovanje nazivaju se molekule hitovi (Slika 2.13). Trodimenzijska struktura molekula hitova modificira se radi postizanja što boljih fizičko-kemijskih svojstava, kao što su topljivost, permeabilnost, lipofilnost, koeficijent razdjeljenja i sl. Važnu ulogu u istraživanjima ima proučavanje odnosa između strukture i aktivnosti (engl. *structure-activity relationship*, SAR). Molekule koje pokazuju obećavajuća svojstva u svim značajkama identificiraju se kao molekule leadovi. Odabranim molekulama leadovima optimira se *in vitro* učinkovitost te predviđa bioraspoloživost i doziranje. U tu svrhu koristi se iterativni ciklus koji uključuje dizajn, sintezu i probir potencijalnih djelatnih tvari s najboljim svojstvima. Dizajn se može temeljiti na određivanju trodimenzijske strukture i oblika aktivnih mjesta makromolekulskih receptora (engl. *structure-based drug design*, SBDD) ili na identifikaciji strukturnih elemenata i funkcijskih skupina liganada (molekula leadova) odgovornih za biološku aktivnost.<sup>43</sup> Faza istraživanja završava potvrdom kandidata koji se dalje testiraju u prekliničkoj i kliničkoj fazi razvoja.

### 2.8.2. Razvoj

Proces razvoja farmaceutskog proizvoda se može podijeliti na prekliničku i kliničku fazu (Tablica 2.2). U prekliničkom razvoju naglasak je na istraživanju apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije i toksičnosti (ADMET) djelatne tvari u živom organizmu. Preklinička ispitivanja *in vivo* se u pravilu provode na laboratorijskim životinjama. Da bi se dobila najbolja procjena učinkovitosti, toksičnosti i reproduktivne toksičnosti, bioraspoloživost djelatne tvari prilikom ispitivanja treba biti maksimalna. Na kraju faze donosi se odluka u kojoj se čvrstoj formi djelatna tvar treba razvijati.

Klinički razvoj započinje testiranjem proizvoda na zdravim volonterima, a zatim na maloj, odnosno velikoj skupini pacijenata. Proučava se dugoročna toksičnost, farmakokinetika, farmakodinamika, efikasnost i doziranje. Poseban značaj u ovoj fazi ima praćenje procesa sinteze i kristalizacije djelatnih tvari tehnikama vibracijske spektroskopije *in-line*.

Tablica 2.2. Proces razvoja lijeka s aktivnostima vezanima uz pojedinu fazu.<sup>52</sup>

| Pretklinički razvoj                                               | Klinički razvoj                                                                              |                                                  |                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Faza 0                                                            | Faza I                                                                                       | Faza II                                          | Faza III                                                                        |
| ADMET ispitivanja <i>in vivo</i> , na laboratorijskim životinjama | Prva testiranja u ljudskom organizmu; farmakokinetika; farmakodinamika; dugoročna toksičnost | Efikasnost; doziranje; razvoj i kontrola procesa | Usporedba efikasnosti i sigurnosti u odnosu na standarde; registracija podataka |

## 2.9. Kristalizacija

Kristalizacija je prijelaz tvari iz neuređenog stanja u otopini, talini ili plinu u uređeno kristalno stanje s periodičnim trodimenzijskim rasporedom atoma.<sup>3,53</sup> Postupak dobivanja kristala iz otopine može se podijeliti na tri osnovna koraka:

- pripravu prezasićene otopine
- nukleaciju
- rast kristala i nastajanje kristalnog taloga

### 2.9.1. Priprava prezasićene otopine

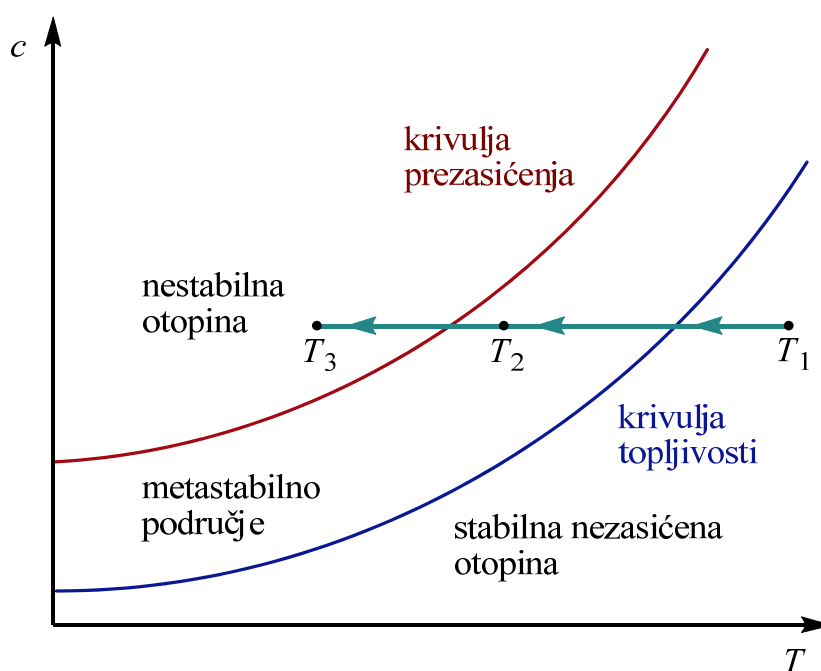
Nastanak kristala u otopini uvjetovan je postizanjem prezasićenosti  $P$ , koja je definirana kao razlika trenutne koncentracije  $c_A$  otopljene tvari A i njezine topljivosti  $c_A^*$ :

$$P = \frac{c_A - c_A^*}{c_A^*} \quad (2.20.)$$

Prezasićenost je mjera termodinamičke pokretačke sile potrebne za nastanak kristala. U idealnim otopinama ( $\gamma_A \approx \gamma_A^*$ ) prezasićenost je ekvivalentna razlici kemijskih potencijala otopine i kristala  $\Delta\mu$  pri temperaturi  $T$ :

$$\Delta\mu = RT \ln \frac{\gamma_A c_A}{\gamma_A^* c_A^*} \approx RT \ln \frac{c_A}{c_A^*} \approx RT \ln(1 + P) \quad (2.21.)$$

Prezasićena otopina može se pripremiti hlađenjem, ispravljanjem otapala, taložnom reakcijom ili mijenjanjem sastava smjese otapala. Hlađenje je jedna od najčešćih metoda pripreve prezasićene otopine. Hlađenjem stabilne nezasićene otopine temperature  $T_1$  na temperaturu  $T_2$  prelazi se krivulja topljivosti i ulazi u metastabilno područje (Slika 2.14). Otopina u metastabilnom području postaje prezasićena te može započeti proces nukleacije, odnosno nastanak kristalnih jezgri. Prelaskom granice metastabilnog područja (temperatura  $T_3$ ) otopina postaje nestabilna što uzrokuje gotovo trenutnu kristalizaciju otopljenе tvari.



Slika 2.14. Priprava prezasićene otopine hlađenjem.

### 2.9.2. Nukleacija

Nukleacija je prvi i energetski najnepovoljniji korak u procesu nastanka kristala, a uključuje nastanak kristalnih jezgri u dobivenoj prezasićenoj otopini. Prema mehanizmu, razlikujemo homogenu i heterogenu nukleaciju. Homogena nukleacija uzrokovana je spontanim promjenama gustoće otopine koje omogućuju nastanak stabilne čvrste faze. S druge strane, u heterogenoj nukleaciji sudjeluju strane čvrste čestice prisutne na stijenkama posude ili u otopini. Heterogena nukleacija je energetski povoljnija te predstavlja dominantan mehanizam nukleacije u većini industrijskih procesa. Brzina heterogene nukleacije  $J$  može se izraziti kao:

$$J = N_o \nu \exp \left( \frac{-\Delta G^* \Phi}{kT} \right) \quad (2.22.)$$

gdje je  $N_o$  broj molekula otopljene tvari,  $\nu$  brzina prijenosa molekula otopljene tvari prema međupovršini,  $\Delta G^*$  slobodna Gibbsova energija potrebna za nastanak jezgre sfernog oblika, a  $\Phi$  funkcija kontaktnog kuta između otapala i čvrste čestice.

### 2.9.3. Rast kristala i nastanak kristalnog taloga

Kristalne jezgre nastale nukleacijom rastu uslijed taloženja drugih čestica. Rast kristala u otopini se može opisati linearnom brzinom rasta kristala  $R$ , odnosno promjenom dimenzije kristala  $x$  u određenom vremenskom intervalu  $t$ :

$$R = \frac{dx}{dt} = k \frac{(\Delta\mu)^n}{\gamma} \quad (2.23.)$$

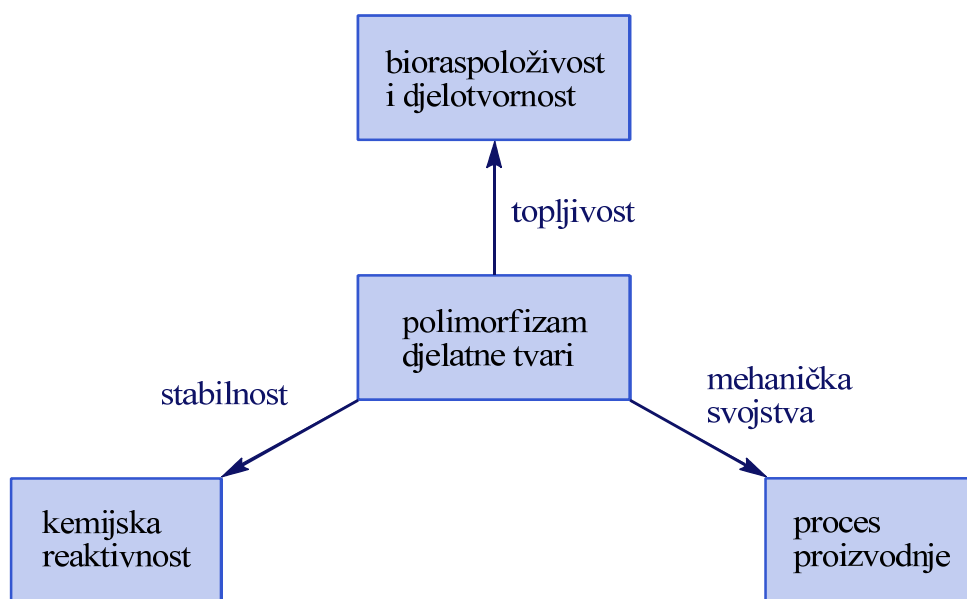
pri čemu je  $\gamma$  aktivnosni koeficijent,  $\Delta\mu$  razlika u kemijskim potencijalima otopine i kristala, dok su  $k$  i  $n$  konstante koje ovise o procesnim parametrima i mehanizmu rasta kristala.

Veličina čestica kristalnog taloga ovisi o broju nastalih jezgri, odnosno brzini nukleacije. Manja brzina nukleacije uzrokuje nastanak manjeg broja jezgri i rast krupnozrnatog kristalnog taloga. Međutim, ako je proces nukleacije brži, u otopini se povećava broj kristalnih jezgri što pospješuje rast sitnozrnatog taloga.

## 2.10. Polimorfizam

Polimorfizam je pojava iste tvari u dva ili više kristalografskih oblika, odnosno polimorfa.<sup>51</sup> Polimorfi mogu imati različitu gustoću, talište, topljivost, stabilnost, morfologiju, i bioraspoloživost. Razlikujemo "prave" polimorfe, solvate (hidrate), konformacijske polimorfe i dezmotrope. "Pravi" polimorfi imaju jednaku molekulsku, a različitu kristalnu strukturu, dok se u strukturi solvata nalaze molekule otapala. Ako su u kristalnu strukturu ugrađene molekule vode, riječ je o hidratima. Konformacijski polimorfi građeni su od molekula različite konformacije u čvrstom stanju, dok dezmotropi sadrže istu tvar u različitim tautomernim oblicima.

Velik broj djelatnih tvari u čvrstom stanju se pojavljuje u različitim polimorfnim oblicima. Polimorfi iste djelatne tvari mogu imati različit utjecaj na svojstva i proces proizvodnje lijeka (Slika 2.15).



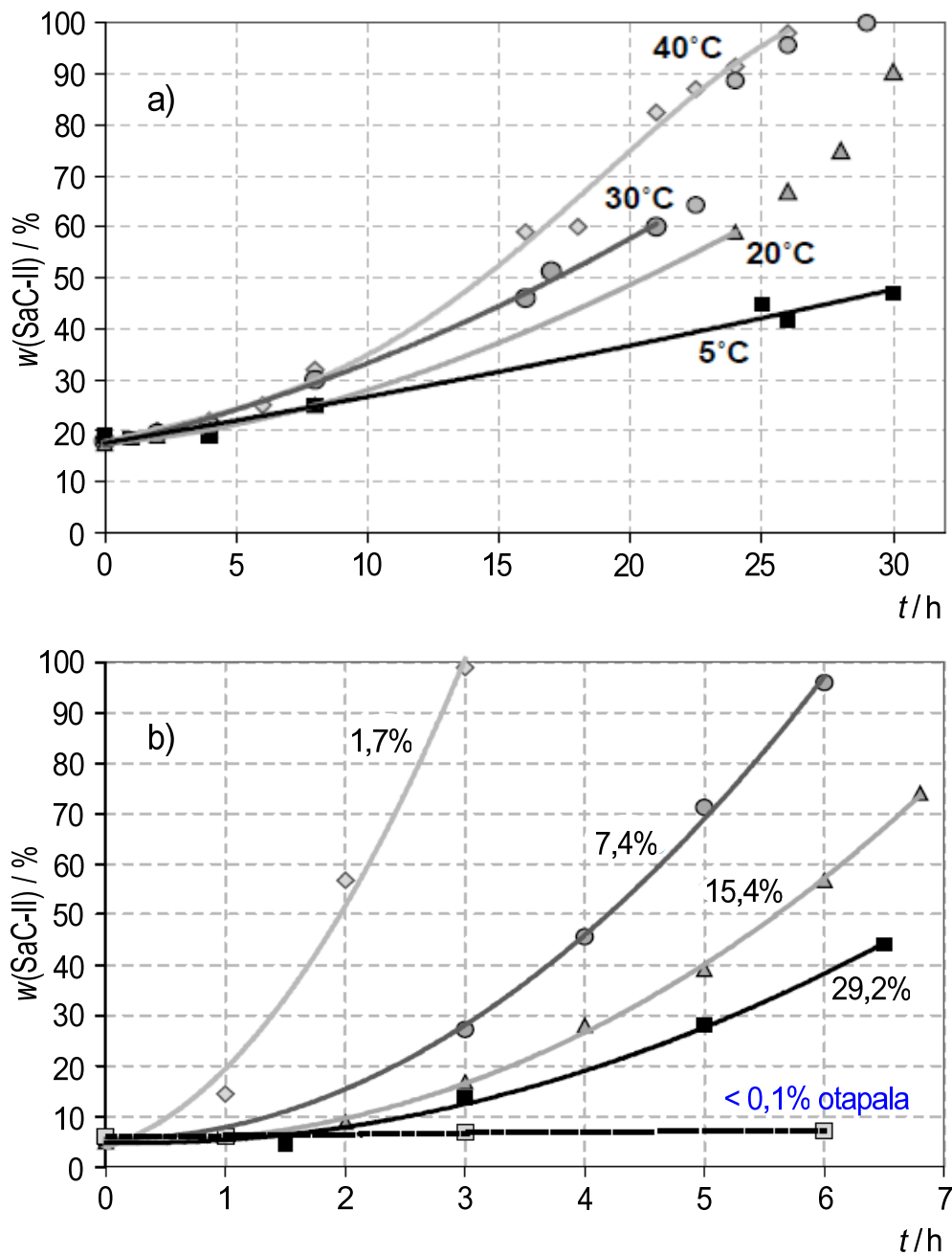
Slika 2.15. Utjecaj polimorfizma djelatne tvari na svojstva i proizvodnju farmaceutskog proizvoda.

Kemijska reaktivnost lijeka posljedica je kinetičke i termodinamičke stabilnosti polimorfa.<sup>54,55</sup> Nadalje, razlika u topljivosti polimorfa utječe na bioraspoloživost i djelotvornost lijeka. Primjena neodgovarajućeg polimorfa djelatne tvari može uzrokovati njezinu nedjelotvornost, slabiju djelotvornost ili toksičnost. Odabir polimorfa temelji se i na njegovim mehaničkim svojstvima, poput higroskopnosti, veličine, tvrdoće i oblika kristala. Zbog svih navedenih čimbenika, proces proizvodnje je potrebno usmjeriti prema farmaceutski najzanimljivijem polimorfnom obliku.

Kristalizacija iz otopine je jedna od uobičajenih metoda dobivanja polimorfa. Polimorfni sastav dobivenih kristala ovisi o njihovoj kinetičkoj i termodinamičkoj stabilnosti, korištenom otapalu, temperaturi i brzini kristalizacije. Tehnike vibracijske spektroskopije *in-line* omogućuju učinkovitu kontrolu i podešavanje navedenih parametara u realnom vremenu. Na taj način može se povećati selektivnost procesa kristalizacije te dobiti polimorf s optimalnim biološkim, fizičkim i kemijskim svojstvima.<sup>56–59</sup>

### 2.10.1. Primjena NIR spektroskopije *in-line* za proučavanje polimorfizma

Polimorfni sastav kristalizacijske smjese može se procijeniti na temelju analize NIR spektara *in-line*. Visoki omjer signala i šuma te mogućnost točnog određivanja položaja i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpca čine NIR spektroskopiju *in-line* jednom od tehnika izbora za kvantitativno *in situ* praćenje procesa kristalizacije i polimorfnih prijelaza. Stoga je NIR spektroskopija *in-line* u kombinaciji s multivarijantnim metodama analize korištena za proučavanje kinetike polimorfnog prijelaza djelatne tvari SaC tijekom kristalizacije u acetonu.<sup>60</sup> Djelatna tvar SaC zaštićena je patentom, a pojavljuje se u dva polimorfna oblika: SaC-I i SaC-II. Polimorfni oblik SaC-I postupno prelazi u termodinamički stabilniji oblik SaC-II u smjesama različitih temperatura i udjela vlage (Slika 2.16). Udio pojedinog polimorfa u smjesi određen je na temelju statističke analize karakterističnih NIR vrpca *in-line*.



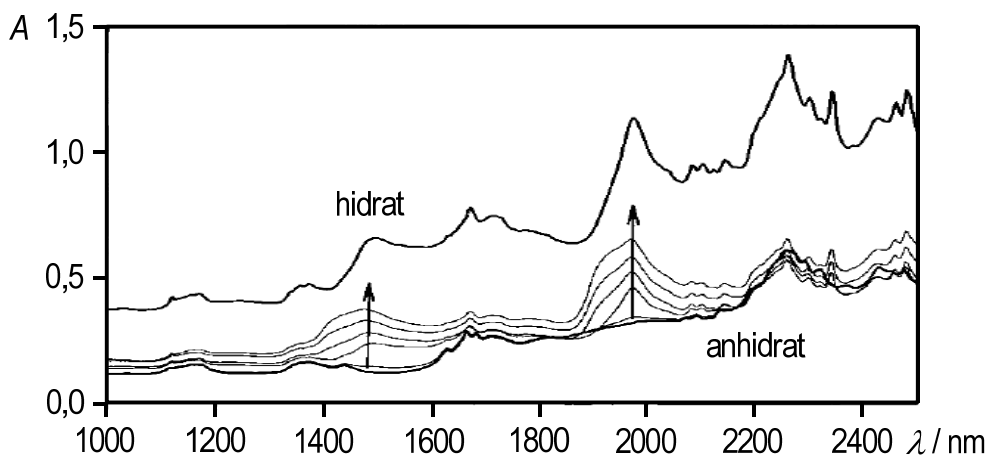
Slika 2.16. Vremenska ovisnost masenog udjela ( $w$ ) polimorfa SaC-IIu smjesama različitih  
a) temperatura; b) udjela vlage (pri 20 °C).<sup>60</sup>

Preduvjet za kvantitativnu analizu bila je konstrukcija baždarnih pravaca za polimorfe SaC-I i SaC-II prema sljedećim koracima:

- Snimanje referentnih NIR spektara *in-line* reprezentativnih uzoraka koji sadrže polimorfe SaC-I i SaC-II u određenim omjerima
- Povezivanje vrpci u referentnim spektrima polimorfa s njihovim udjelima u smjesi
- Validacija dobivenih podataka korištenjem referentnih *off-line* analitičkih tehnika, poput kromatografije, diferencijalne pretražne kalorimetrije i sl.

Pomoću navedenog modela procijenjen je polimorfni sastav smjese tijekom procesa kristalizacije u acetonu pri različitim temperaturama i udjelima vlage (Slika 2.16).

Podaci prikazani na Slici 2.16. ukazali su na postupni prijelaz iz polimorfnog oblika SaC-I u termodinamički stabilniji oblik SaC-II. Iz dobivenih krivulja zaključeno je da brzina prijelaza raste proporcionalno s temperaturom kristalizacijske smjese. S druge strane, brzina nastanka oblika SaC-II smanjuje se s povećanjem udjela vlage u smjesi. Izostanak polimorfnog prijelaza tijekom procesa kristalizacije prikazanog crtkanom linijom (Slika 2.16) uzrokovan je nedostatkom otapala. Dobiveni rezultati objašnjeni su modelom faznog prijelaza uz posredovanje otapala koji je posljedica različite topljivosti djelatne tvari SaC u vodi odnosno acetonu.



Slika 2.17. NIR spektri *in-line* prelaska teofilina iz anhidratnog u hidratni oblik.<sup>61</sup>

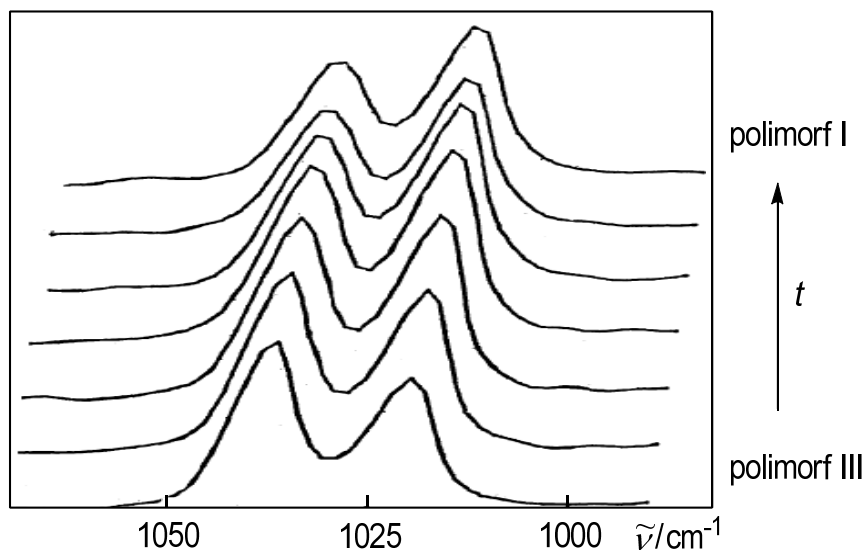
Na sličan način određen je sastav smjese pseudopolimorfa djelatne tvari teofilina tijekom procesa tabletiranja.<sup>61</sup> Promjene u intenzitetu i položaju NIR *in-line* vibracijskih vrpce omogućile su praćenje prijelaza teofilina iz anhidratnog u hidratni oblik (Slika 2.17). Sastav i struktura dobivenih kristala određeni su *off-line* tehnikama rentgenske difrakcije na prahu i diferencijalne pretražne kalorimetrije.

### 2.10.2. Primjena Ramanove spektroskopije *in-line* za proučavanje polimorfizma

Ramanova spektroskopija *in-line* može se koristiti za *in situ* praćenje polimorfnog prijelaza uz istodobnu identifikaciju polimorfa djelatne tvari, primjerice karbamazepina.<sup>62</sup> Karbamazepin je lijek protiv epilepsije, a pojavljuje se u četiri polimorfna oblika te kao dihidrat. Najzastupljeniji su polimorfni oblici I i III, koji čine enantiotropni par. Pri nižim temperaturama stabilniji je polimorf III, dok je pri višim stabilniji polimorf I. Stoga zagrijavanjem dolazi do prijelaza iz polimorfa III u polimorf I.

U Ramanovim spektrima polimorfa uočene su razlike u položaju i intenzitetu vibracijskih vrpce aromatskog C–H svijanja u području od  $1060\text{ cm}^{-1}$  do  $1000\text{ cm}^{-1}$  (Slika 2.18). Prijelaz iz polimorfa III u polimorf I uslijed zagrijavanja kristalizacijske smjese praćen je na temelju pomaka navedenih vrpce u Ramanovim spektrima *in-line*. Iz omjera njihovog intenziteta izračunat je udio polimorfa I i III u smjesi.

Eksperimentalni podaci uspoređeni su s kinetičkim modelima u čvrstom stanju. Dobru korelaciju s mjerenim podacima pokazivalo je nekoliko kinetičkih modela: Avrami-Erofeev model ( $n = 2$  i  $n = 3$ ) te dvodimenzijski i trodimenzijski model fazne granice. Mogućnost opisa polimorfnog prijelaza različitim modelima dokaz je njegove kompleksnosti te ukazuje na istodobno djelovanje nekoliko mehanizama.



Slika 2.18. FT-Ramanovi spektri *in-line* ( $1060\text{ cm}^{-1}$  do  $1000\text{ cm}^{-1}$ ) prijelaza karbamazepina iz polimorfa III u polimorf I uslijed zagrijavanja smjese. Vrijeme između pojedinih spektara,  $t$  iznosilo je  $1040\text{ s}$ .<sup>62</sup>

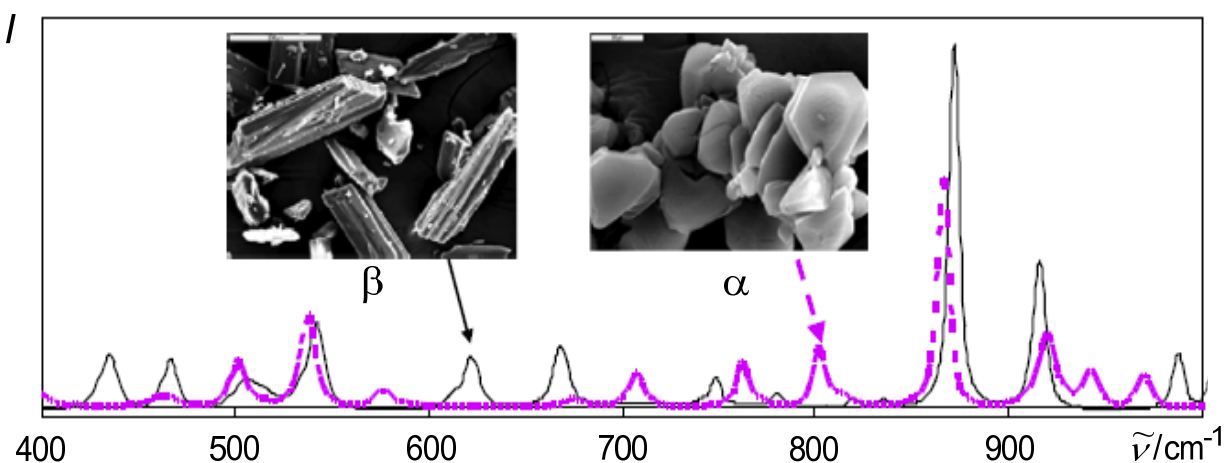
Nastanak polimorfa može biti i posljedica kemijske reakcije, poput taloženja L-glutaminske kiseline nakon dodatka sumporne kiseline u otopinu natrijevog L-glutamata:



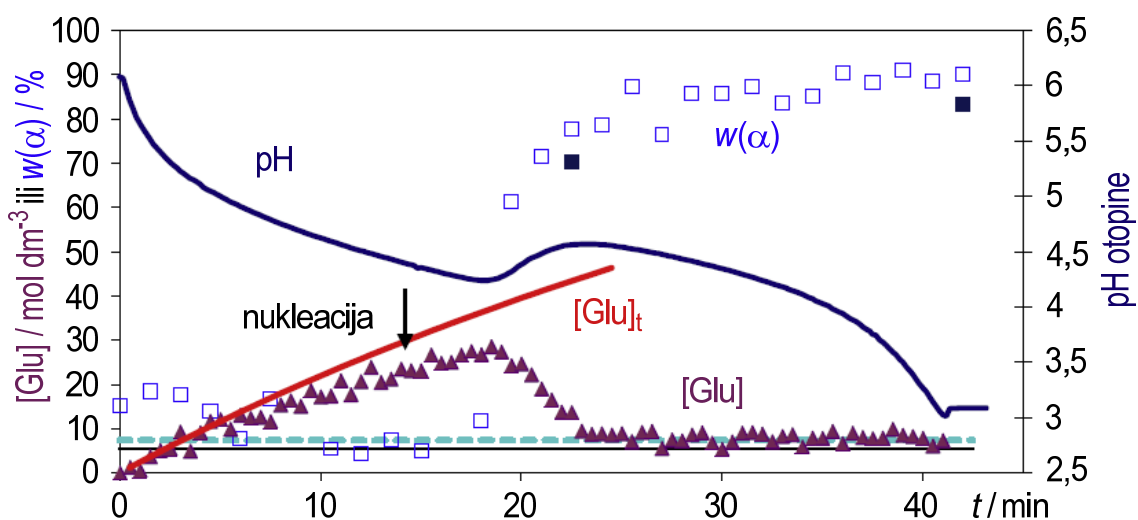
Kristali L-glutaminske kiseline se pojavljuju u dva polimorfna oblika,  $\alpha$  i  $\beta$ . Ramanovi spektri polimorfa  $\alpha$  i  $\beta$  razlikuju se u području od  $400\text{ cm}^{-1}$  do  $1000\text{ cm}^{-1}$  (Slika 2.19). Stoga je za praćenje reakcije taloženja L-glutaminske kiseline i procjenu polimornog sastava dobivenih kristala korištena Ramanova spektroskopija *in-line*.<sup>63</sup>

Podaci dobiveni analizom *in-line* prikazani su na Slici 2.20. Na početku procesa dolazi do sniženja pH otopine uslijed dodatka sumporne kiseline te povećanja koncentracije L-glutaminske kiseline, [Glu] zbog protoniranja natrijevog L-glutamata. Daljnjim povećanjem [Glu] prelazi se granica metastabilnog područja (Slika 2.14) te započinje proces nukleacije (crna strelica na Slici 2.20).

Pritom se  $[\text{Glu}]$  u otopini istovremeno povećava kao posljedica deprotoniranja Na-L-Glu, ali i smanjuje zbog procesa taloženja. U određenom trenutku, brzina taloženja H-L-Glu postaje veća od brzine deprotoniranja njezine natrijeve soli, što uzrokuje smanjenje  $[\text{Glu}]$  te povećanje pH vrijednosti otopine. Kao što se može vidjeti na Slici 2.20, mjerena koncentracija L-glutaminske kiseline,  $[\text{Glu}]$  se u prvih 20 minuta dobro slaže s teorijskom vrijednošću,  $[\text{Glu}]_t$ . Značajnija odstupanja uočena nakon prvih 20 minuta rezultat su nukleacije i rasta kristala.



Slika 2.19. Ramanovi spektri ( $400\text{ cm}^{-1}$  do  $1000\text{ cm}^{-1}$ ) polimorfa L-glutaminske kiseline.<sup>63</sup>



Slika 2.20. Vremenska ovisnost koncentracije L-glutaminske kiseline,  $[\text{Glu}]$ ; njezine teorijske vrijednosti,  $[\text{Glu}]_t$ ; masenog udjela polimorfa  $\alpha$ ,  $w(\alpha)$  i pH vrijednosti otopine.<sup>63</sup>

Iz Ramanovih spektara *in-line* procijenjen je polimorfni sastav dobivenih kristala. Pri koncentracijama reaktanata  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ , brzini miješanja 250 rpm i unosu reaktanata s gornje strane reaktora dobiveni kristali su sadržavali oko 90% polimorfa  $\alpha$  (Slika 2.20). Da bi se proučio utjecaj procesnih parametara na polimorfni sastav smjese, mjerenja su ponovljena pri različitim uvjetima. Zaključeno je da se selektivnost reakcije, a time i udio polimorfa  $\alpha$  može povećati smanjenjem koncentracija reaktanata.

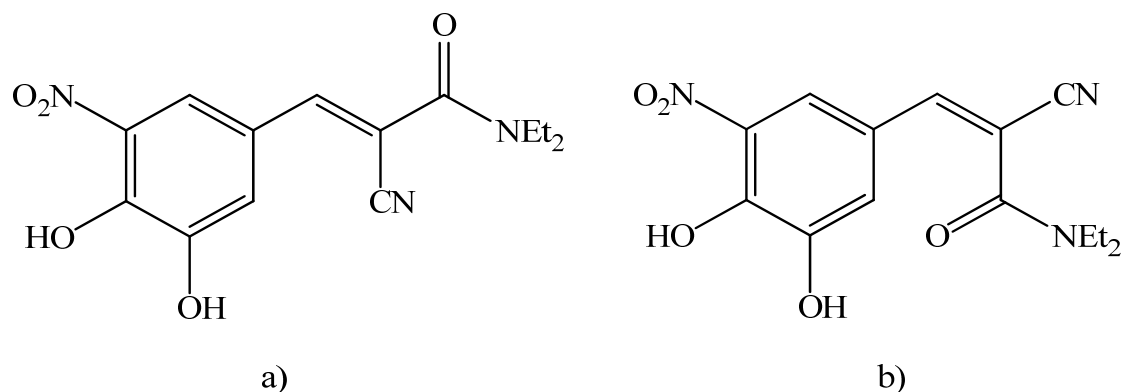
Navedeni primjeri pokazuju kako se NIR i Ramanovom spektroskopijom *in-line* mogu pratiti polimorfni prijelazi, kristalizacija djelatnih tvari i kemijske reakcije dobivanja polimorfa. Praćenjem fizičkih i kemijskih procesa *in situ* mogu se odrediti parametri koji na njih utječu, poput kinetičke i termodinamičke stabilnosti polimorfa, udjela vlage, temperature, brzine miješanja, hlađenja ili grijanja smjese. Dobivanje odgovarajućeg polimorfa rezultat je pravilnog podešavanja i kontrole procesnih parametara.

Stoga je u ovoj disertaciji naglasak na razvoju metodologije vibracijske spektroskopije *in-line* za praćenje i kontrolu sinteze odnosno kristalizacije biološki aktivnih tvari. Metodologija će se najprije primijeniti na djelatnoj tvari entakapon, a zatim će obuhvatiti salicilidenske derivate karbohidrazida.

## 2.11. Entakapon

Djelatna tvar 2-cijano-*N,N*-dietil-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil) propenamid (entakapon) je učinkovit i selektivan inhibitor katehol-*O*-metiltransferaze, odnosno enzima odgovornog za metabolizam 3,4-dihidroksifenil-L-alanina (L-dopa) koji je prekursor dopamina.<sup>64</sup> Entakapon se klinički upotrebljava za liječenje Parkinsonove bolesti uzrokovane nedostatkom dopamina.<sup>65,66</sup>

Reakcijom sinteze entakapona dobivaju se dva izomera, *E*- i *Z*- (Slika 2.21), u omjeru 2:1.<sup>24</sup> Isti omjer postiže se *in vivo* pretvorbom *E*- izomera u *Z*- izomer koja se odvija u krvnoj plazmi.<sup>67</sup> Oba izomera pokazuju biološku aktivnost. Međutim, kao djelatna tvar upotrebljava se samo *E*- izomer jer se lakše izolira iz reakcijske smjese.<sup>68</sup>



Slika 2.21. Strukture a) *E*- i b) *Z*- izomera entakapona.

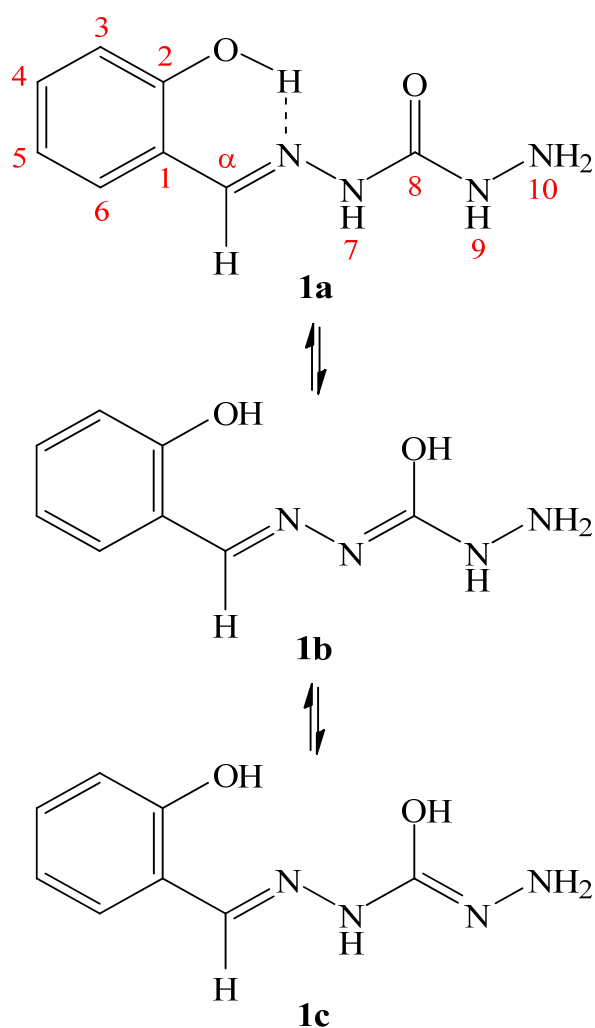
Poznato je da *E*- izomer kristalizira u šest različitih polimorfnih oblika: A,<sup>69</sup> D,<sup>70</sup>  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ,<sup>71,72</sup> od kojih su prva dva najzastupljenija u polarnim otapalima.<sup>73</sup> Promjenom polarosti otapala može se utjecati na udio pojedinog polimorfa u smjesi. Termodinamički najstabilniji i za farmaceutsku industriju najzanimljiviji je polimorfni oblik A.

## 2.12. Salicilidenski derivati karbohidrazida

Metodologija vibracijske spektroskopije *in-line* razvijena na djelatnoj tvari entakapon kao modelnom sustavu dalje će se testirati i primijeniti za karakterizaciju i praćenje sinteze biološki aktivnih salicilidenskih derivata karbohidrazida.

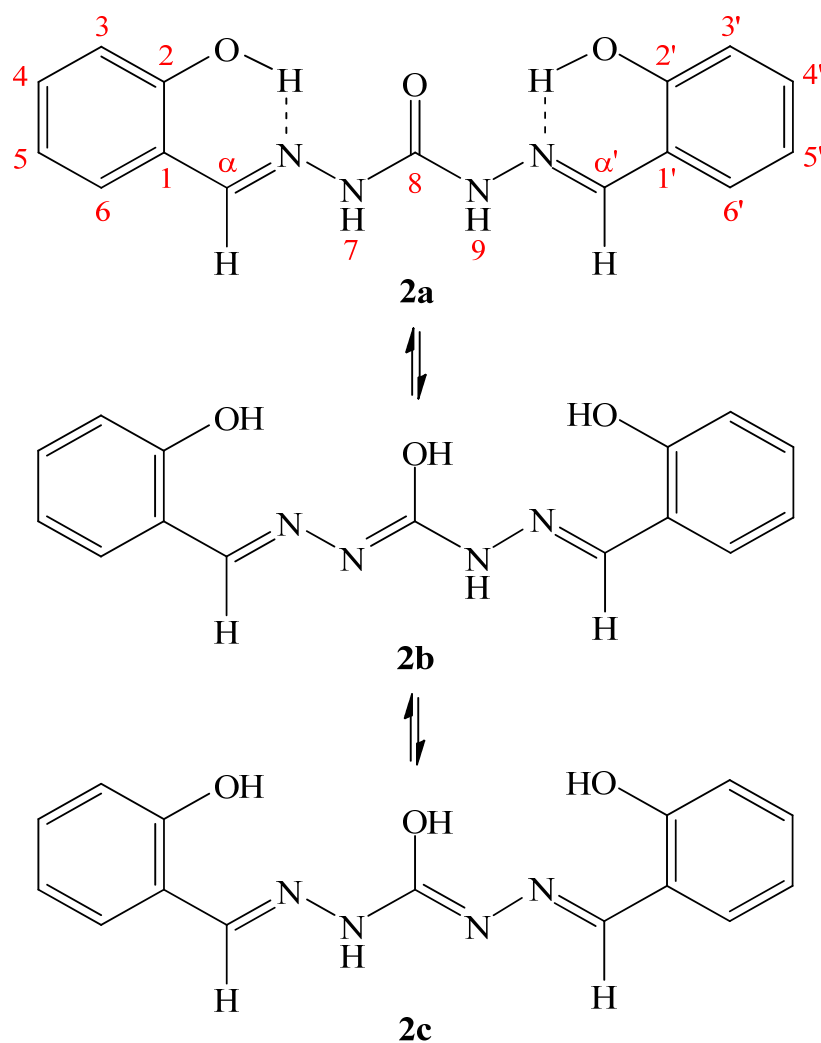
Kondenzacijom karbohidrazida s aromatskim karbonilnim spojevima nastaju Schiffove baze s potencijalnom antioksidativnom, antibakterijskom i antivirusnom aktivnošću.<sup>74–77</sup> Schiffove baze dobivene iz di- i tri-amina posjeduju nekoliko funkcijskih skupina bogatih elektronima pomoću kojih se mogu vezati na ione prijelaznih metala te tvoriti jedno- i višenuklearne kelatne sustave.<sup>78</sup> Stoga se primjenjuju kao reagensi za spektrofotometrijsko spektrofluorimetrijsko i elektrokemijsko određivanje tragova prijelaznih metala.<sup>79–84</sup>

Poznato je da pojedini salicilidenski derivati karbohidrazida sprječavaju rast mikroorganizama te imaju potencijalnu farmaceutsku primjenu.<sup>85</sup> Njihova biološka aktivnost ovisi o položaju i vrsti supstituenata na aromatskom prstenu. Najjednostaviji salicilidenski derivati karbohidrazida su mono(saliciliden)karbohidrazid (**1**) i bis(saliciliden)karbohidrazid (**2**) (Slika 2.22 i Slika 2.23). Jedan od načina priprave spojeva **1** i **2** je reakcija kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u molarnim omjerima 1:1 odnosno 1:2.<sup>45,86</sup>



Slika 2.22. Tautomerne strukture i brojanje atoma spoja **1**.

Kod oba spoja prisutna je keto-enolna tautomerija (Slika 2.22 i Slika 2.23). Nadalje, spoj **2** se u čvrstom stanju pojavljuje u obliku polimorfa I–III, hidrata IV te di(*tert*-butanolnog) solvata V.<sup>86</sup> Udio pojedinog kristalografskog oblika u smjesi ovisan je o polarnosti otapala, brzini miješanja i temperaturi smjese.



Slika 2.23. Tautomerne strukture i brojanje atoma spoja **2**.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



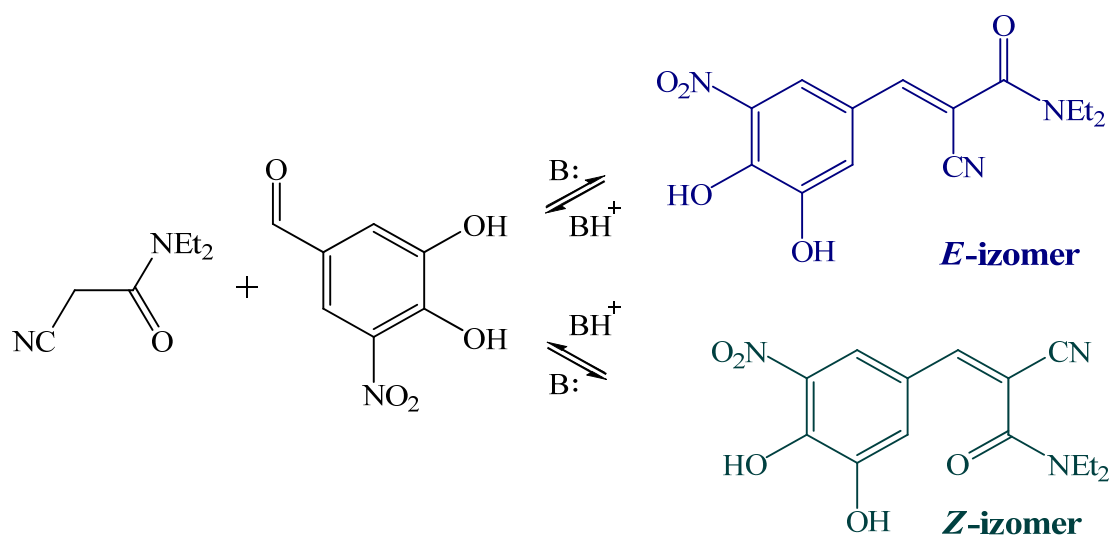
### 3.1. Materijali

U ovoj disertaciji korišteni su sljedeći materijali:

|                                                  |                                                          |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyd (min. 99 %)    | metanol (min. 99,5 %)                                    |
| 2-cijano- <i>N,N</i> -dietilacetamid (min. 99 %) | etanol (min. 99,8 %)                                     |
| salicilaldehid (min. 98 %)                       | propan-2-ol (min. 99,9 %)                                |
| karbohidrazid (min. 98 %)                        | <i>n</i> -heptan (min. 99,8 %)                           |
| izobutil-acetat (min. 99 %)                      | klorovodična kiselina (min. 36,5 %)                      |
| octena kiselina (min. 99,8 %)                    | piperidin (min. 99 %)                                    |
| toluen (min. 99,5 %)                             | aceton (min. 99,5 %)                                     |
| dimetil sulfoksid- $d_6$ , DMSO- $d_6$ (99,9 %)  | <i>N,N</i> -dimetil foramid- $d_7$ , DMF- $d_7$ (99,5 %) |

### 3.2. Reakcija sinteze entakapona

Entakapon je sintetiziran Knoevenagelovom kondenzacijskom reakcijom između 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyda i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida (Slika 3.1).<sup>24</sup>

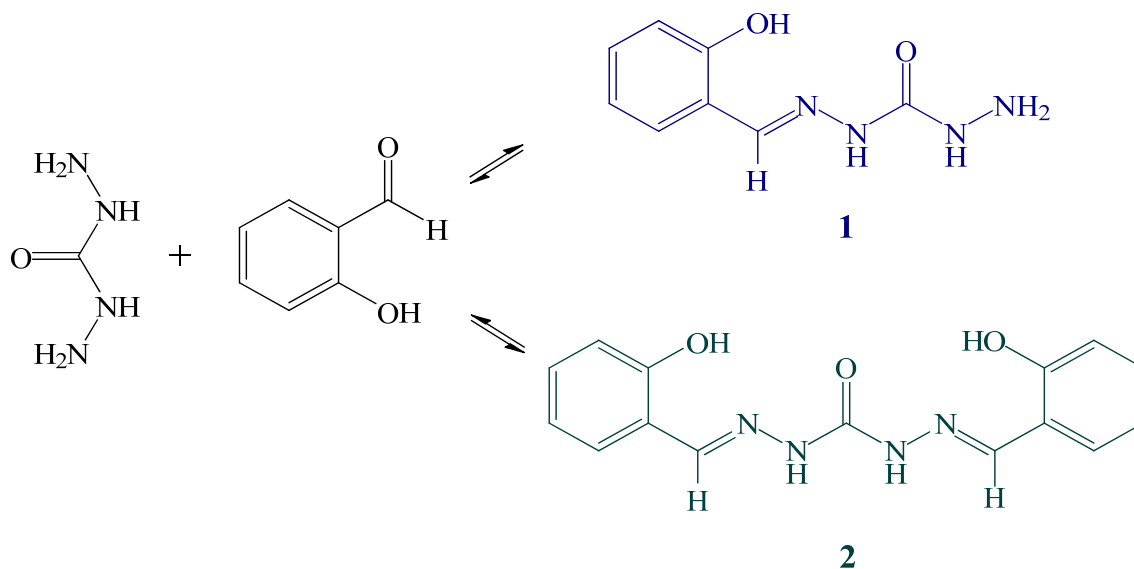


Slika 3.1. Knoevenagelova kondenzacijska reakcija sinteze entakapona.

Prije početka reakcije piperidin (1,78 ml) je dodan u otopinu toluena (41 ml) i octene kiseline (1,03 ml) te je na taj način pripravljen katalizator, piperidin acetat ( $B:/BH^+$ , Slika 3.1). Nakon toga su u reakcijsku smjesu dodani reaktanti. Reakcijska smjesa je 2 h refluksirana uz kontinuirano miješanje. Dobiveni uljasti produkt kristaliziran je dodatkom 7,5 ml metanola i 3,2 ml klorovodične kiseline (36,5 %). Kristali produkta odfiltrirani su preko Büchnerovog lijevka, isprani s 2,3 ml hladnog toluena i osušeni na zraku. Sinteza je ponovljena u *n*-heptanu i izobutil-acetatu kao otapalima.

### 3.3. Reakcija sinteze derivata karbohidrazida **1** i **2**

Karbohidrazid (3,00 g) je otopljen u 250 ml metanola pri temperaturi 60 °C. U dobivenu otopinu dodan je salicilaldehid (7,09 ml).<sup>45</sup> Reakcijska smjesa je refluksirana 2 h uz kontinuirano miješanje. Kristalni produkti odfiltrirani su pomoću Büchnerovog lijevka, isprani s hladnim metanolom i osušeni na zraku. Kondenzacijska reakcija je ponovljena u etanolu i propan-2-olu kao otapalima.



Slika 3.2. Kondenzacijska reakcija sinteze spojeva **1** i **2**.

### 3.4. Postupak kristalizacije entakapona

Zasićene otopine entakapona pripravljene su otapanjem kristala njegovog *E*- izomera (polimorfni oblik A) u smjesama acetona i vode (v:v = 40:60 i 30:70; 2 g u 200 ml;  $T = 74,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) te toluena i metanola (v:v = 30:70 i 20:80; 20 g u 200 ml;  $T = 65,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Dobivene otopine miješane su kutnom brzinom od 200 okretaja u minuti pomoću laboratorijske mješalice do potpunog otapanja kristala (Slika 3.4). Sustav je potom postupno hlađen pomoću termostatisane kupelji Lauda-alpha RA 12 (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. Königshofen, Njemačka) povezane na laboratorijski reaktor. Brzina hlađenja se linearno smanjivala s vremenom. Stoga su krivulje hlađenja aproksimirane sljedećim jednadžbama:

$$T = 74,51 - 0,823 t + 0,002 t^2 \quad (3.1.)$$

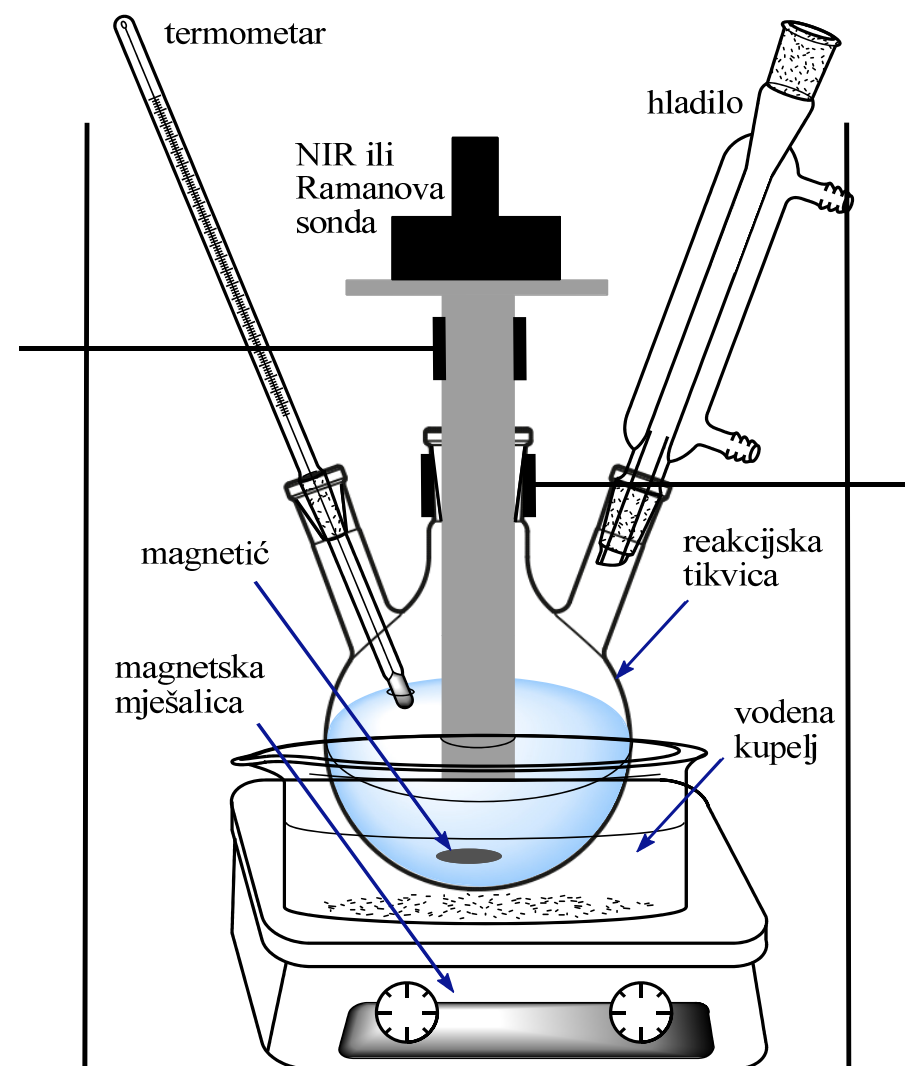
$$T = 64,96 - 0,770 t + 0,002 t^2 \quad (3.2.)$$

gdje je  $T$  temperatura termostatisane kupelji u Celzijusovim stupnjevima, a  $t$  vrijeme u minutama. Parametri u navedenim jednadžbama izračunati su korištenjem linearne regresije podataka dobivenih svakih  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  u odgovarajućim vremenskim intervalima. Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) je u oba slučaja iznosio 0,9998.

### 3.5. Tehnike vibracijske spektroskopije *in-line*

#### 3.5.1. Ramanova spektroskopija *in-line*

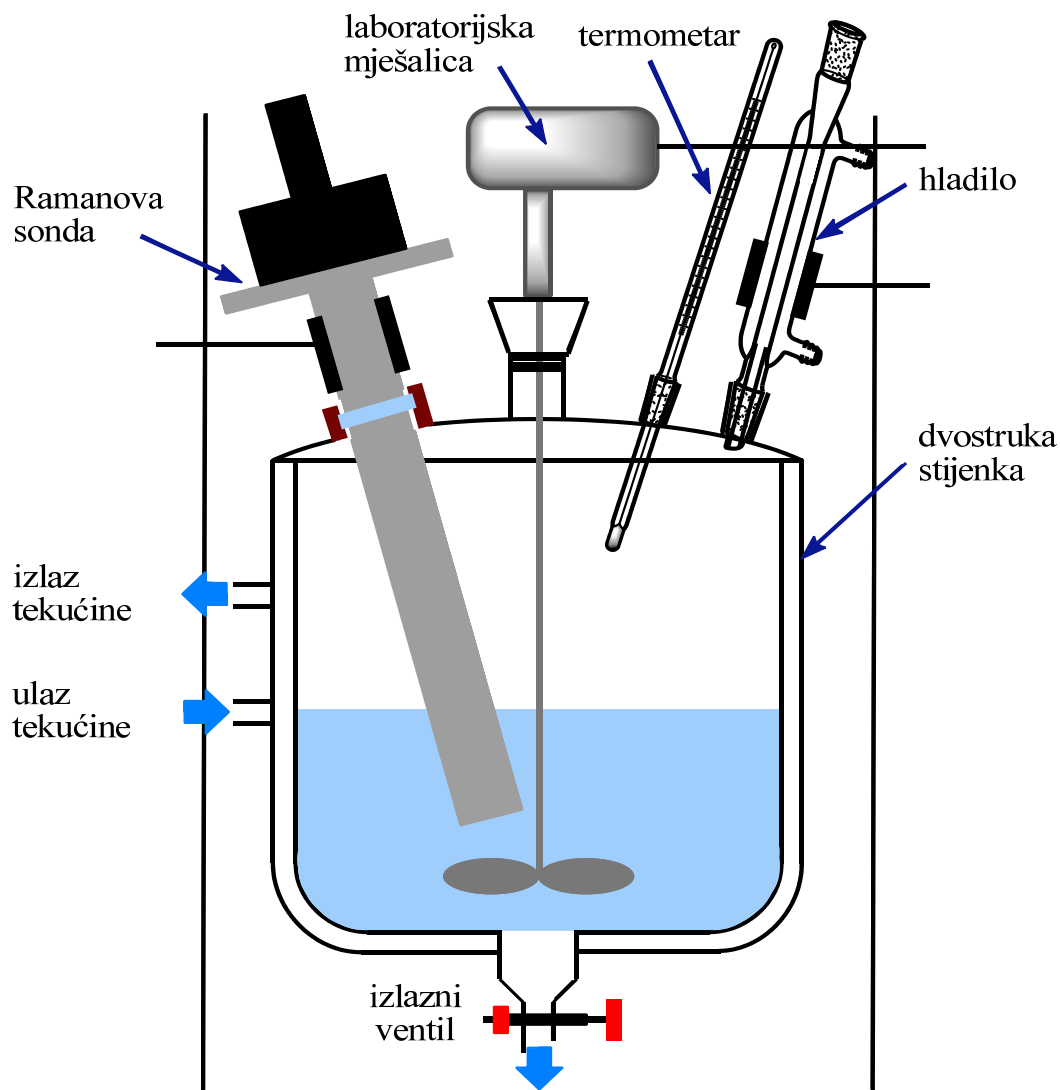
Ramanovi spektri *in-line* kemijskih reakcija sinteze snimljeni su na Bruker Equinox spektrometru s Ramanovim modulom FRA 106/S (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Njemačka). Spektrometar je optičkim vlaknima bio povezan s Ramanovom sondom uronjenom u reakcijsku tikvicu (Slika 3.3). Reakcijska tikvica bila je obložena reflektirajućim materijalom (aluminij) radi učinkovitijeg prikupljanja raspršenog zračenja.<sup>7</sup> Kao izvor zračenja korišten je Nd-YAG laser snage 500 mW i valne duljine 1064 nm.



Slika 3.3. Aparatura za praćenje sinteze vibracijskom spektroskopijom *in-line*.

Ramanovi spektri *in-line* snimani su kontinuirano tijekom kemijskih reakcija sinteze (3,7 min po spektru). Za svaki spektar primijenjeno je 128 snimaka u području od  $3500\text{ cm}^{-1}$  do  $100\text{ cm}^{-1}$  uz razlučivanje  $4\text{ cm}^{-1}$ . Mjerenja *in-line* ponovljena su 2 puta pri istim uvjetima. Dobiveni produkti su odfiltrirani te su za usporedbu analizirani Ramanovom spektroskopijom *off-line*.

Za praćenje kristalizacije entakapona korištena je Ramanova sonda uronjena u laboratorijski reaktor (Slika 3.4). Sonda je optičkim vlaknima bila povezana s Ramanovim modulom FRA 106/S spektrometra Bruker Equinox (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Njemačka). Reaktor je bio obložen reflektirajućim materijalom (aluminij) radi učinkovitijeg prikupljanja raspršenog zračenja.<sup>7</sup>



Slika 3.4. Aparatura za praćenje kristalizacije Ramanovom spektroskopijom *in-line*.

Kao izvor zračenja korišten je Nd-YAG laser snage 500 mW i valne duljine 1064 nm. Ramanovi spektri snimani su kontinuirano tijekom kristalizacije entakapona (3,7 min po spektru). Za svaki spektar primijenjeno je 128 snimaka u području od  $3500\text{ cm}^{-1}$  do  $100\text{ cm}^{-1}$  uz razlučivanje  $4\text{ cm}^{-1}$ . Na temelju jednadžbi 3.1 i 3.2 te vremena potrebnog za snimanje spektra izračunate su temperature kristalizacije u pojedinim smjesama otapala. Mjerenja *in-line* su provedena 3 puta pri istim uvjetima. Dobiveni kristali entakapona su odfiltrirani te su im snimljeni Ramanovi spektri *off-line*.

### 3.5.2. NIR spektroskopija *in-line*

Za praćenje reakcije sinteze spojeva **1** i **2** NIR spektroskopijom *in-line* korišten je Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spektrometar (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) opremljen He-Ne laserom valne duljine 632,8 nm. Spektri su snimani kontinuirano tijekom kemijske reakcije (1,0 min po spektru) pomoću NIR sonde optičkim vlaknima povezane sa spektrometrom. Sonda je bila obložena reflektirajućim materijalom (aluminij) radi učinkovitijeg prikupljanja propuštenog zračenja<sup>7</sup> te uronjena u reakcijsku tikvicu (Slika 3.3). Za svaki spektar korišteno je 20 snimaka uz razlučivanje  $8\text{ cm}^{-1}$  u području od  $10000\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Analiza *in-line* provedena je 3 puta pri istim uvjetima.

## 3.6. Multivarijatna analiza spektara *in-line*

Podaci dobiveni vibracijskom spektroskopijom *in-line* obrađeni su multivarijantnim metodama analize. Korištene su dvije metode: PCA i IHM.

### 3.6.1. Analiza Ramanovih spektara *in-line* metodom PCA

Ramanovi spektri *in-line* obrađeni su u programu The Unscrambler 10.2 (Camo Software AS, Oslo, Norveška). Odabrano je područje valnih brojeva od  $3500\text{ cm}^{-1}$  do  $200\text{ cm}^{-1}$ . Za normiranje podataka korišten je postupak SNV (engl. *standard normal variate*). Metoda PCA je provedena na matrici kovarijance dobivene iz normiranih i centriranih podataka.

### 3.6.2. Analiza NIR spektara *in-line* metodom PCA

Za PCA analizu NIR spektara *in-line* snimljenih tijekom reakcija sinteze **1** i **2** korišten je program The Unscrambler 10.2 (Camo Software AS, Oslo, Norveška). Odabrana su sljedeća područja valnih brojeva:

- od  $10000\text{ cm}^{-1}$  do  $7000\text{ cm}^{-1}$  i od  $5800\text{ cm}^{-1}$  do  $5100\text{ cm}^{-1}$  (reakcija u metanolu)
- od  $10000\text{ cm}^{-1}$  do  $5000\text{ cm}^{-1}$  (reakcija u etanolu)
- od  $10000\text{ cm}^{-1}$  do  $6000\text{ cm}^{-1}$  i od  $5500\text{ cm}^{-1}$  do  $5000\text{ cm}^{-1}$  (reakcija u propan-2-olu)

Podaci su normirani korištenjem postupka SNV. Matrica kovarijance dobivena iz normiranih i centriranih podataka obrađena je metodom PCA.

### 3.6.3. Analiza Ramanovih spektara *in-line* metodom IHM

Kalibracijski spektri su dobiveni obradom Ramanovih spektara *off-line* čistih polimorfnih oblika pomoću programa razvijenih u Matlabu (verzija 7.1, The Mathworks Inc., Natick, SAD). Prvi snimljeni Ramanov spektar *in-line* upotrijebljen je kao pozadina. Za analizu je odabrano područje valnih brojeva od  $1688\text{ cm}^{-1}$  do  $1158\text{ cm}^{-1}$ .

Podaci su normirani postupkom SNV te korigirani na najnižu vrijednost. Dobiveni kalibracijski spektri modelirani su metodom IHM. Ramanovi spektri *in-line* aproksimirani su linearnom kombinacijom modelnih spektara. Relativni koeficijenti intenziteta bili su proporcionalni udjelu pojedinih polimorfa u smjesi.

### 3.7. Spektroskopija NMR u otopini

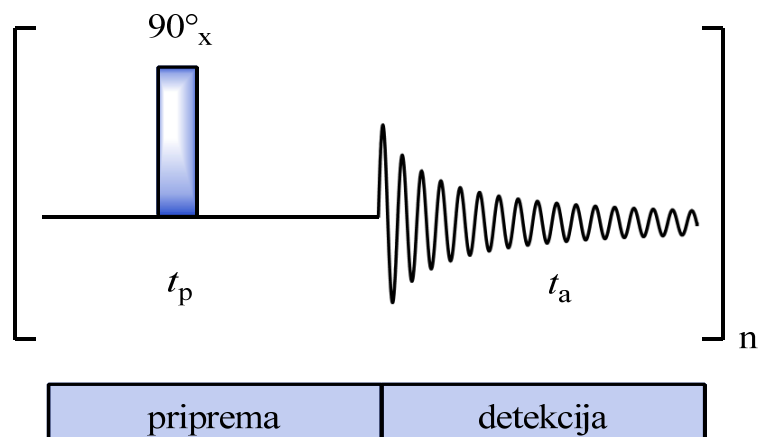
Struktura dobivenih spojeva u otopini određena je spektroskopijom NMR. Jednodimenzijски ( $^1\text{H}$  i APT) i dvodimenzijски (COSY, HSQC, HMBC i NOESY) NMR spektri uzoraka u otopini snimljeni su na Bruker 500 te Bruker Avance 300 i 600 spektrometrima pri konstantnom magnetnom polju od 7,1 odnosno 14,2 T, opremljenim z- gradijentima i inverznom probom. Korištena su otapala dimetil sulfoksid- $\text{d}_6$ , DMSO- $\text{d}_6$  (99,9 %) i *N,N*-dimetil foramid- $\text{d}_7$ , DMF- $\text{d}_7$  (99,5 %). Uzorci su otopljeni u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kao unutarnji standard korišten je TMS. Spektri su snimani pri sobnoj temperaturi (25 °C), osim ako nije drukčije naznačeno. Pulsni slijedovi tehnika kao i korišteni parametri NMR opisani su u sljedećim poglavljima.

#### 3.7.1. Tehnika $^1\text{H}$ NMR

Tehnikom  $^1\text{H}$  NMR detektirani su signali kemijski neekvivalentnih protona u analiziranim spojevima. Broj protona procijenjen je na temelju omjera integrala površina ispod pojedinih signala.

Pulsni slijed ove spektroskopske tehnike uključuje period pripreme i period detekcije između kojih se nalazi puls od 90° po osi x u trajanju  $t_p$  (Slika 3.5) Tijekom vremena akvizicije ( $t_a$ ), zavojnica prima signal i bilježi ga kao slobodno opadanje magnetizacije (engl. *free induction decay*, FID). Ovaj slijed se ponavlja  $n$  puta radi postizanja boljeg omjera signala i šuma.

Analizom  $^1\text{H}$  NMR kemijskih pomaka i konstanti sprežanja spin-spin dobiven je prvi uvid u strukturu spoja.



Slika 3.5. Pulsni slijed tehnike  $^1\text{H}$  NMR.

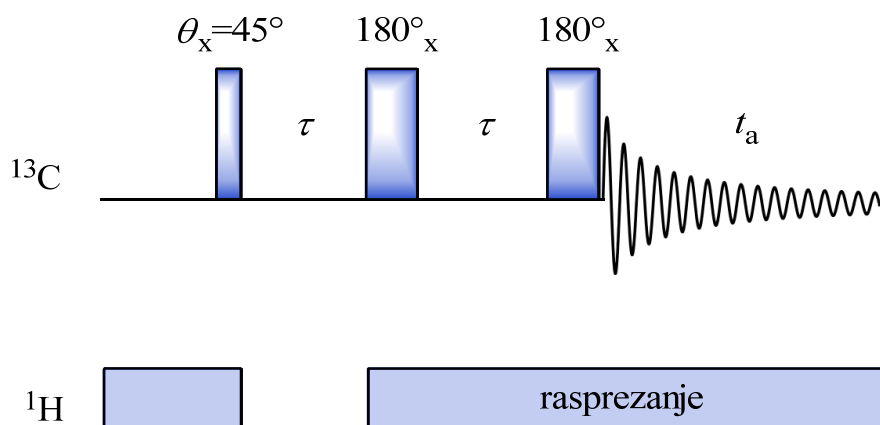
Za snimanje  $^1\text{H}$  NMR spektara primijenjeno je 16 do 128 pulseva uz vrijeme akvizicije u rasponu od 1,36 s do 5,31 s te spektralnu širinu u području od 6172,84 Hz do 12019,23 Hz. Broj korištenih točaka u vremenskoj domeni iznosio je 32 K uz digitalno razlučivanje od 0,19 Hz do 0,37 Hz po točki.

### 3.7.2. Tehnika APT

Tehnika APT (engl. *attached proton test*) je primjenjena za određivanje multipliciteta jezgri  $^{13}\text{C}$ . Njezin pulsni slijed prikazan je na Slici 3.6.

Poslije vremena pripreme, uz uključeno rasprezajuće polje, slijedi puls  $\theta_x$  od  $45^\circ$ . Unutar prvog vremena evolucije ( $\tau$ ) rasprezajuće polje je isključeno. Potom slijede dva pulsa od  $180^\circ_y$  uz uključeno rasprezanje i pojačanje signala zbog nuklearnog Overhauserovog efekta. Intenziteti signala ugljikovih atoma različitog multipliciteta ovise o kutu  $\Phi = 180^\circ J \tau$ .

Stoga je pravilnim odabirom vremena evolucije  $\tau$  određen multiplicitet ugljikovih atoma odnosno broj protona izravno vezanih na pojedini ugljik.



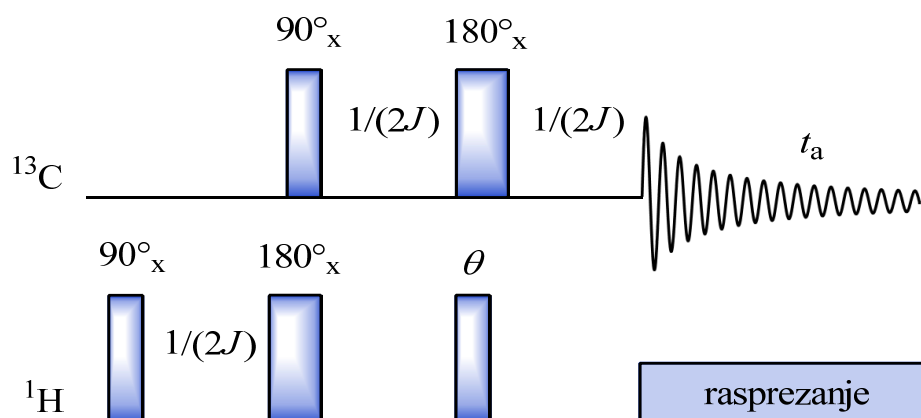
Slika 3.6. Pulsni slijed tehnike APT.

APT spektri su snimljeni uz spektralnu širinu u rasponu od 17985,61 Hz do 35971,22 Hz i vrijeme akvizicije od 0,91 s do 1,82 s. Broj pulseva po spektru bio je u rasponu od 10240 do 51791. Broj korištenih točaka u vremenskoj domeni iznosio je 32 K do 64 K uz digitalno razlučivanje od 0,55 Hz do 1,09 Hz po točki.

### 3.7.3. Tehnika DEPT

Tehnika DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarization transfer*) je jednodimenzijska tehnika NMR korištena za editiranje  $^{13}\text{C}$  NMR spektara prema multiplicitetu te pojačavanje signala jezgri  $^{13}\text{C}$  prijenosom polarizacije s protona.

Pulsni slijed tehnike DEPT prikazan je na Slici 3.7. Započinje protonskim pulsom od  $90^\circ_x$  nakon kojeg slijedi evolucija magnetizacije pod utjecajem CH sprezanja za period  $1/(2J)$ . Nakon  $^{13}\text{C}$  pulsa od  $90^\circ_x$  magnetizacije oba spina ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) evoluiraju koherentno, odnosno nastaje koherencija od više kvanata. Takva koherencija se ne može detektirati te se stoga upotrebljava puls za kut  $\theta$  po osi y koji je pretvara u detektirajuću magnetizaciju. U posljednjem periodu  $1/(2J)$  refokusira se magnetizacija jezgri  $^{13}\text{C}$ .



Slika 3.7. Pulsni slijed tehnike DEPT.

Editiranje  $^{13}\text{C}$  NMR spektara prema multiplicitetu izvedeno je odabirom pulsnog kuta  $\theta$  o kojemu ovisi intenzitet signala  $I$  jezgara  $^{13}\text{C}$  različitog multipliciteta:

$$\text{CH: } I = \sin \theta \quad (3.3.)$$

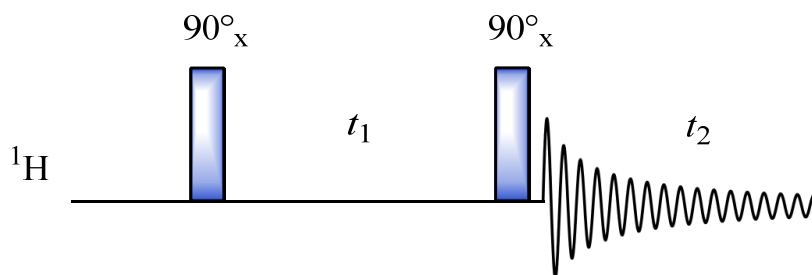
$$\text{CH}_2: I = 2 \sin \theta \cos \theta \quad (3.4.)$$

$$\text{CH}_3: I = 3 \sin \theta \cos^2 \theta \quad (3.5.)$$

Potpuno raspregnuti  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT-90 ( $\theta = 90^\circ$ ) i DEPT-135 ( $\theta = 135^\circ$ ) spektri snimljeni su uz spektralnu širinu od 18028,85 Hz i 256 pulseva. Digitalno razlučivanje potpuno raspregnutog  $^{13}\text{C}$  NMR spektra iznosilo je 0,11 Hz po točki, a DEPT spektara 0,55 Hz po točki uz vrijeme akvizicije od 0,91 s odnosno 1,82 s. Korišteno je 32 K točaka u vremenskoj domeni.

#### 3.7.4. Tehnika COSY

Tehnika COSY (engl. *correlation spectroscopy*) korištena je za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege kroz dvije ili tri kemijske veze. Pulsni slijed ove dvodimenzijske tehnike NMR prikazan je na Slici 3.8.



Slika 3.8. Pulsni slijed tehnike COSY.

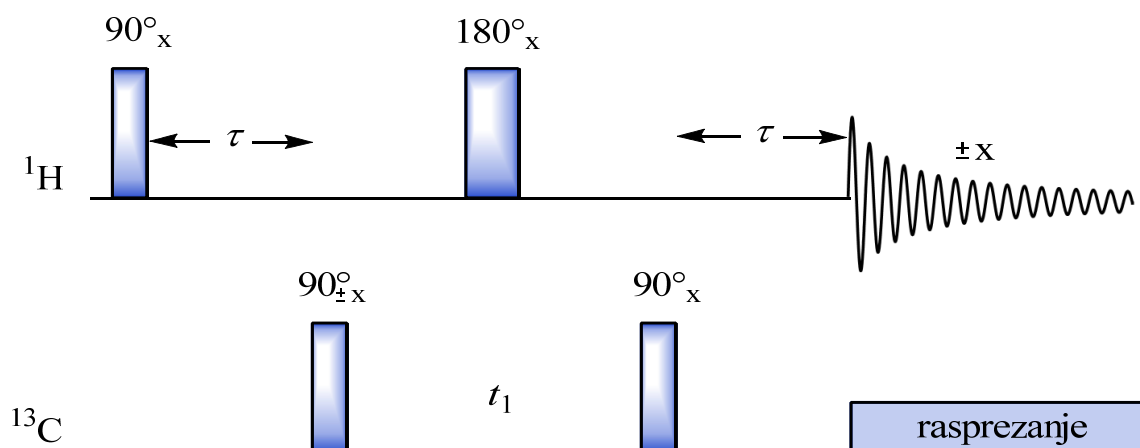
Sastoji se od dva pulsa od  $90^\circ_x$  koji su odvojeni vremenom  $t_1$ . Nakon prvog pulsa od  $90^\circ_x$  magnetizacija se prenosi s osi z na ravninu xy. Drugim pulsom od  $90^\circ_x$  prenosi se koherencija između spregnutih spinova uz pojavu izvandijagonalnih (križnih signala). Nakon drugog pulsa dolazi do detekcije magnetizacije.

COSY spektri su snimljeni uz korištenje 2048 točaka u F2 dimenziji i 512 inkremenata u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement primijenjeno je 4 do 16 pulseva u spektralnom području od 4006,41 Hz do 12019,23 Hz uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s. Digitalno razlučivanje bilo je u rasponu od 3,91 Hz do 5,87 Hz po točki u F2, odnosno od 23,44 Hz do 31,31 Hz po točki u F1 dimenziji.

### 3.7.5. Tehnika HMQC

Tehnika HMQC (engl. *heteronuclear multiple quantum coherence*) je inverzna heteronuklearna tehnika korištena za određivanje povezanosti protona i ugljikovih atoma kroz jednu vezu na temelju njihove skalarne sprege.

Pulsni slijed tehnike HMQC započinje protonskim pulsom od  $90^\circ_x$  nakon kojeg slijedi vremenski period evolucije magnetizacije protona,  $\tau$  (Slika 3.9). Potom slijedi puls od  $90^\circ_{\pm x}$  kojim se magnetizacija prenosi na jezgre  $^{13}\text{C}$ . Protonski puls od  $180^\circ_x$  uklanja utjecaj kemijskih pomaka protona tijekom evolucijskog vremena  $t_1$ . Drugi puls na jezgru  $^{13}\text{C}$  pretvara koherenciju od više kvanata u detektirajuću magnetizaciju. Unutar drugog perioda  $\tau$  refokusira se sprega između protona i ugljikovih atoma, nakon čega se detektira magnetizacija na protonima.



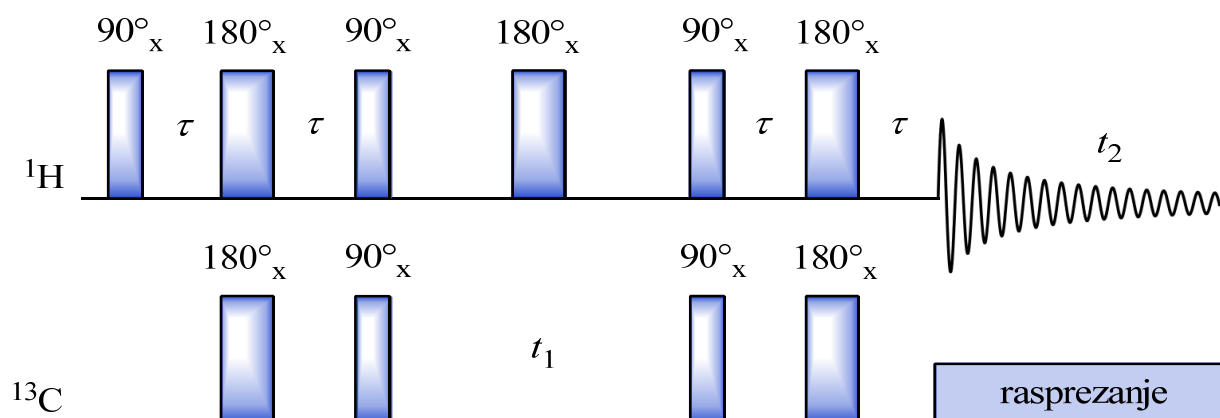
Slika 3.9. Pulsni slijed tehnike HMQC.

HMQC spektri su snimljeni uz korištenje 1024 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement upotrijebljena su 32 pulsa uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s. Spektralno područje bilo je 3086,42 Hz u F2 dimenziji, odnosno 11655,01 Hz u F1 dimenziji. Digitalno razlučivanje iznosilo je 6,03 Hz po točki u F2, odnosno 45,66 Hz po točki u F1 dimenziji.

### 3.7.6. Tehnika HSQC

Za utvrđivanje povezanosti protona i ugljikovih atoma kroz jednu vezu korištena je i tehnika HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*).

Pulsni slijed tehnike HSQC (Slika 3.10) dopušta samo evoluciju koherencije od jednog kvanta. Započinje pobudom svih protona koji evoluiraju pod utjecajem kemijskog pomaka i heteronuklearnog sprežanja sa spinovima jezgri  $^{13}\text{C}$ . Nakon prvog perioda  $\tau$  slijedi refokusirajući puls od  $180^\circ_x$  na obje jezgre. Pulsom od  $90^\circ_x$  nakon drugog perioda  $\tau$  magnetizacija se prebacuje na jezgre  $^{13}\text{C}$ . Protonski puls od  $180^\circ_x$  uklanja utjecaj kemijskih pomaka protona na jezgre  $^{13}\text{C}$  tijekom evolucijskog vremena  $t_1$ . Magnetizacija se potom vraća na protone, refokusira i na kraju detektira.



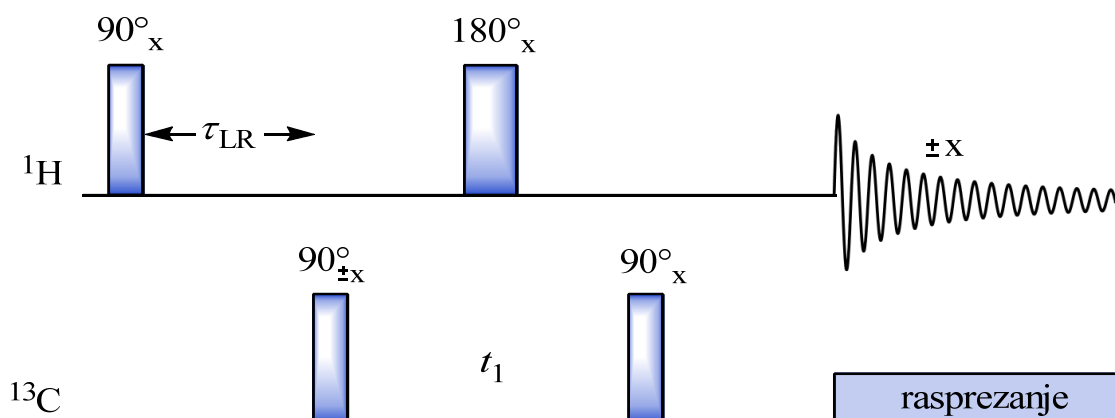
Slika 3.10. Pulsni slijed tehnike HSQC.

Za snimanje HSQC spektara korišteno je 2048 točaka u F2 dimenziji odnosno 256 inkremenata u F1 dimenziji. Relaksacijsko vrijeme odgode iznosilo je 1,0 s, a za pojedini inkrement je primijenjeno 8 do 128 pulseva. Spektralno područje bilo je u rasponu od 9615,39 Hz do 12019,23 Hz u F2 dimenziji, odnosno od 36216,15 Hz do 36219,39 Hz u F1 dimenziji. Digitalno razlučivanje iznosilo je od 5,87 Hz do 9,39 Hz po točki u F2, odnosno od 141,48 Hz do 282,97 Hz po točki u F1 dimenziji.

### 3.7.7. Tehnika HMBC

Tehnikom HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) dobiven je uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze što je omogućilo povezivanje pojedinih spinskih sustava. Pulsni slijed tehnike HMBC je modifikacija slijeda tehnike HMQC (Slika 3.11). Vrijeme odgode  $\tau_{LR}$  podešeno je za spregu kroz više veza, koja je puno manja od one kroz jednu vezu.

Primjenom tehnike HMBC utvrđena je povezanost između atoma koji pripadaju različitim molekulskim fragmentima. Povezivanjem dobivenih molekulskih fragmenata u cjelinu određena je dvodimenzijska struktura proučavanih spojeva u otopini.



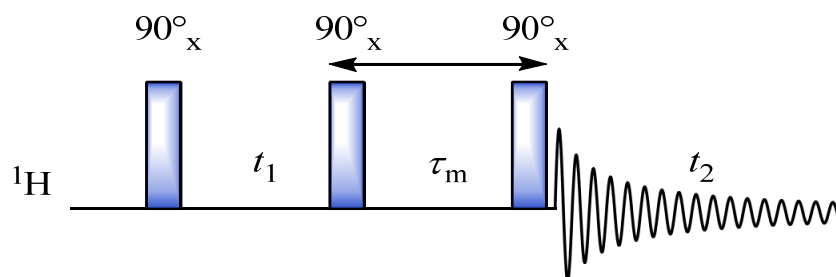
Slika 3.11. Pulsni slijed tehnike HMBC.

HMBC spektri snimljeni su uz korištenje 2048 do 4096 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji te spektralno područje od 3906,25 Hz do 12019,23 Hz u F2 dimenziji, odnosno od 16778,52 Hz do 36216,15 Hz u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement primijenjeno je od 64 do 128 pulseva. Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je u rasponu od 1,0 s do 1,5 s. Digitalno razlučivanje iznosilo je od 1,91 Hz do 5,87 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno od 131,23 Hz do 141,48 Hz po točki u F1 dimenziji.

### 3.7.8. Tehnika NOESY

Tehnika NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) temelji se na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi. Pomoću tehnike NOESY dobivene su informacije o prostornoj udaljenosti spinova što je omogućilo određivanje konformacije i trodimenzijske strukture spojeva u otopini.

Pulsni slijed tehnike NOESY započinje pulsom od  $90^\circ_x$  kojim se magnetizacija prebacuje u ravninu xy (Slika 3.12). Nakon evolucijskog vremena ( $t_1$ ), slijedi drugi  $90^\circ_x$  puls kojim se jedna komponenta vektora magnetizacije prebacuje na negativni dio osi z. Tijekom vremena miješanja ( $\tau_m$ ) postiže se inverzija napućenosti i nastaje nuklearni Overhauserov efekt. Potom slijedi posljednji  $90^\circ_x$  puls kojim se magnetizacija vraća na ravninu xy i detektira.



Slika 3.12. Pulsni slijed tehnike NOESY.

Za snimanje NOESY spektara korišteno je 2048 do 4096 točaka u F2 dimenziji odnosno 256 do 512 inkremenata u F1 dimenziji. Relaksacijsko vrijeme odgode iznosilo je 1,0 s. Broj pulseva po inkrementu bio je 16. Spektralno područje iznosilo je od 7002,80 Hz do 9615,45 Hz u F2 dimenziji te od 7002,80 Hz do 9602,79 Hz u F1<sub>KNNDG</sub> dimenziji. Digitalno razlučivanje bilo je u rasponu od 3,42 Hz do 4,78 Hz po točki u F2, odnosno od 18,73 Hz do 54,71 Hz po točki u F1 dimenziji. Vrijeme miješanja iznosilo je 500 ms.

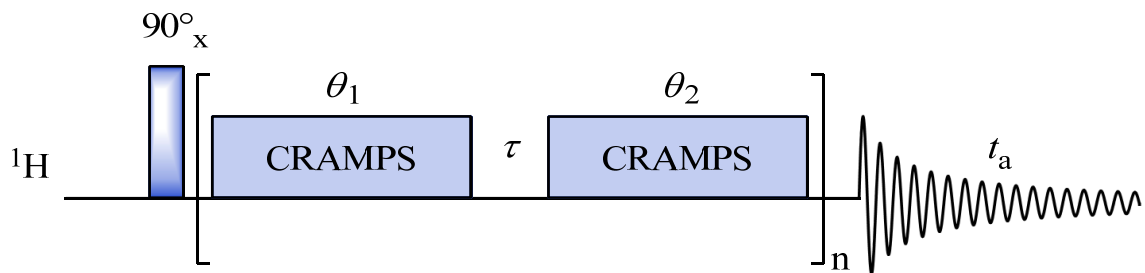
### 3.8. Spektroskopija NMR u čvrstom stanju

Spektroskopija NMR u čvrstom stanju korištena je za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju dobivenih spojeva u polikristalnim smjesama.

Jednodimenzijski  $^1\text{H}$  MAS i  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spektri čvrstih uzoraka snimljeni su pri 25°C na Varian NMR System 600 spektrometru opremljenom Fast MAS Solids sondom. Kao referentni signali u  $^1\text{H}$  MAS i  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spektrima korišteni su signali adamantana odnosno glicina.

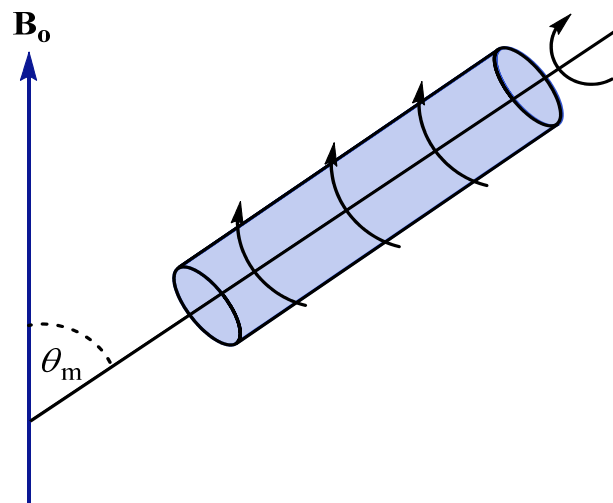
#### 3.8.1. Tehnika $^1\text{H}$ CRAMPS

Za snimanje protonskih spektara u čvrstom stanju korištena je tehnika  $^1\text{H}$  CRAMPS (engl. *combined rotation and multiple-pulse spectroscopy*). Primjenom fazno promjenjivih CRAMPS pulseva uz vrtnju pri "magičnom kutu" umanjen je utjecaj homonuklearnog dipolnog sprežanja protona u čvrstom stanju na izgled spektra.



Slika 3.13. Pulsni slijed tehnike  $^1\text{H}$  CRAMPS.

Pulsni slijed tehnike  $^1\text{H}$  CRAMPS prikazan je na Slici 3.13. Nakon početnog pulsa od  $90^\circ_x$  kojim se magnetizacija prebacuje u ravninu xy, slijede CRAMPS pulsevi širine  $\theta_1$  odnosno  $\theta_2$ . Pulsevi se ponavljaju  $n$  puta. Da bi se uklonile anizotropne interakcije, trajanje ovog pulsnog ciklusa mora biti kraće od perioda vrtnje uzorka pri "magičnom kutu",  $\theta_m$  (Slika 3.14).



Slika 3.14. Shematski prikaz vrtnje pri "magičnom kutu".

$^1\text{H}$  MAS spektri snimljeni su pomoću  $^1\text{H}$  CRAMPS pulsnog slijeda uz relaksacijsko vrijeme odgode od 5 s i vrtnju pri "magičnom kutu" ( $\theta_m = 54,74^\circ$ ) frekvencijom 20 kHz. Za svaki spektar korišteno je 16 pulseva.

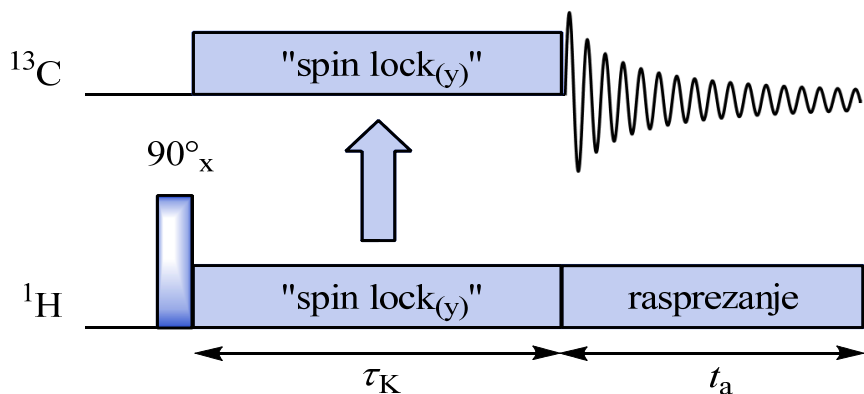
### 3.8.2. Tehnika $^{13}\text{C}$ CP-MAS

Tehnika  $^{13}\text{C}$  CP-MAS (engl. *cross polarisation magic angle spinning*) temelji se na tzv. križnoj polarizaciji uz vrtnju pri magičnom kutu koja uzrokuje povećanje intenziteta signala jezgri  $^{13}\text{C}$  prijenosom polarizacije s protona. Do prijenosa polarizacije dolazi samo ako je zadovoljen Hartmann-Hahnov uvjet:

$$\gamma(^1\text{H})B_1(^1\text{H}) \approx \gamma(^{13}\text{C})B_1(^{13}\text{C}) \quad (3.6.)$$

gdje su  $\gamma(^1\text{H})$  i  $\gamma(^{13}\text{C})$  magnetožirni omjeri, a  $B_1(^1\text{H})$  i  $B_1(^{13}\text{C})$  radiofrekvencijska polja protona odnosno jezgri  $^{13}\text{C}$ .

Ova tehnika je upotrijebljena za identifikaciju spojeva u čvrstom stanju na temelju kemijskih pomaka ugljikovih atoma.



Slika 3.15. Pulsni slijed tehnike  $^{13}\text{C}$  CP-MAS.

Pulsni slijed tehnike  $^{13}\text{C}$  CP-MAS započinje pulsom od  $90^\circ_x$  kojim se magnetizacija protona prebacuje u ravninu xy (Slika 3.15). Pomoću pulsnog slijeda "spin lock" magnetizacija se zadržava u xy ravnini što omogućava prijenos polarizacije s protona na jezgre  $^{13}\text{C}$ . Trajanje pulsnog slijeda "spin lock" odgovara kontaktnom vremenu ( $\tau_K$ ).

Za vrijeme trajanja akvizicije ( $t_a$ ) uključeno je raspresajuće polje na protonima kojim se uklanja heteronuklearna dipolna i skalarna sprege. Utjecaj homonuklearne dipolne sprege između protona nije značajan budući da se tehnikom  $^{13}\text{C}$  CP-MAS detektiraju prirodno slabo zastupljene jezgre  $^{13}\text{C}$ .

$^{13}\text{C}$  CP-MAS spektri snimljeni su uz relaksacijsko vrijeme odgode od 5 s, vrtnju pri magičnom kutu ( $\theta_m = 54,74^\circ$ ) frekvencijom 16 kHz i 1600 pulseva po spektru. Kontaktno vrijeme iznosilo je 1,0 ms.

### 3.9. SWAXS analiza

Tehnika SWAXS primijenjena je za određivanje sastava polikristalnih uzoraka te procjenu udjela pojedinog derivata odnosno polimorfa u smjesi.

Za SWAXS analizu korištena je kamera visokog razlučivanja (Hecus S3-Micropix, Graz, Austrija) opremljena optikom s točkastim fokusom (FOX3D). Kao izvor rentgenskog zračenja korišteno je Cu-K $\alpha$  zračenje valne duljine 1,542 Å i promjera zrake 200  $\mu\text{m}$ .

Napon izvora bio je 50 kV uz struju jakosti 1 mA. SAXS i WAXS spektri uzoraka snimljeni su korištenjem dva neovisna detektora (PSD-50, Hecus X-ray Systems, Graz, Austria) u rasponima kuteva  $0.06^\circ < 2\theta < 8^\circ$  odnosno  $17^\circ < 2\theta < 27^\circ$ .

Uzorci (85 mg) postavljeni su u staklenu kapilaru unutarnjeg promjera 2 mm zatvorenu voskom. Kapilara je potom bila izložena rentgenskom zračenju 700 s uz konstantnu vrtnju radi uklanjanja nehomogenosti u uzorku. Svako mjerenje je ponovljeno tri puta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni spektri su normirani na najveću vrijednost.



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



## 4.1. Sinteza entakapona

Djelatna tvar entakapon odabrana je kao modelni sustav na kojem će se pokušati razviti i testirati metodologija vibracijske spektroskopije *in-line* za praćenje i kontrolu procesa sinteze odnosno kristalizacije biološki aktivnih molekula. Stoga je kao prvi korak praćena kemijska reakcija sinteze entakapona u različitim otapalima Ramanovom spektroskopijom *in-line* pomoću sonde uronjene u reakcijsku smjesu (Slika 3.3) i optičkim vlaknima povezane sa spektrometrom. Za statističku interpretaciju dobivenih spektara korištena je metoda PCA. Cilj ovog istraživanja bilo je provjeriti može li se Ramanova spektroskopija *in-line* u kombinaciji s multivarijatnom analizom podataka primijeniti za identifikaciju nastalog produkta u realnom vremenu te procjenu trajanja Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u pojedinom otapalu.

### 4.1.1. Knoevenagelova kondenzacijska reakcija

Knoevenagelova kondenzacijska reakcija između 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehyda i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida (Slika 3.1) posljednji je korak u postupku sinteze djelatne tvari entakapon. Reakcijom nastaje smjesa *E*- i *Z*- izomera entakapona u međusobnom omjeru 2:1.<sup>24</sup> Entakapon je pripravljen u tri različita otapala: izobutil-acetatu, toluenu i heptanu. Proučavan je utjecaj otapala i temperature na brzinu, prinos reakcije i omjer izomera *E*-/*Z*-. Korištena su otapala čije se vibracijske vrpce uglavnom ne preklapaju s vrpćama produkata, što je olakšalo analizu dobivenih spektara.

### 4.1.2. Spektri *off-line* izomera entakapona

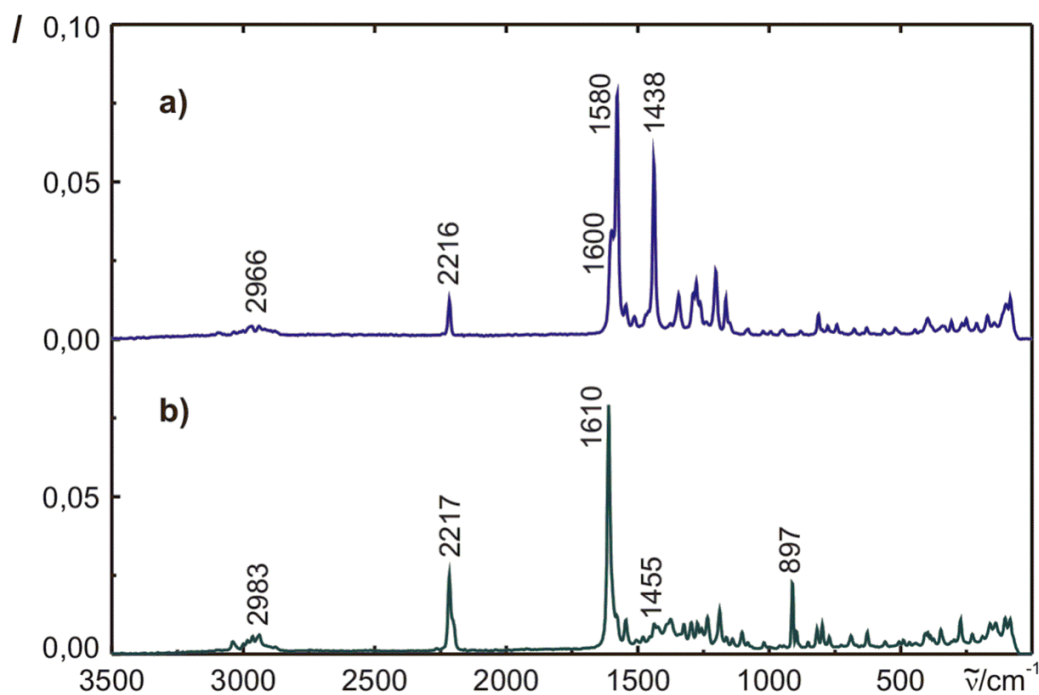
Prije analize *in-line*, kristalima *E*- i *Z*- izomera entakapona snimljeni su IR i Ramanovi spektri *off-line* te su asignirane karakteristične vibracijske vrpce (Tablica 4.1). Valni brojevi vrpce izračunati su i pomoću teorije funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT). Uočeno je dobro slaganje eksperimentalnih s teorijski izračunatim vrijednostima. Sistematska odstupanja teorijskih vrijednosti posljedica su računalnih ograničenja koja su umanjila točnost metode.

Tablica 4.1. Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpce *E*- i *Z*- izomera entakapona.<sup>24,68</sup>

| Način vibracije                      | $\tilde{\nu}$ / cm <sup>-1</sup> (Raman) <sup>a</sup> |            | $\tilde{\nu}$ / cm <sup>-1</sup> (IR) <sup>a</sup> |            | $\tilde{\nu}$ / cm <sup>-1</sup> (izračunato) |            |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------|------------|
|                                      | <i>E</i> -                                            | <i>Z</i> - | <i>E</i> -                                         | <i>Z</i> - | <i>E</i> -                                    | <i>Z</i> - |
| $\nu(\text{O-H})$                    |                                                       |            | 3340                                               | 3220–2700  | 3833, 3747                                    | 3845, 3762 |
| $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$        | 2216                                                  | 2217       | 2217                                               | 2217       | 2298                                          | 2307       |
| $\nu(\text{C=O})_{\text{amid}}$      | 1600                                                  | 1610       | 1606                                               | 1622       | 1700                                          | 1702       |
| $\nu(\text{C=C})_{\text{aromatsko}}$ | 1580                                                  | –          | 1582                                               | –          | –                                             | –          |
| $\nu(\text{NO}_2)$                   | 1545                                                  | 1546       | 1544                                               | 1549       | 1598                                          | 1599       |
| $\delta(\text{CH}_2)$                | 1438                                                  | 1455       | 1440                                               | 1444       | 1471                                          | 1472       |

<sup>a</sup> eksperimentalne vrijednosti

Ramanovi spektri *E*- izomera (polimorf A) i *Z*- izomera entakapona prikazani su na Slici 4.1. Vibracijske vrpce C–H istezanja pri oko 3000 cm<sup>-1</sup> vrlo su slabe te se stoga nisu mogle koristiti za praćenje kemijske reakcije. Nadalje, vrpce pri 2216 cm<sup>-1</sup> i 2217 cm<sup>-1</sup> odgovaraju vibracijama istezanja cijano (C≡N) skupine *E*- odnosno *Z*- izomera.<sup>24</sup> Ramanovi spektri izomera entakapona razlikuju se u području od 1610 cm<sup>-1</sup> do 1400 cm<sup>-1</sup>, gdje se pojavljuju vibracije istezanja NO<sub>2</sub> i C=O skupina te svijanja CH<sub>2</sub> skupine (Tablica 4.1). U Ramanovom spektru *E*- izomera entakapona pojavljuje se vrpca velikog intenziteta pri 1438 cm<sup>-1</sup> koja odgovara vibraciji svijanja CH<sub>2</sub> skupine. Odgovarajuća vrpca u Ramanovom spektru *Z*- izomera slabijeg je intenziteta i pomaknuta je prema višim vrijednostima valnih brojeva (1455 cm<sup>-1</sup>). Vrpce karbonilnog istezanja *E*- i *Z*- izomera pojavljuju se pri 1600 cm<sup>-1</sup> odnosno 1610 cm<sup>-1</sup>. Jaka vrpca pri 1580 cm<sup>-1</sup> prisutna u Ramanovom spektru *E*- izomera odgovara aromatskom C=C istezanju. S druge strane, srednje jaka vrpca pri 897 cm<sup>-1</sup> karakteristična je za *Z*- izomer i ne pojavljuje se u spektru *E*- izomera (Slika 4.1). Neke od ovih vibracijskih vrpce upotrijebljene su za praćenje reakcije i razlikovanje izomera entakapona.

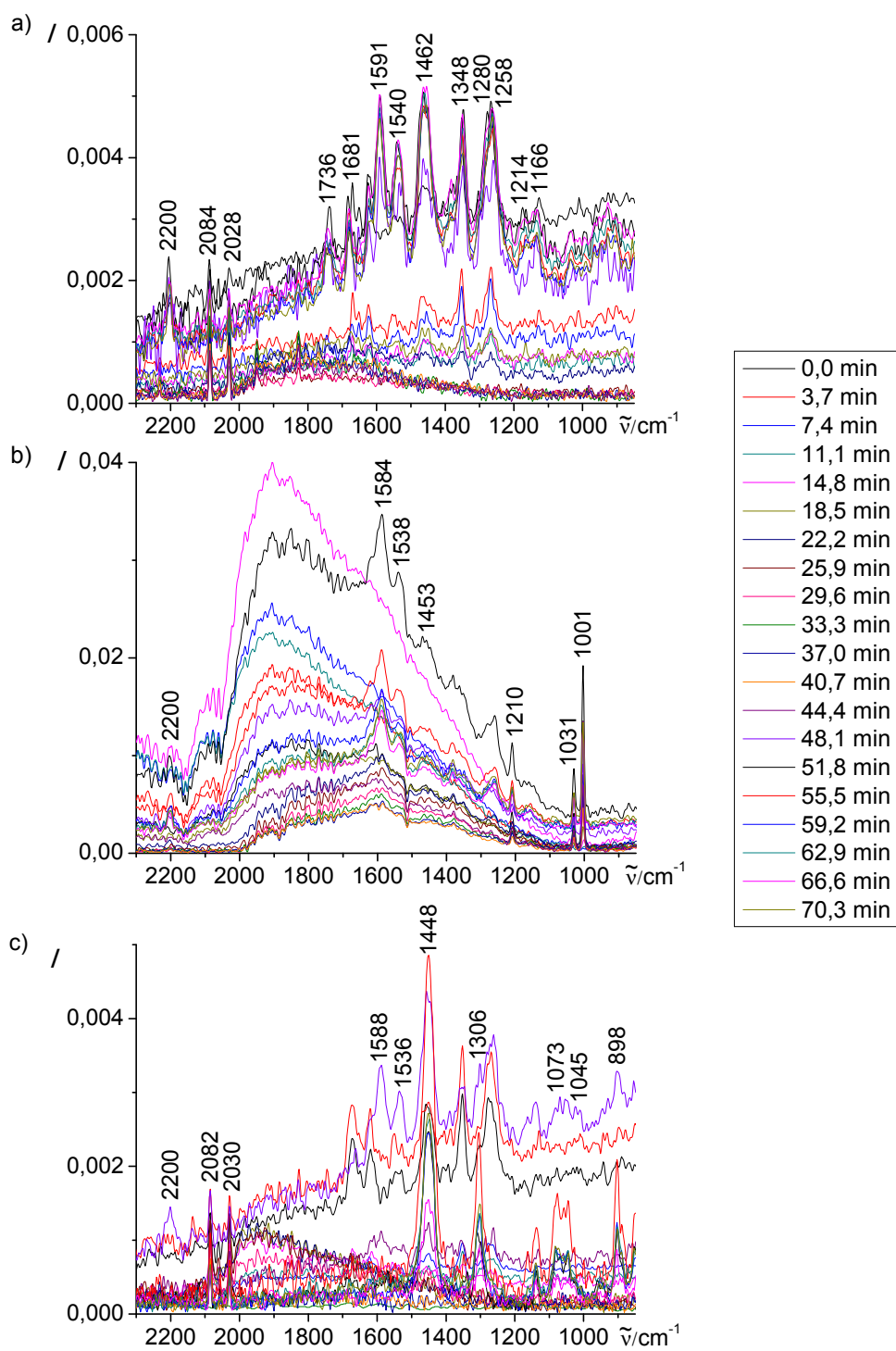


Slika 4.1. Ramanovi spektri a) *E*- izomera (polimorf A) i b) *Z*- izomera entakapona.<sup>24</sup>

#### 4.1.3. Praćenje Knoevenagelove kondenzacijske reakcije Ramanovom spektroskopijom *in-line*

Ramanovi spektri *in-line* snimani su kontinuirano (svakih 3,7 minuta) tijekom kemijske reakcije pomoću Ramanove sonde uronjene u reakcijsku smjesu (Slika 3.3). Mjerenja su provedena na različitim razinama u tikvici te je odabran položaj sonde pri kojem je intenzitet signala maksimalan. Ramanovi spektri *in-line* Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u heptanu, toluenu i izobutil acetatu prikazani su na Slici 4.2.

Nove vrpce koje su se pojavile tijekom kemijske reakcije u heptanu, toluenu i izobutil acetatu ukazale su na nastanak entakapona (Slika 4.2). Pojava vibracijskih vrpca *in-line* pri oko  $2200\text{ cm}^{-1}$  može se pripisati  $\text{C}\equiv\text{N}$  istežanju karakterističnom za oba izomera entakapona.



Slika 4.2. Ramanovi spektri *in-line* tijekom Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u  
a) izobutil-acetatu; b) toluenu i c) heptanu.<sup>24</sup>

Nadalje, intenzitet vrpce pri  $\approx 1590\text{ cm}^{-1}$ , karakteristične za C=O istezanje *E*- izomera povećava se tijekom kemijske reakcije u svim otapalima. Ova vrpca je pomaknuta prema nižim valnim brojevima u usporedbi s onima u čvrstom stanju (Slika 4.1). Prisutnost vrpce asimetričnog N–O istezanja i CH<sub>2</sub> svijanja u području od  $1540\text{ cm}^{-1}$  do  $1440\text{ cm}^{-1}$  potvrdila je nastanak reakcijskog produkta. Ostale Ramanove vrpce nije bilo moguće nedvojbeno asignirati zbog jakog preklapanja i složenog sastava reakcijske smjese. Stoga je za potvrdu nastanka *Z*- izomera entakapona te procjenu trajanja reakcije u svakom otapalu primijenjena metoda PCA.

#### 4.1.4. PCA analiza Ramanovih spektara *in-line*

Varijance opisane prvom, drugom i trećom glavnom komponentom (PC1, PC2 i PC3) navedene su u Tablici 4.2. Dobivene vrijednosti pokazuju da je većina varijacije podataka u svim korištenim otapalima bila predstavljena s PC1.

Tablica 4.2. Individualne ( $s^2_{\text{indiv.}}$ ) i kumulativne ( $s^2_{\text{kumul.}}$ ) varijance opisane glavnim komponentama za Ramanove spektre *in-line* snimljene tijekom kemijske reakcije.<sup>24</sup>

| Udio varijance, % |                       |                       |                      |                       |                      |                       |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Izobutil-acetat   |                       |                       | Toluen               |                       | Heptan               |                       |
|                   | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ | $s^2_{\text{indiv}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ | $s^2_{\text{indiv}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ |
| PC1               | 80,92                 | 80,92                 | 99,24                | 99,24                 | 67,92                | 67,92                 |
| PC2               | 14,11                 | 95,03                 | 0,52                 | 99,76                 | 17,96                | 85,88                 |
| PC3               | 3,27                  | 98,31                 | 0,14                 | 99,90                 | 13,82                | 99,70                 |

Tijek reakcije u izobutil-acetatu, toluenu i heptanu prikazan je pomoću faktorskih bodova na Slikama 4.3–4.5 a). Na temelju faktorskih bodova procijenjeno je trajanje Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u pojedinom otapalu. Kao što se može uočiti u Tablici 4.3, reakcija u heptanu je bila najbrža, što se može objasniti manjim gubitkom katalizatora, piperidin-acetata. Reakcije u toluenu i izobutil-acetatu provedene su pri višim temperaturama što je uzrokovalo djelomično isparavanje piperidin-acetata, a time i dulje trajanje reakcije.

Tablica 4.3. Trajanje Knoevenagelove kondenzacijske reakcije pri različitim temperaturama procijenjeno na temelju PC1 faktorskih bodova za Ramanove spektre *in-line*.

| Otapalo         | $t / \text{min}$ | $\vartheta / ^\circ\text{C}$ |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| Izobutil-acetat | $50 \pm 3$       | 120                          |
| Toluen          | $46 \pm 2$       | 110                          |
| Heptan          | $30 \pm 3$       | 90                           |

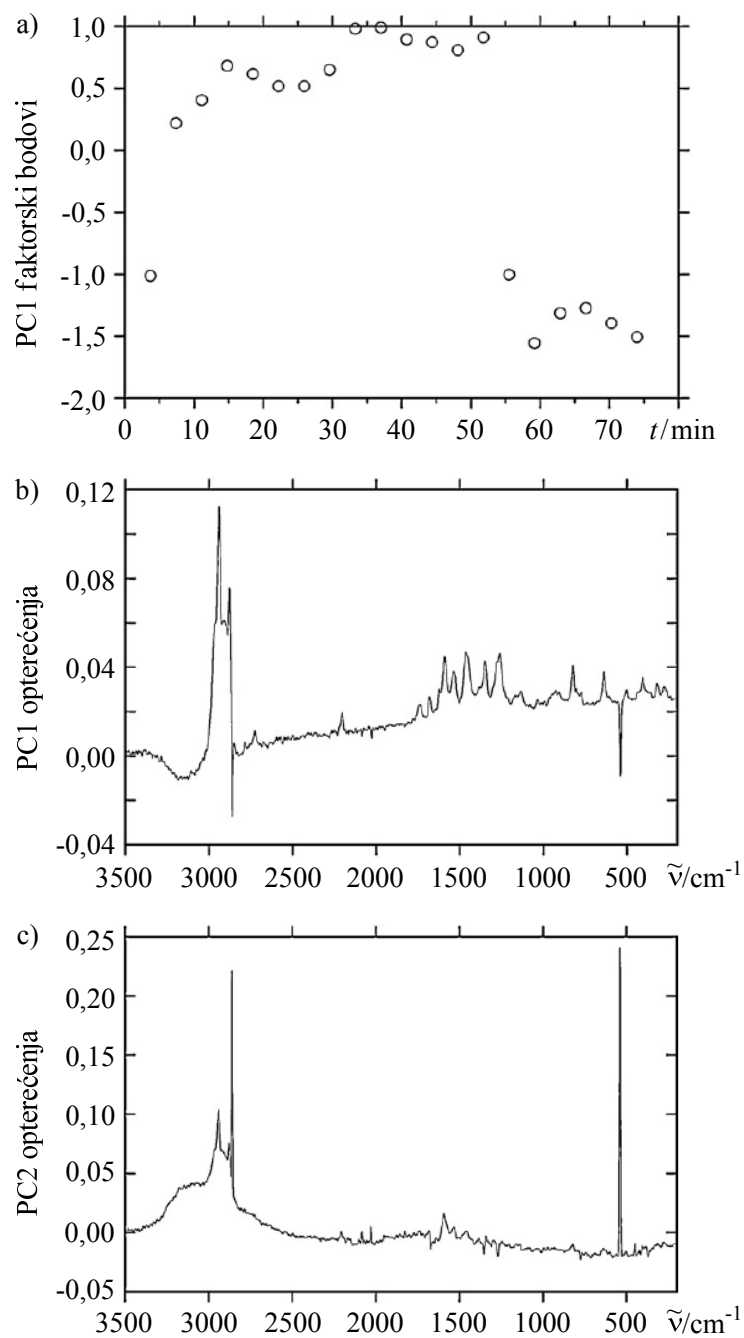
Faktorski bodovi za Ramanove spektre *in-line* snimljene tijekom reakcije u izobutil-acetatu odgovaraju opterećenjima na Slici 4.3 b). Pozitivan signal pri  $2205 \text{ cm}^{-1}$  odgovara vibraciji  $\text{C}\equiv\text{N}$  istezanja koja je prisutna u Ramanovim spektrima oba izomera entakapona. Pojava navedene vrpce te dodatnih vrpce pri  $1592 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1214 \text{ cm}^{-1}$  i  $1166 \text{ cm}^{-1}$  potvrdila je nastanak produkata. Slabe vrpce pri  $\approx 1450 \text{ cm}^{-1}$  i  $\approx 897 \text{ cm}^{-1}$  u PC1 i PC2 opterećenjima (Slike 4.3 b) i c)) ukazale su na prisutnost *Z*- izomera entakapona.

Slične vrpce mogu se uočiti u PC1 i PC2 opterećenjima za Ramanove spektre *in-line* snimljene u toluenu i heptanu (Slika 4.4 odnosno 4.5 b)). Pojava vrpce  $\text{C}\equiv\text{N}$  istezanja na približno  $2200 \text{ cm}^{-1}$  nedvojbeno je potvrdila nastanak entakapona u svim korištenim otapalima.

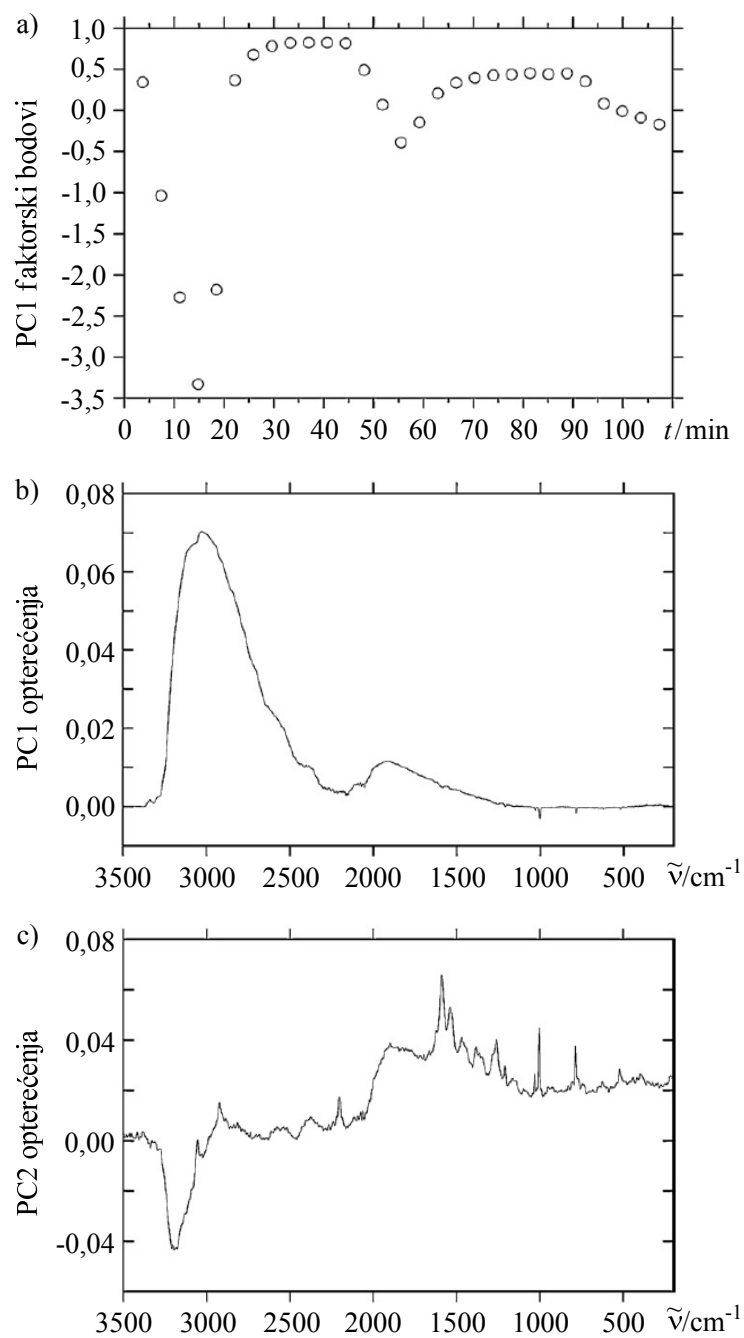
#### 4.1.5. Identifikacija reakcijskih produkata *off-line*

Nakon završetka reakcije, dobiveni produkti su izolirani dodatkom klorovodične kiseline te odvojeni filtracijom. Kristalnim produktima snimljeni su Ramanovi spektri *off-line*. Analizom Ramanovih spektara *off-line* utvrđeno je da *E*- izomer entakapona u svim otapalima kristalizira pretežito u polimorfnom obliku A kao što je spomenuto u uvodnom dijelu.

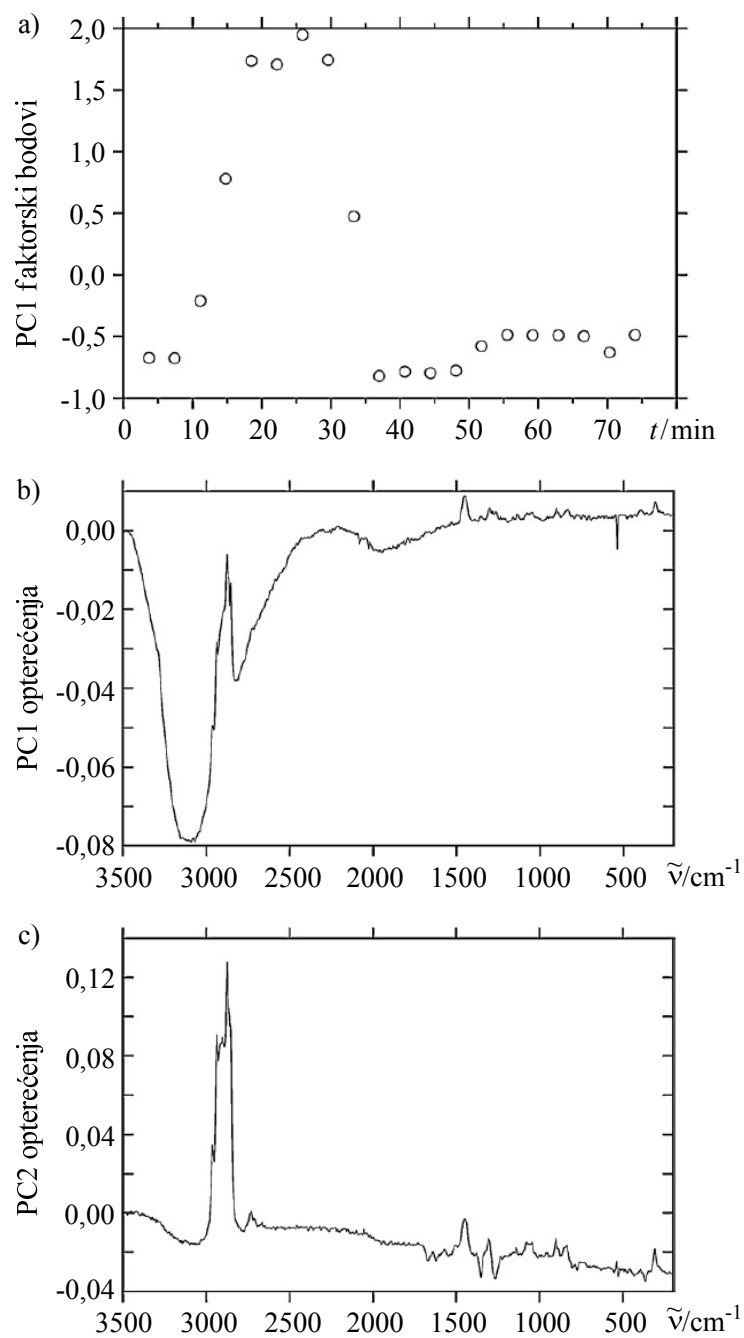
Da bi se usporedili rezultati dobiveni Ramanovom spektroskopijom *in-line*, nastanak reakcijskih produkata praćen je i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC).<sup>24</sup> Uzorci reakcijske smjese analizirani su pomoću HPLC-a, u vremenskim razmacima od 10 min.



Slika 4.3. a) PC1 faktorski bodovi te b) PC1 i c) PC2 opterećenja za skup od 20 Ramanovih spektara *in-line* tijekom Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u izobutil-acetatu.<sup>24</sup>

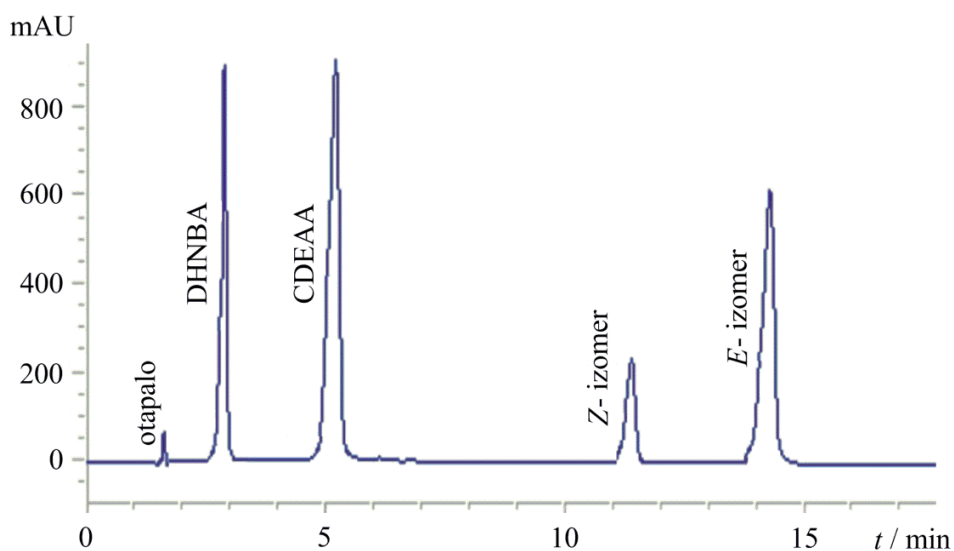


Slika 4.4. a) PC1 faktorski bodovi te b) PC1 i c) PC2 opterećenja za skup od 20 Ramanovih spektara *in-line* tijekom Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u toluenu.<sup>24</sup>



Slika 4.5. a) PC1 faktorski bodovi te b) PC1 i c) PC2 opterećenja za skup od 20 Ramanovih spektara *in-line* tijekom Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u heptanu.<sup>24</sup>

Usporedbom kromatografskih signala produkata s vremenima zadržavanja standarda, zaključeno je da su reakcijom nastala oba izomera entakapona, što je u skladu s podacima dobivenima *in-line* (Slika 4.6). Na temelju površina kromatografskih signala izračunat je omjer *E*- i *Z*- izomera u heptanu, toluenu i izobutil acetatu koji je iznosio 2,2:1, 2:1 odnosno 2,3:1.



Slika 4.6. Kromatogrami *off-line* uzorka reakcijske smjese analiziranog 40 min nakon početka kemijske reakcije u izobutil-acetatu.<sup>24</sup>

## 4.2. Kristalizacija entakapona

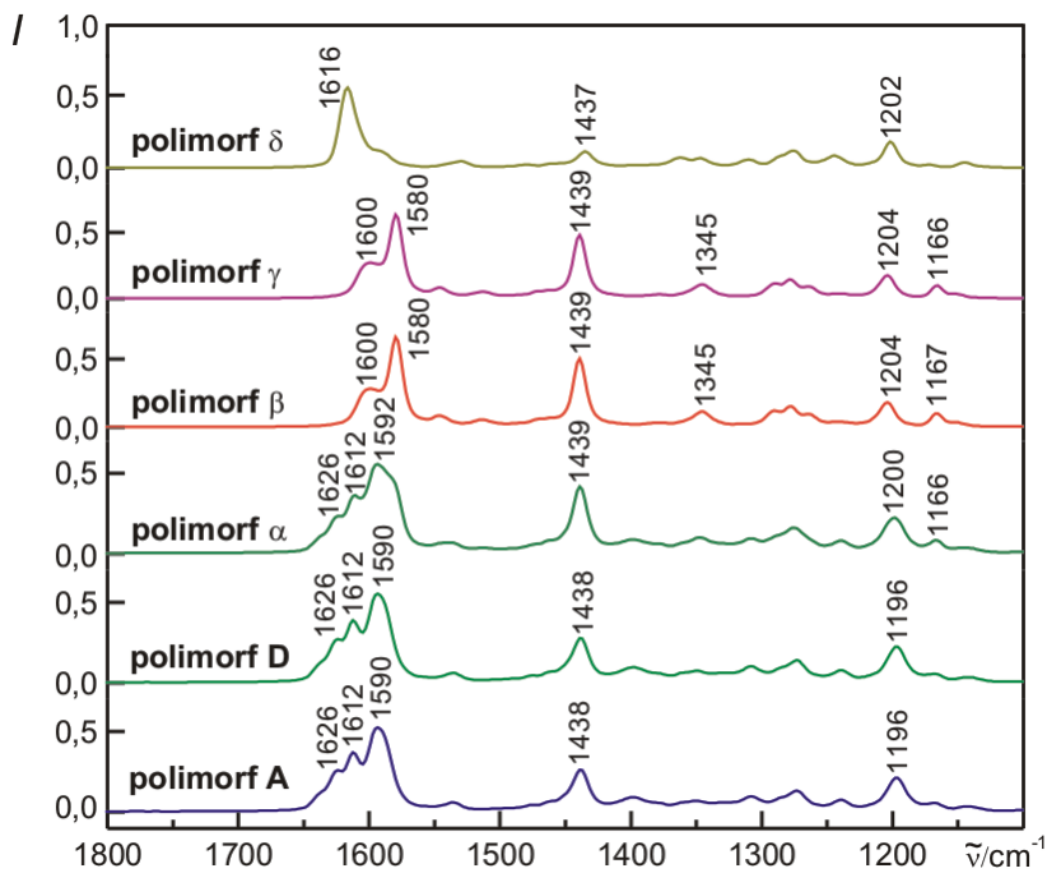
Prijašnja istraživanja su pokazala da se kristali oba izomera entakapona pojavljuju u različitim polimorfnim oblicima, od kojih su identificirani polimorfi A, D,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ .<sup>68–71</sup> Međutim, za proučavanje kristalizacije odabran je samo *E*- izomer, koji se mogao lakše izolirati iz reakcijske smjese. Polimorfi *E*- izomera entakapona različite su termodinamičke stabilnosti. Stoga se pravilnim odabirom otapala može utjecati na udio pojedinog polimorfnog oblika u smjesi odnosno na selektivnost procesa kristalizacije.

Kristalizacija *E*- izomera entakapona u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol praćena je Ramanovom spektroskopijom *in-line* u kombinaciji s multivarijatnim metodama analize (PCA i IHM).<sup>25</sup> Entakapon (*E*- izomer, polimorf A) otopljen je u smjesama otapala aceton/voda u omjerima 30:70 i 40:60 pri 74,5 °C te toluen/metanol u omjerima 20:80 i 30:70 pri 65,0 °C uz konstantno miješanje kutnom brzinom od 200 okretaja u minuti. Otopine entakapona pripravljene u laboratorijskom reaktoru hladene su pomoću termostatisane kupelji (Slika 3.4).

Ramanovi spektri *in-line* tijekom procesa kristalizacije snimani su *in situ* pomoću sonde uronjene u dobivene otopine. Proučavan je utjecaj otapala na temperaturu kristalizacije i polimorfni sastav smjese. Nastali polimorfi identificirani su na temelju Ramanovih spektara, statističkih podataka te SAXS i WAXS spektara.

#### 4.2.1. Spektri *off-line* polimorfa *E*- izomera entakapona

Prije praćenja kristalizacije *in-line*, čisti polimorfi A, D,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  pripremljeni su u PLIVI d.o.o. te su im snimljeni Ramanovi spektri *off-line* i asignirane karakteristične vibracijske vrpce. Ramanovi spektri *off-line* čistih polimorfnih oblika prikazani su na Slici 4.7. Polimorfni oblici entakapona najviše se razlikuju u području od 1610  $\text{cm}^{-1}$  do 1100  $\text{cm}^{-1}$ . U Ramanovim spektrima polimorfa A, D i  $\alpha$  uočene su vrpce velikog intenziteta pri 1612  $\text{cm}^{-1}$  i 1590  $\text{cm}^{-1}$ , koje pripadaju vibracijama amidnog C=O odnosno aromatskog C=C istezanja. Odgovarajuće vrpce u Ramanovim spektrima polimorfa  $\beta$  i  $\gamma$  pomaknute su prema nižim vrijednostima valnih brojeva. S druge strane, vrpca aromatskog C=C istezanja u Ramanovom spektru polimorfa  $\delta$  znatno je slabijeg intenziteta i pomaknuta je prema višim frekvencijama (Slika 4.7). Vrpca CH<sub>2</sub> svijanja pri  $\approx 1438 \text{ cm}^{-1}$  zajednička je svim polimorfnim oblicima, a karakteristična je za *E*- izomer entakapona. U području spektra od 1400  $\text{cm}^{-1}$  do 1100  $\text{cm}^{-1}$  prisutno je nekoliko slabih vrpci koje odgovaraju vibracijama C–C, C–O i C–N istezanja.

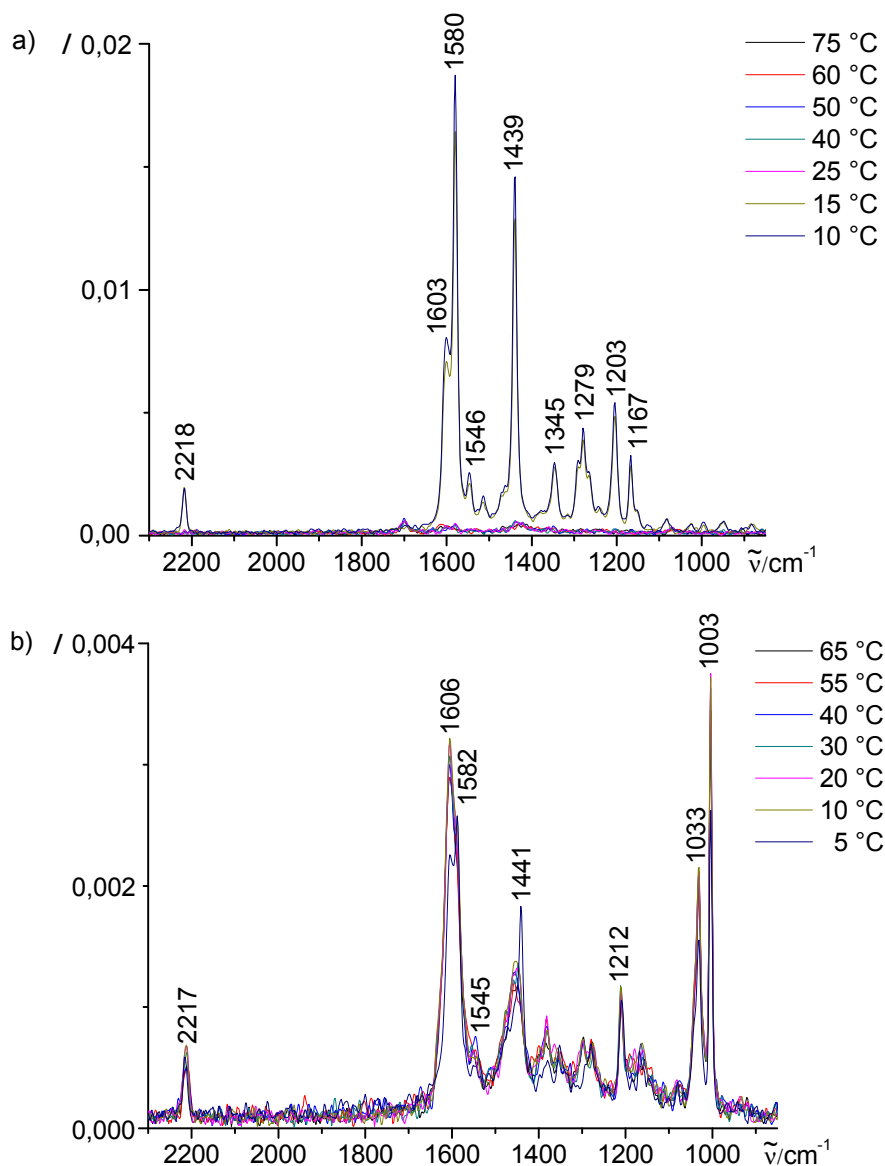


Slika 4.7. Ramanovi spektri *off-line* čistih polimorfa entakapona u području od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2. Praćenje kristalizacije *E*-izomera entakapona Ramanovom spektroskopijom *in-line*

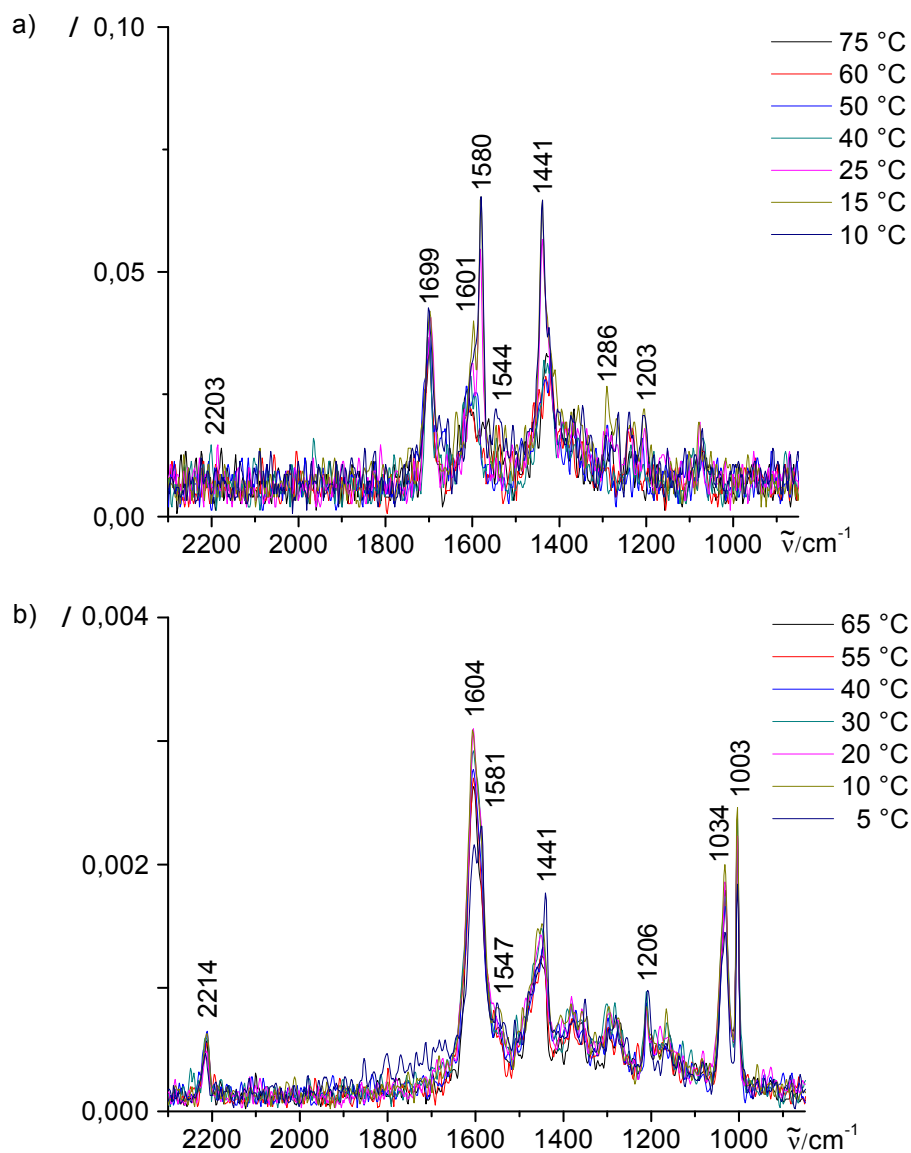
Ramanovi spektri *in-line* snimani su kontinuirano u vremenskom rasponu od 3,7 min, odnosno pri temperaturama izračunatima iz jednažbi 3.1 i 3.2. Reprezentativni Ramanovi spektri *in-line* tijekom kristalizacije entakapona u smjesama otapala aceton/voda 40:60 i toluen/metanol 30:70 te aceton/voda 30:70 i toluen/metanol 20:80 prikazani su na Slici 4.8 odnosno 4.9. Početak kristalizacije entakapona označila je pojava karakterističnih Ramanovih vrpci *in-line*.

Vibracijske vrpce pri  $\approx 2200\text{ cm}^{-1}$ ,  $\approx 1600\text{ cm}^{-1}$  i  $\approx 1580\text{ cm}^{-1}$ , koje se pojavljuju tijekom kristalizacije u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol (Slike 4.8 i 4.9), odgovaraju  $\text{C}\equiv\text{N}$ , amidnom  $\text{C}=\text{O}$  odnosno aromatskom  $\text{C}=\text{C}$  istezanju. Nadalje, pojava vrpci asimetričnog  $\text{N}-\text{O}$  istezanja te  $\text{CH}_2$  svijanja pri  $\approx 1545\text{ cm}^{-1}$  odnosno  $\approx 1440\text{ cm}^{-1}$  potvrdila je nastanak kristala entakapona u proučavanim otopinama.<sup>24</sup>



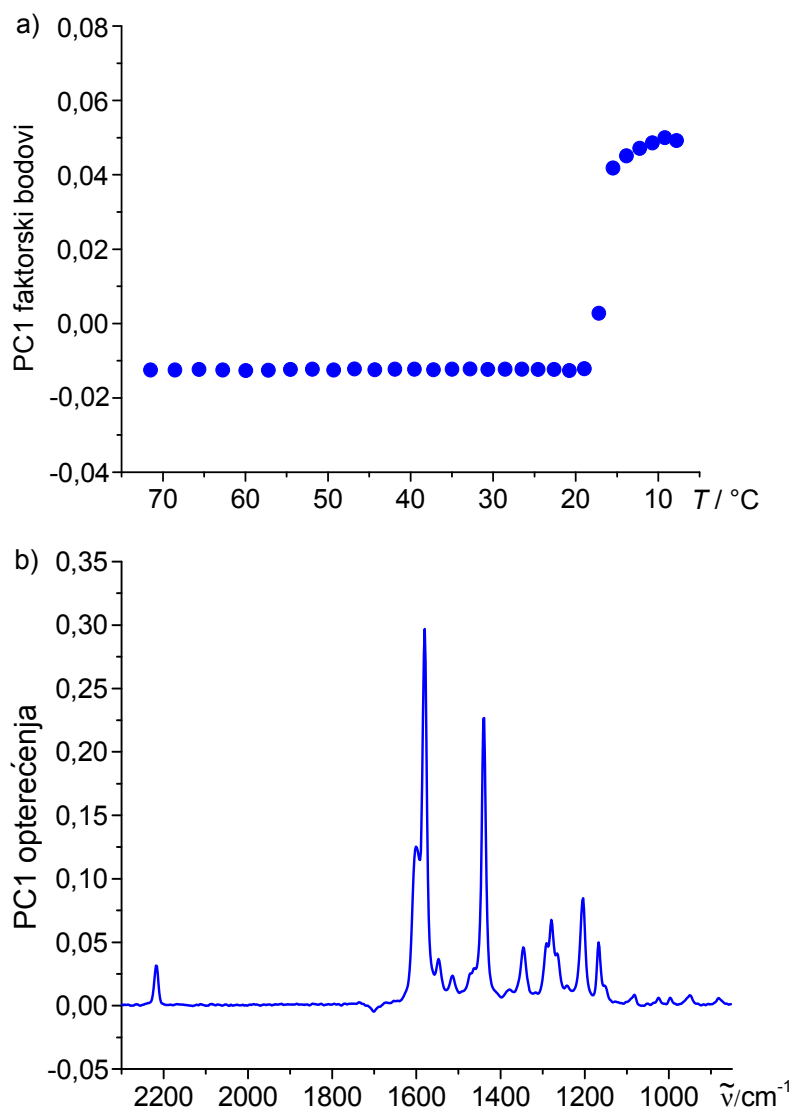
Slika 4.8. Reprezentativni Ramanovi spektri *in-line* snimljeni tijekom kristalizacije entakapona u smjesama otapala a) aceton/voda 40:60 i b) toluen/metanol 30:70.<sup>25</sup>

Međutim, nizak omjer signala i šuma te znatno preklapanje vrpci onemogućili su nedvojbeno određivanje temperatura kristalizacije na temelju Ramanovih spektara *in-line*. Stoga je za analizu spektara i asignaciju preostalih vibracijskih vrpci primijenjena metoda PCA.

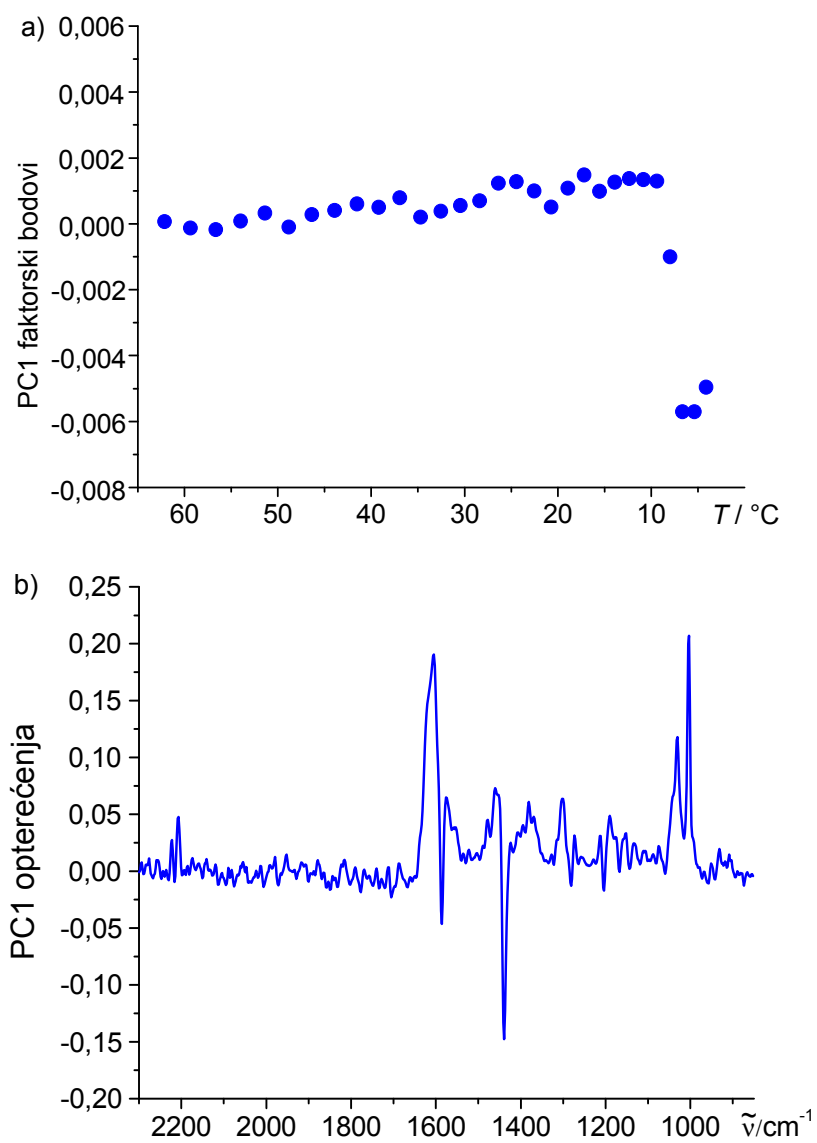


Slika 4.9. Reprezentativni Ramanovi spektri *in-line* snimljeni tijekom kristalizacije entakapona u smjesama otapala a) aceton/voda 30:70 i b) toluen/metanol 20:80.<sup>25</sup>

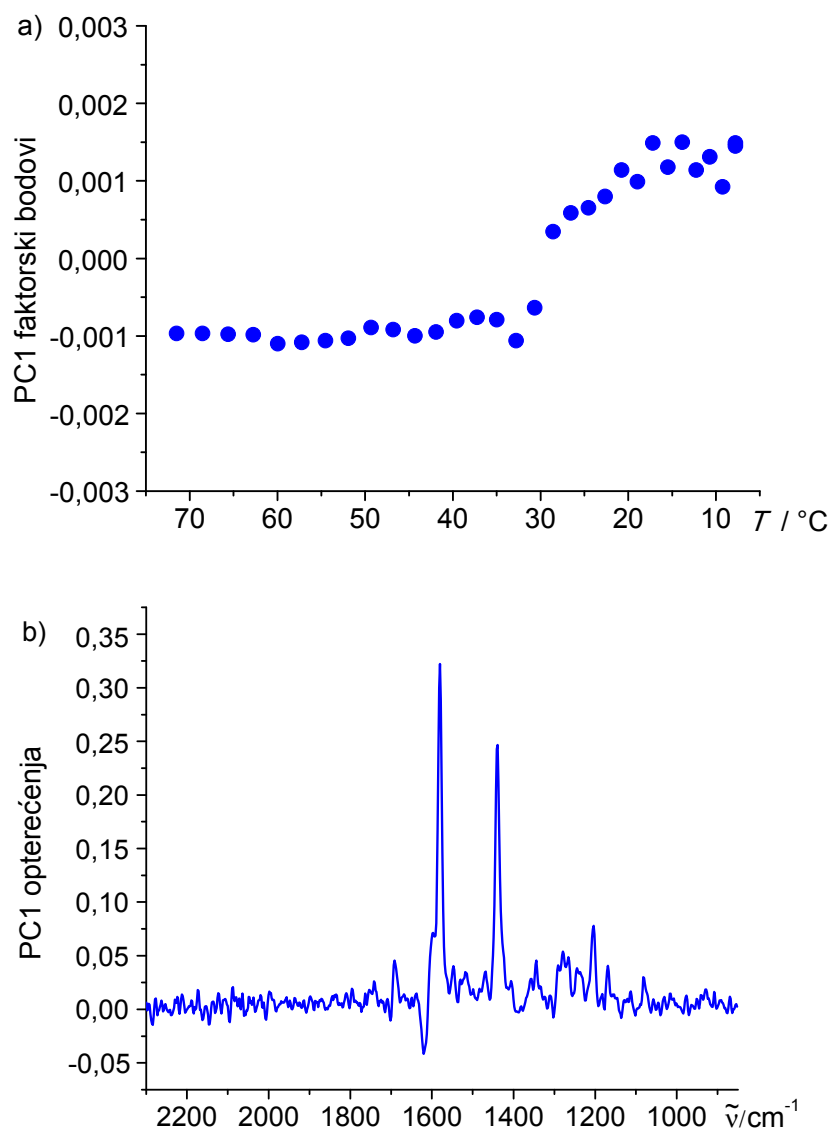
Faktorski bodovi i opterećenja za Ramanove spektre *in-line* snimljene tijekom kristalizacije entakapona u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol prikazani su na Slikama 4.10–4.13.



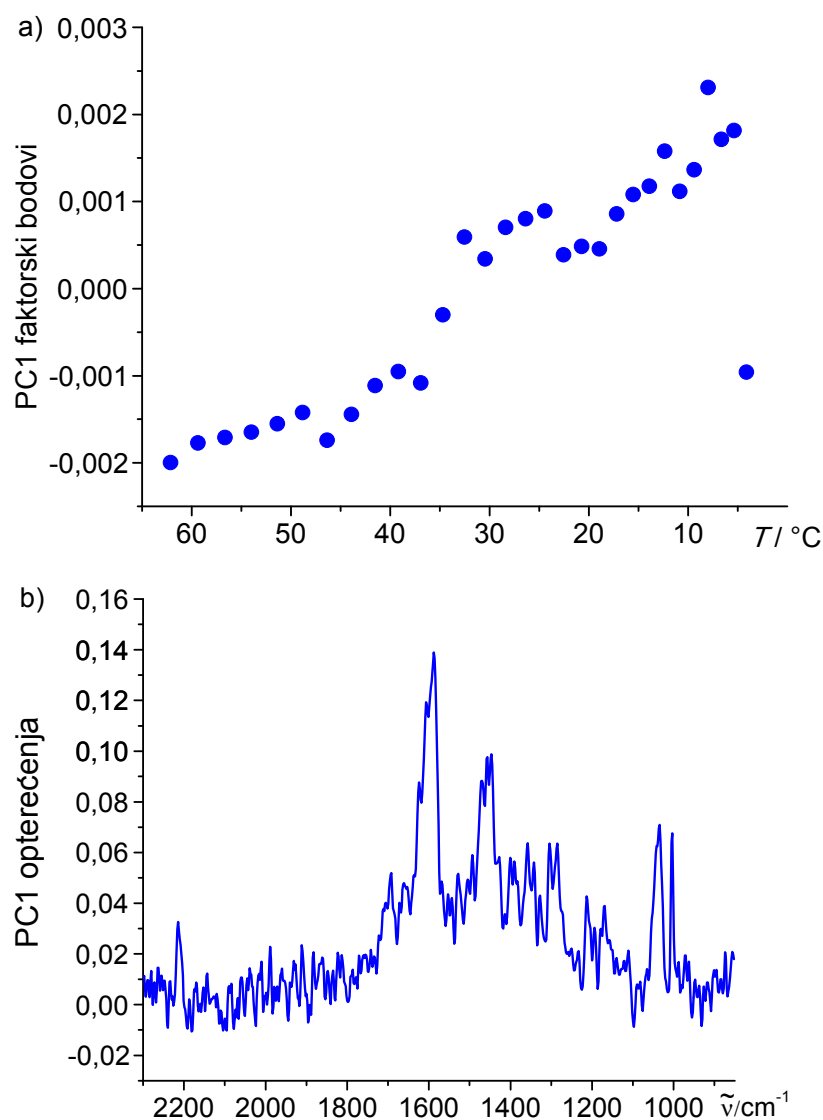
Slika 4.10. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 30 Ramanovih spektara *in-line* tijekom kristalizacije entakapona u smjesi otapala aceton/voda 40:60.<sup>25</sup>



Slika 4.11. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 30 Ramanovih spektara *in-line* tijekom kristalizacije entakapona u smjesi otapala toluen/metanol 30:70.<sup>25</sup>



Slika 4.12. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 30 Ramanovih spektara *in-line* tijekom kristalizacije entakapona u smjesi otapala aceton/voda 30:70.<sup>25</sup>



Slika 4.13. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 30 Ramanovih spektara *in-line* tijekom kristalizacije entakapona u smjesi otapala toluen/metanol 20:80.<sup>25</sup>

Najveći dio varijance podataka u svim otapalima bio je opisan prvom glavnom komponentom, PC1 (Tablica 4.4). Stoga je za prikaz procesa kristalizacije korištena samo PC1. Temperature kristalizacije određene su na temelju faktorskih bodova i navedene u Tablici 4.5.

Tablica 4.4. Individualne ( $s^2_{\text{indiv.}}$ ) i kumulativne ( $s^2_{\text{kumul.}}$ ) varijance opisane glavnim komponentama za Ramanove spektre *in-line* snimljene tijekom kristalizacije entakapona.

| Udio varijance, %     |                       |                       |                       |       |                       |                       |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Aceton/voda           |                       |                       |                       |       | Toluen/metanol        |                       |                       |                       |
| 30:70 <sup>a</sup>    |                       | 40:60 <sup>a</sup>    |                       |       | 30:70 <sup>a</sup>    |                       | 20:80 <sup>a</sup>    |                       |
| $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ |       | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ |
| PC1                   | 57,06                 | 57,06                 | 99,67                 | 99,67 | 56,21                 | 56,21                 | 44,94                 | 44,94                 |
| PC2                   | 15,02                 | 72,08                 | 0,29                  | 99,96 | 5,96                  | 62,17                 | 14,18                 | 59,12                 |

<sup>a</sup> volumni omjer

Kao što se može uočiti iz faktorskih bodova na Slikama 4.10 i 4.11 a), kristalizacija entakapona u smjesi toluena i metanola 30:70 započela je na nižoj temperaturi ( $\approx 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u usporedbi sa smjesom acetona i vode 40:60 ( $\approx 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ovaj podatak ukazao je na različit utjecaj omjera otapala na temperaturu kristalizacije. S druge strane, u smjesama otapala aceton/voda 30:70 i toluen/metanol 20:80 (Slike 4.12 i 4.13), entakapon je kristalizirao pri  $\approx 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  odnosno  $\approx 9\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Procijenjene temperature kristalizacije bile su proporcionalne volumnom udjelu vode odnosno metanola u smjesi, što je rezultat slabe topljivosti entakapona u navedenim otapalima. Svi eksperimenti ponovljeni su nekoliko puta kako bi se odredila točnost mjerenja.

Tablica 4.5. Temperature kristalizacije entakapona u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol procijenjene na temelju faktorskih bodova za Ramanove spektre *in-line*.<sup>25</sup>

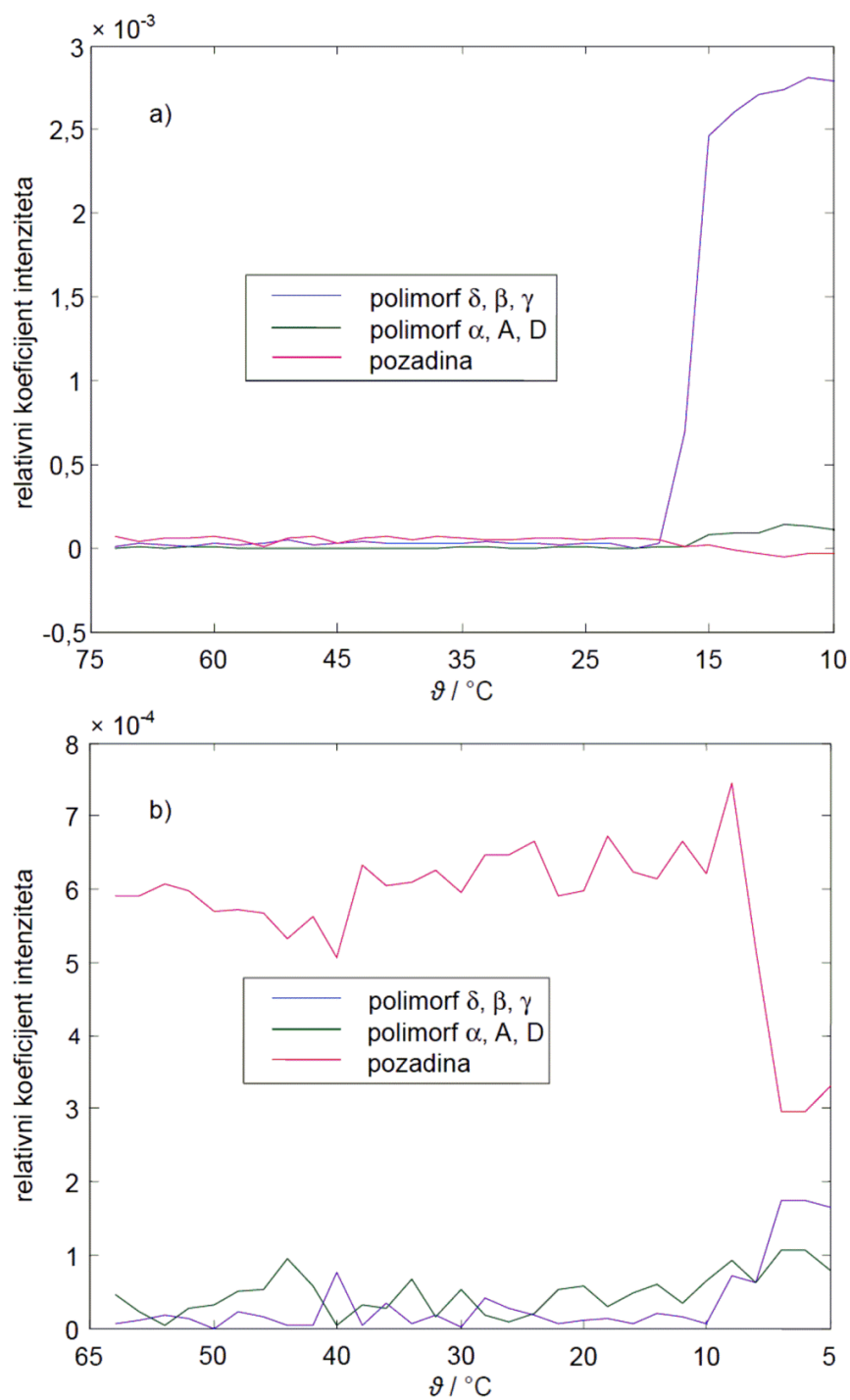
| Smjesa otapala                    | $g / ^{\circ}\text{C}$ |
|-----------------------------------|------------------------|
| Aceton/voda 30:70 <sup>a</sup>    | $30 \pm 3$             |
| Aceton/voda 40:60 <sup>a</sup>    | $18 \pm 2$             |
| Toluen/metanol 30:70 <sup>a</sup> | $7 \pm 2$              |
| Toluen/metanol 20:80 <sup>a</sup> | $9 \pm 2$              |

<sup>a</sup> volumni omjer

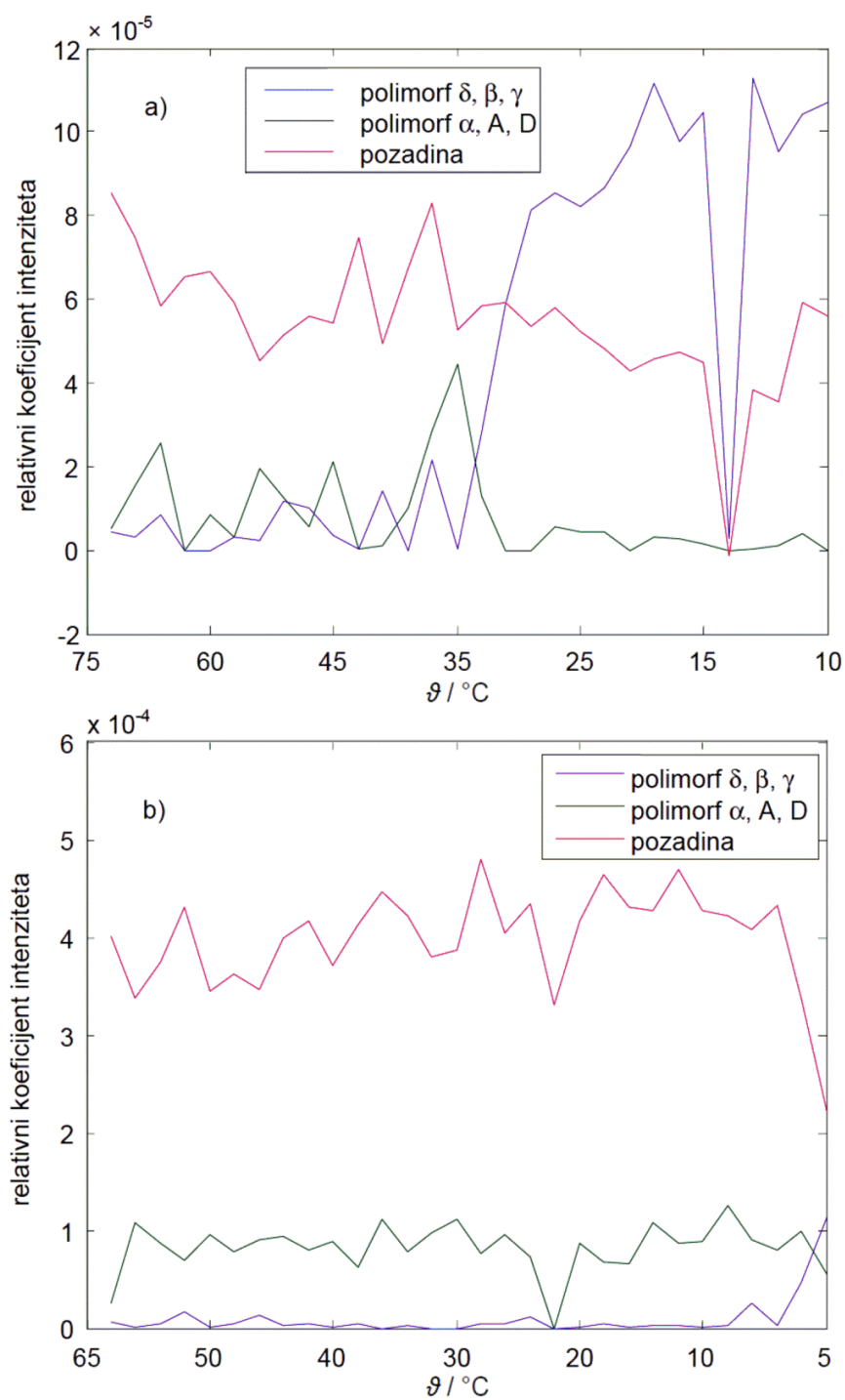
Vrpce koje odgovaraju faktorskim bodovima na Slici 4.10 a) prikazane su kao opterećenja na Slici 4.10 b). Vibracijske vrpce  $C\equiv N$ , amidnog  $C=O$  te aromatskog  $C=C$  istezanja prisutne u Ramanovim spektrima *in-line* (Slika 4.8 a)) pojavljuju se kao pozitivni signali pri  $2218\text{ cm}^{-1}$ ,  $1602\text{ cm}^{-1}$  odnosno  $1581\text{ cm}^{-1}$ . Signal velikog intenziteta pri  $1442\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibraciji svijanja  $CH_2$  skupine, čiji se intenzitet povećava tijekom kristalizacije. Prisutnost dodatnih signala pri  $1376\text{ cm}^{-1}$ ,  $1278\text{ cm}^{-1}$  i  $1202\text{ cm}^{-1}$  potvrdila je nastanak kristala entakapona. Slične vrpce uočene su i u ostalim otapalima (Slike 4.11–4.13 b)). Kristalizacija u smjesi otapala toluen/metanol 30:70 (Slika 4.11 b)) uzrokovala je pojavu pozitivnih odnosno negativnih vrpcei  $C\equiv N$  istezanja i  $CH_2$  svijanja karakterističnih za entakapon.<sup>24</sup>

Polimorfni sastav dobivenih kristala preliminarno je procijenjen na temelju analize Ramanovih spektara *in-line*. Kao što se može uočiti na Slici 4.8 a), Ramanove vrpce pri  $\approx 1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $\approx 1580\text{ cm}^{-1}$  i  $\approx 1345\text{ cm}^{-1}$  pojavile su se tijekom kristalizacije entakapona u smjesi otapala aceton/voda 40:60. Ove vrpce karakteristične su za polimorfe  $\beta$  i  $\gamma$  te su ukazale na njihovu prisutnost u uzorku (Slika 4.7). Identifikacija polimorfa Ramanovih spektroskopijom *in-line* u ostalim otapalima nije bila moguća zbog niskog omjera signala i šuma te preklapanja vrpcei. Da bi se točnije procijenio polimorfni sastav kristala, primijenjena je metoda IHM.

Ramanovi spektri *in-line* aproksimirani su linearnom kombinacijom modela čistih komponenti korištenjem postupka IHM (Slika 2.9). Za svaki polimorf izračunat je relativni koeficijent intenziteta proporcionalan njegovoj koncentraciji u smjesi. Vremenska ovisnost relativnih koeficijenata intenziteta tijekom kristalizacije u smjesi otapala aceton/voda 40:60 prikazana je na Slici 4.14 a). Zbog velike sličnosti Ramanovih spektara *in-line* polimorfa  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ , njihove koncentracije prikazane su kao zbroj pojedinačnih relativnih koeficijenata intenziteta. Isto vrijedi i za koncentracije polimorfa A, D i  $\alpha$ , kojima odgovara zajednički relativni koeficijent intenziteta. Navedeni koeficijent se tijekom kristalizacije nije mijenjao te je stoga zaključeno da uzorak ne sadrži polimorfne oblike A, D i  $\alpha$  (Slika 4.14 a)). S druge strane, relativni koeficijent intenziteta za polimorfe  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  povećao se tijekom kristalizacije u smjesi otapala aceton/voda 40:60, što je ukazalo na prisutnost barem jednog od ova tri polimorfa.



Slika 4.14. Relativni koeficijenti intenziteta za različite polimorfe entakapona tijekom kristalizacije u smjesama otapala a) aceton/voda 40:60 i b) toluen/metanol 30:70.<sup>25</sup>

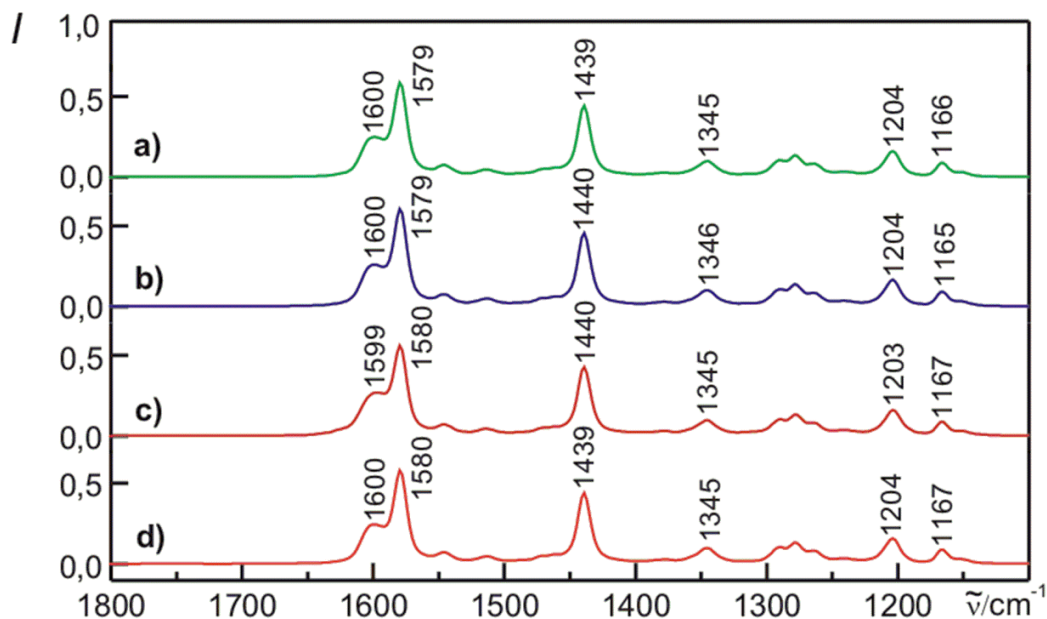


Slika 4.15. Relativni koeficijenti intenziteta za različite polimorfe entakapona tijekom kristalizacije u smjesama otapala a) aceton/voda 30:70 i b) toluen/metanol 20:80.<sup>25</sup>

Slični rezultati dobiveni su za kristalizaciju u smjesama otapala aceton/voda 30:70 i toluen/metanol 20:80 (Slika 4.15). Međutim, u smjesi otapala toluen/metanol 30:70 porasla je vrijednost oba relativna koeficijenta intenziteta, što može biti posljedica nastanka barem dva polimorfa s različitim Ramanovim spektrima *in-line* (Slika 4.14 b)). Precizna identifikacija nastalih polimorfa nije bila moguća te su stoga uzorci dalje analizirani *off-line* pomoću Ramanove spektroskopije i tehnike SWAXS.

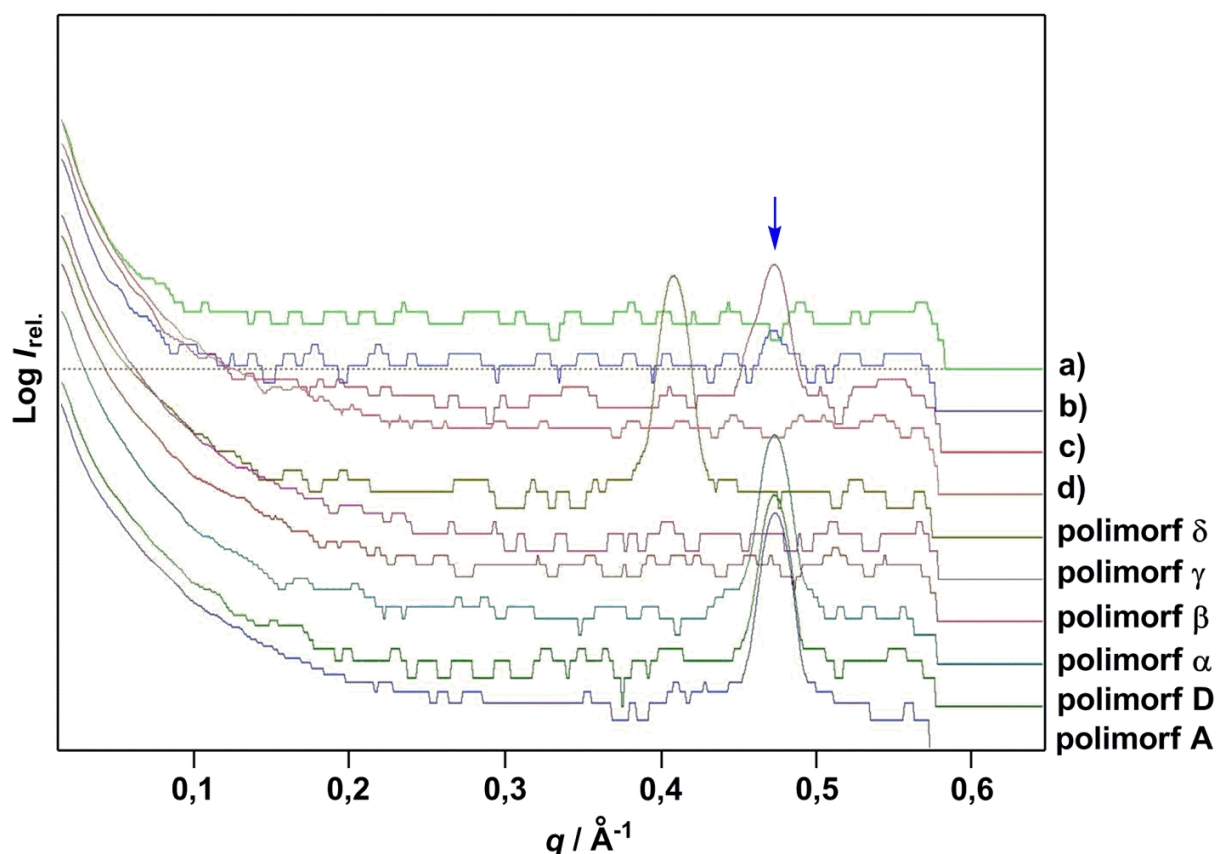
#### 4.2.3. Identifikacija polimorfa u uzorcima *off-line*

Uzorci entakapona kristalizirani u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol imaju gotovo identične Ramanove spektre *off-line*, što je rezultat sličnog polimorfnog sastava uzoraka (Slika 4.16). Intenzitet i položaj vibracijskih vrpce bio je u skladu s rezultatima *in-line* te je potvrdio prisutnost polimorfnih oblika  $\beta$  i/ili  $\gamma$  (Slika 4.7). To govori u prilog činjenici da su svi proučavani uzorci sadržavali pretežito polimorfe  $\beta$  i/ili  $\gamma$ . Daljnju karakterizaciju svih prisutnih polimorfa omogućila je SWAXS (SAXS i WAXS) analiza.



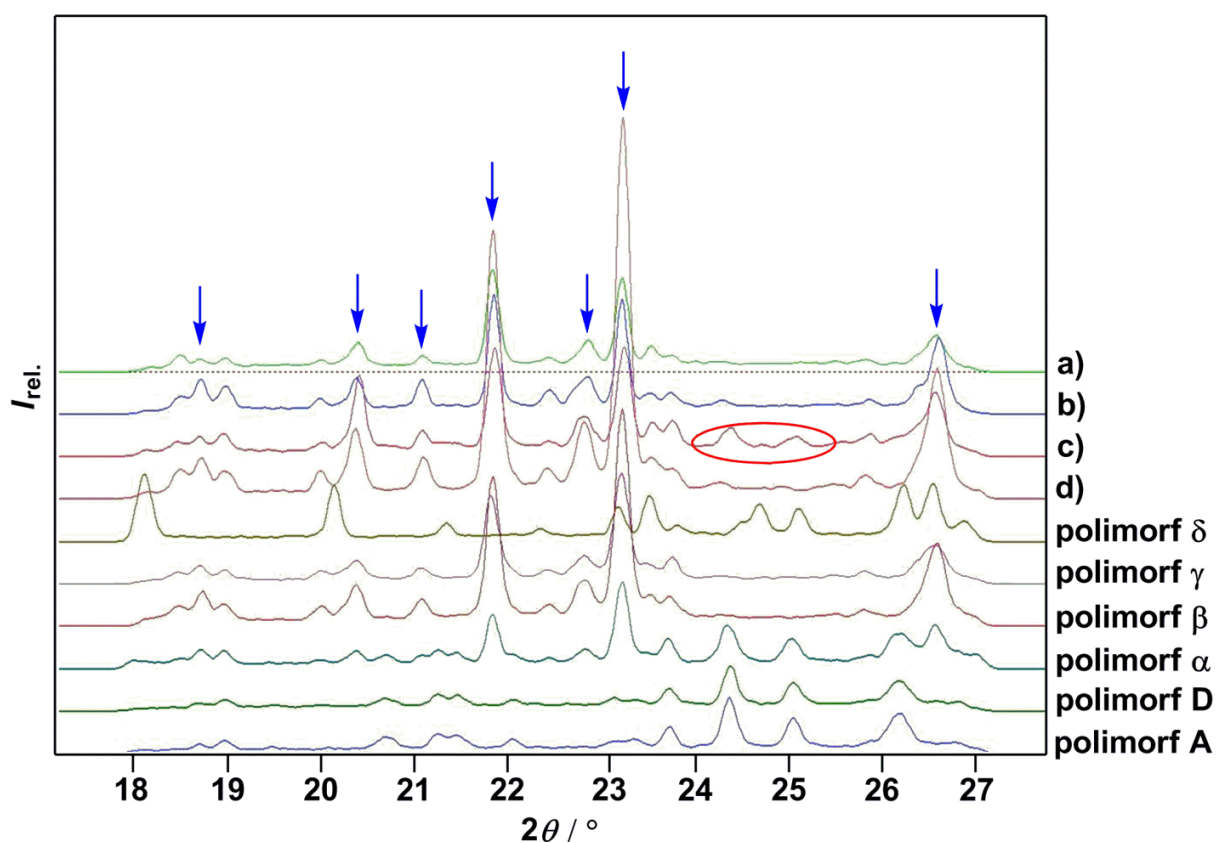
Slika 4.16 Ramanovi spektri *off-line* kristala entakapona dobivenih u smjesama otapala a) aceton/voda 40:60; b) aceton/voda 30:70; c) toluen/metanol 30:70; d) toluen/metanol 20:80 u području od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

SAXS spektri kristala entakapona dobivenih u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol uspoređeni su sa SAXS spektrima čistih polimorfni oblika. Kao što se može uočiti na Slici 4.17, polimorfi A, D i  $\alpha$  imaju zajednički signal pri  $q = 0,48$ . Signal pri  $q = 0,42$  karakterističan je za polimorf  $\delta$ , dok polimorfi  $\beta$  i  $\gamma$  nemaju signala u SAXS području. U SAXS spektru kristala entakapona dobivenih u smjesi otapala toluen/metanol 30:70 pojavljuje se signal pri  $q = 0,48$  karakterističan za polimorfe A, D i  $\alpha$  (plava strelica na Slici 4.17). Međutim, uzorci entakapona kristaliziranog u smjesama otapala aceton/voda 40:60 i 30:70 te toluen/metanol 20:80 nemaju signale u SAXS spektrima. Izostanak SAXS signala potvrdio je pretpostavku da su navedeni uzorci sadržavali polimorfe  $\beta$  i/ili  $\gamma$ .



Slika 4.17. SAXS spektri (logaritamska skala) čistih polimorfa entakapona i kristala dobivenih u smjesama otapala a) aceton/voda 40:60; b) aceton/voda 30:70; c) toluen/metanol 30:70; d) toluen/metanol 20:80. Signal karakterističan za polimorfe A, D i  $\alpha$  označen je plavom strelicom.

Polimorfni sastav kristala entakapona potvrđen je na temelju usporedbe njihovih WAXS spektara s WAXS spektrima čistih polimorfa (Slika 4.18). WAXS spektri, koji su snimani istodobno sa SAXS spektrima, prikazuju otiske prsta pojedinih polimorfnih oblika. U WAXS spektrima kristala dobivenih u smjesama otapala aceton/voda i toluen/metanol, uočeni su signali pri  $18,84^\circ$ ,  $20,23^\circ$ ,  $20,46^\circ$ ,  $21,20^\circ$ ,  $22,51^\circ$ ,  $22,92^\circ$  i  $26,61^\circ$  karakteristični za polimorfne oblike  $\beta$  i  $\gamma$  (plava strelica na Slici 4.18). Dodatni WAXS signali uzorka kristaliziranog u smjesi otapala toluen/metanol 30:70 u području od  $24,5^\circ$  do  $25,5^\circ$  mogli bi odgovarati polimorfima A, D ili  $\alpha$  (označeno crveno na Slici 4.18), što je u skladu s rezultatima SAXS analize.



Slika 4.18. WAXS spektri čistih polimorfa i kristala entakapona dobivenih u smjesama otapala a) aceton/voda 40:60; b) aceton/voda 30:70; c) toluen/metanol 30:70; d) toluen/metanol 20:80. Signali karakteristični za polimorfe  $\beta$  i  $\gamma$  označeni su plavom strelicom. WAXS otisci prsta koji odgovaraju polimorfima A, D i  $\alpha$  označeni su crveno.

Prema dobivenim podacima, kristalizacijom entakapona u smjesi otapala toluen/metanol 30:70 je, uz polimorfe  $\beta$  i/ili  $\gamma$ , nastao je i barem jedan od polimorfa A, D odnosno  $\alpha$ . S obzirom da se polimorfni oblici A, D i  $\alpha$  nisu mogli identificirati na temelju Ramanovih spektara *in-line*, može se pretpostaviti da je njihov udio u polimorfnoj smjesi bio vrlo malen. Kristalizacija u preostalim otapalima je bila selektivnija pa su dobiveni polimorfni oblici  $\beta$  i/ili  $\gamma$ . Stoga se može zaključiti da je polimorfni sastav kristala entakapona posljedica različitih svojstava i omjera korištenih otapala.

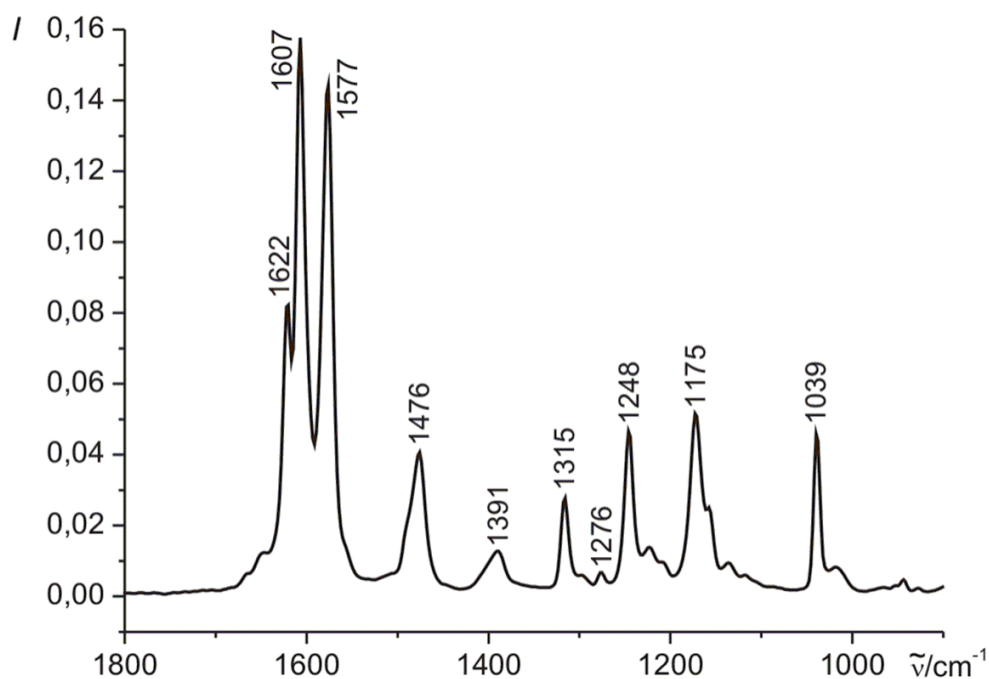
Do sada dobiveni i analizirani rezultati pokazali su da se Ramanova spektroskopija *in-line* u kombinaciji s multivarijantnim metodama analize može uspješno koristiti za praćenje sinteze i kristalizacije entakapona odnosno biološki aktivnih molekula te identifikaciju dobivenih polimorfa u realnom vremenu. Da bismo vidjeli koliki je potencijal ovakvog pristupa, testirali smo ga na realnom sustavu koji je obuhvatio sintezu salicilidenskih derivata karbohidrazida. Odabirom ovog kompleksnog sustava htjeli smo istražiti može li se metodologija vibracijske spektroskopije *in-line* razvijena na djelatnoj tvari entakapon primijeniti za razlikovanje nastalih polimorfa i izomera derivata karbohidrazida u proučavanoj reakcijskoj smjesi.

### 4.3. Strukturna karakterizacija derivata karbohidrazida **1** i **2**

Reakcijom kondenzacije salicilaldehida i karbohidrazida nastaju biološki aktivni spojevi<sup>85</sup> **1** i **2** (Slike 2.22 i 2.23). Prije korištenja tehnika *in-line*, čistim spojevima **1** i **2** snimljeni su Ramanovi, IR i SWAXS spektri u čvrstom stanju te spektri NMR u otopini (<sup>1</sup>H NMR, DEPT NMR, COSY, HSQC, HMBC i NOESY) i čvrstom stanju (<sup>1</sup>H MAS i <sup>13</sup>C CP-MAS), što je omogućilo njihovu strukturnu karakterizaciju.<sup>45,86</sup>

### 4.3.1. Strukturna karakterizacija spoja 1

Ramanov spektar spoja **1** prikazan je na Slici 4.19. Karakteristične vibracijske vrpce opažene su u području od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $900\text{ cm}^{-1}$ . Vrpca velikog intenziteta pri  $1607\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibraciji C=N istezanja, dok se srednje jaka vrpca pri  $1622\text{ cm}^{-1}$  može pripisati  $\text{NH}_2$  svijanju.<sup>87</sup> Vrpce simetričnog i asimetričnog C=C istezanja benzenskog prstena nalaze se pri  $1577\text{ cm}^{-1}$  odnosno  $1476\text{ cm}^{-1}$ . U Ramanovom spektru prisutne su i vrpce pri  $1248\text{ cm}^{-1}$  i  $1039\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju vibracijama aromatskog C–H svijanja. Vibraciji C–O istezanja pripada srednje jaka vrpca pri  $1175\text{ cm}^{-1}$ , dok slaba vrpca pri  $1276\text{ cm}^{-1}$  odgovara C–N istezanju. Komplementarne vrpce mogu se uočiti u IR spektru (Slika 7.1). Vrpca karbonilnog istezanja amidne skupine pri  $1683\text{ cm}^{-1}$  velikog je intenziteta i pojavljuje se samo u IR spektru spoja **1**.



Slika 4.19. Ramanov spektar spoja **1**.

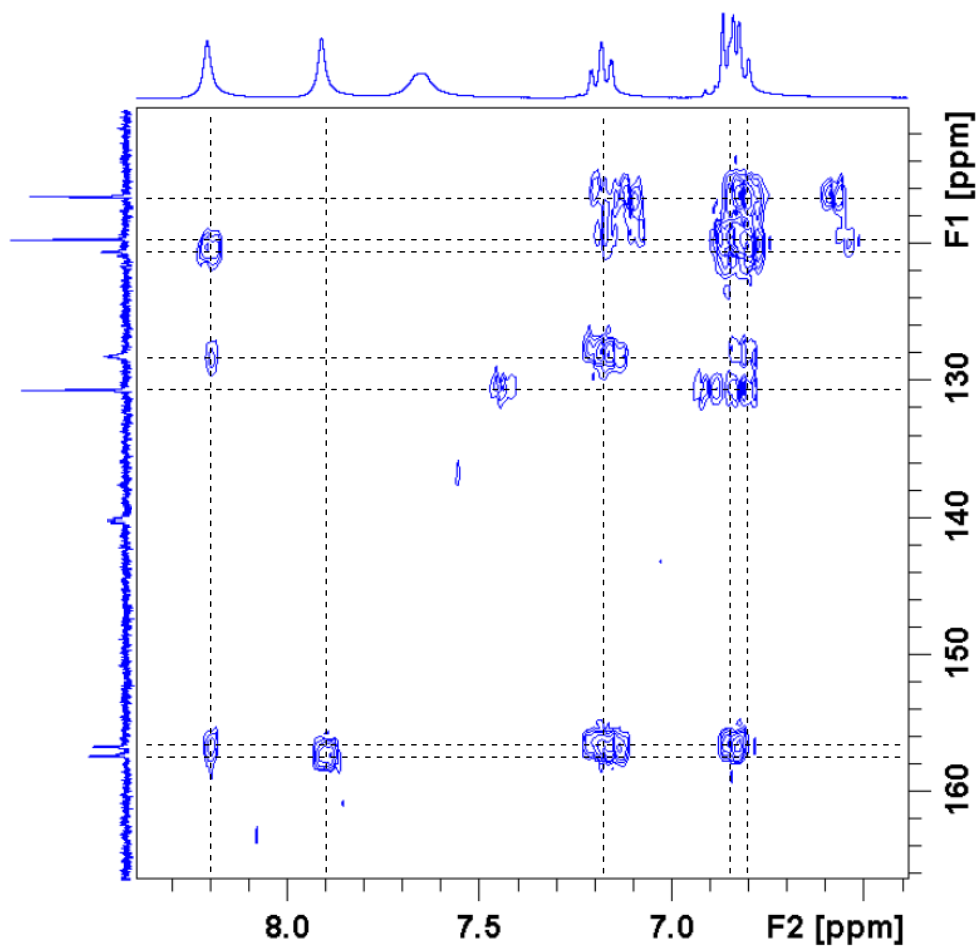
Tablica 4.6. Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpci spoja **1**.<sup>45,87</sup>

| Način vibracije                           | $\tilde{\nu}$ / $\text{cm}^{-1}$ (Raman) | $\tilde{\nu}$ / $\text{cm}^{-1}$ (IR) |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|
| $\nu(\text{C=O})_{\text{amid}}$           | —                                        | 1683                                  |
| $\delta(\text{NH}_2)$                     | 1622                                     | 1632                                  |
| $\nu(\text{C=N})$                         | 1607                                     | 1607                                  |
| $\nu(\text{C=C})_{\text{simetrično}}$     | 1577                                     | 1550                                  |
| $\nu(\text{C=C})_{\text{asimetrično}}$    | 1476                                     | 1461                                  |
| $\nu(\text{C-N})$                         | 1276                                     | 1274                                  |
| $\delta(\text{C-H})_{\text{u ravni}}$     | 1248                                     | 1246                                  |
| $\nu(\text{C-O})$                         | 1166                                     | 1175                                  |
| $\delta(\text{C-H})_{\text{izvan ravni}}$ | 1039                                     | 960                                   |

$^1\text{H}$  NMR spektru spoja **1** snimljenom u DMSO- $\text{d}_6$  prisutno je 8 signala (Slika 7.2). Široki singlet pri 4,22 ppm s integralom  $\approx 2$  odgovara protonima  $\text{NH}_2$  skupine u položaju 10. Aromatski protoni pri 6,81 ppm, 6,84 ppm, 7,18 ppm i 7,66 ppm međusobno su u sprezi, što potvrđuju i korelacije u COSY spektru (Slika 7.7). Signali pri 7,90 ppm i 8,20 ppm odgovaraju protonima izoliranih skupina koji su odsjenjeni zbog prisutnosti heteroatoma i/ili dvostruke veze. Pri 10,40 ppm može se uočiti široki singlet s integralom  $\approx 2$  koji pripada protonima vezanima za heteroatome kisika i/ili dušika.

Kemijski pomaci ugljikovih atoma u DMSO- $\text{d}_6$  asignirani su na temelju  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135 i DEPT-90 NMR spektara (Slike 7.4–7.6). U potpuno raspregnutom  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutno je 8 signala. Signali pri 120,49 ppm, 156,60 ppm i 157,30 ppm pripadaju kvarternim ugljikovim atomima te se ne pojavljuju u DEPT NMR spektrima. Signali preostalih 5 ugljikovih atoma odgovaraju CH skupinama, na što upućuju pozitivni signali pri 116,46 ppm, 119,62 ppm, 128,12 ppm, 130,61 ppm i 140,05 ppm u DEPT-135 i DEPT-90 spektrima.

HSQC korelacije (Slika 7.8) pokazuju da su navedeni ugljikovi atomi izravno vezani na protone pri 6,84 ppm, 6,81 ppm, 7,66 ppm, 7,18 ppm odnosno 8,20 ppm. S druge strane, protoni pri 4,22 ppm, 7,90 ppm i 10,40 ppm nemaju korelacije u HSQC spektru, što potvrđuje da je riječ o NH<sub>2</sub>-10, NH-9 odnosno OH i NH-7 skupini.



Slika 4.20. Aromatski dio HMBC spektra spoja **1** snimljenog u DMSO-d<sub>6</sub>.

Aromatski dio HMBC spektra prikazan je na Slici 4.20. U spektru se mogu vidjeti korelacije između aromatskih protona pri 6,81 ppm, 6,84 ppm i 7,18 ppm s CH skupinama pri 116,46 ppm, 119,62 ppm i 128,12 ppm. Signal pri 8,20 ppm u korelaciji je s kvarternim ugljikovim atomima pri 120,49 ppm i 156,60 ppm, što upućuje da se radi o protonu u  $\alpha$ -položaju u odnosu na benzenski prsten. Na temelju kemijskih pomaka te COSY i HMBC korelacija može se zaključiti da se aromatski ugljikovi atomi pri 120,49 ppm i 156,60 ppm međusobno nalaze u *orto*- položaju te da su supstituirani CH odnosno OH skupinom. Kvarterni ugljikov atom pri 157,30 ppm odgovara karbonilnoj skupini koja je u korelaciji je s NH skupinom pri 7,90 ppm.

Kemijski pomaci protona i ugljikovih atoma u DMSO- $d_6$  i DMF- $d_7$  navedeni su u Tablici 4.6. Eksperimentalne vrijednosti  $^{13}\text{C}$  NMR kemijskih pomaka u DMSO- $d_6$  uspoređene su s teorijskim vrijednostima dobivenima pomoću GIAO (engl. *gauge-independent atomic orbital*) proračuna. Dobro slaganje eksperimentalnih s teorijski izračunatim kemijskim pomacima potvrdilo je početnu asignaciju spektara NMR. Sistematska odstupanja teorijskih vrijednosti posljedica su ograničenja postavljenog računalnog modela.

Kao što je već spomenuto u prethodnom poglavlju, spoj **1** se može pojavljivati u obliku tri tautomera (**1a–1c**, Slika 2.22). Kod sva tri tautomera moguća je *cis*- / *trans*- izomerija zbog prisutnosti dvostruke veze između ugljikovog atoma u  $\alpha$ -položaju i iminskog dušika. Analiza NMR spektara govori u prilog postojanja *trans*- izomera koji je stabiliziran intramolekulskom OH... N vodikovom vezom (Slika 2.22).

Da bi se identificirale tautomerne strukture spoja **1** otopljenog u DMSO- $d_6$ , snimljeni su i analizirani COSY (Slika 7.7) odnosno NOESY spektri (Slika 4.21). Prisutnost COSY korelacija između H-9 protona i susjednog H-10 protona te NOESY korelacija između H- $\alpha$  i H-7 protona nedvojbeno je pokazala da se spoj **1** u otopini pretežito pojavljuje u obliku tautomera **1a**.

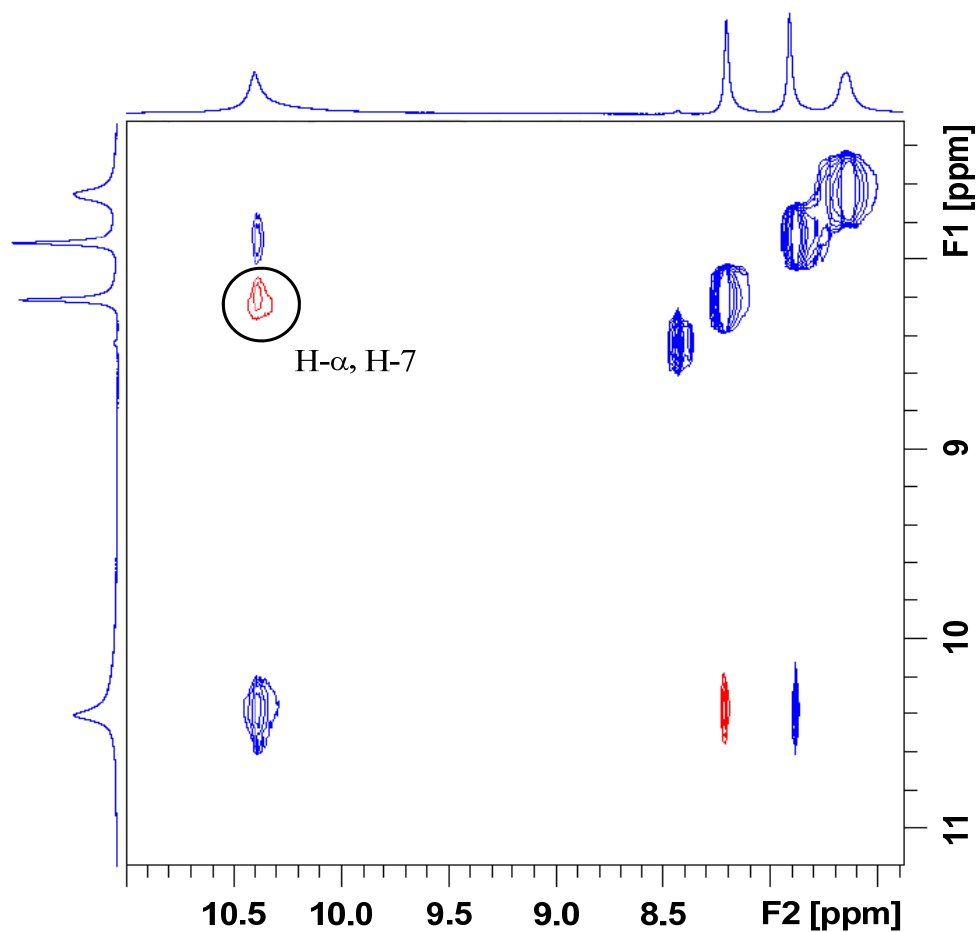
Tablica 4.7.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR kemijski pomaci spoja **1** u DMSO- $d_6$  i DMF- $d_7$  pri sobnoj temperaturi.<sup>45</sup>

| Atom     | $\delta$ / ppm (DMSO) |                 |                   | $\delta$ / ppm (DMF) |                 |
|----------|-----------------------|-----------------|-------------------|----------------------|-----------------|
|          | $^1\text{H}$          | $^{13}\text{C}$ | $^{13}\text{C}^a$ | $^1\text{H}$         | $^{13}\text{C}$ |
| $\alpha$ | 8,20                  | 140,05          | 151,37            | 8,46                 | –               |
| 1        |                       | 120,49          | 125,70            |                      | 120,01          |
| 2        |                       | 156,60          | 168,14            |                      | 157,00          |
| 3        | 6,84                  | 116,46          | 122,97            | 6,95                 | 116,25          |
| 4        | 7,18                  | 130,61          | 138,54            | 7,25                 | 130,27          |
| 5        | 6,81                  | 119,62          | 125,73            | 6,90                 | 119,22          |
| 6        | 7,66                  | 128,12          | 138,25            | 7,61                 | 128,68          |
| 7        | 10,40                 |                 |                   | 10,99                |                 |
| 8        |                       | 157,30          | 162,55            |                      | 157,24          |
| 9        | 7,90                  |                 |                   | 8,05                 |                 |
| 10       | 4,12                  |                 |                   | 4,32                 |                 |
| OH       | 10,40                 |                 |                   | 10,53                |                 |

<sup>a</sup> kemijski pomaci ugljikovih atoma u odnosu na TMS izračunati pomoću GIAO proračuna na B3LYP/6-311++G(d,p) stupnju teorije

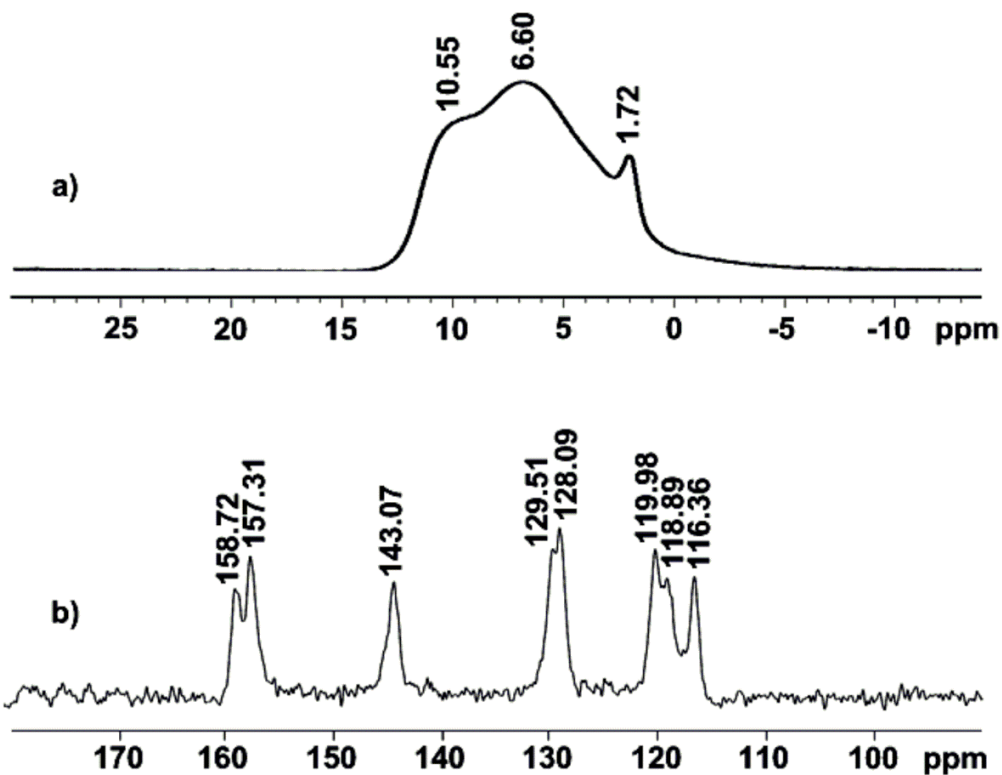
Na temelju odsjajenosti i širine protonskih signala OH, NH i  $\text{NH}_2$  skupina, može se pretpostaviti da tautomer **1a** u otopini tvori jaku intramolekulsku  $\text{OH}\cdots\text{N}$  vodikovu vezu te intermolekulske  $\text{NH}_2\cdots\text{O}$  i  $\text{NH}\cdots\text{O}$  vodikove veze s molekulama DMSO. Prisutnost navedenih vodikovih veza potvrđena je i kvantnokemijskim proračunima.<sup>45</sup>

Asignacije kemijskih pomaka spoja **1** u otopini potvrđene su na temelju NMR spektara u čvrstom stanju. U  $^1\text{H}$  MAS spektru (Slika 4.22 a)) može se uočiti široki signal u području od 3 ppm do 9 ppm s maksimumom pri 6,60 ppm koji obuhvaća aromatske, H-9 i H-10 protone. Ovaj signal je djelomično preklopljen signalom OH i H-7 protona pri 10,55 ppm. Signal pri 1,72 ppm mogao bi odgovarati metilnim protonima metanola u kojem je provedena sinteza.



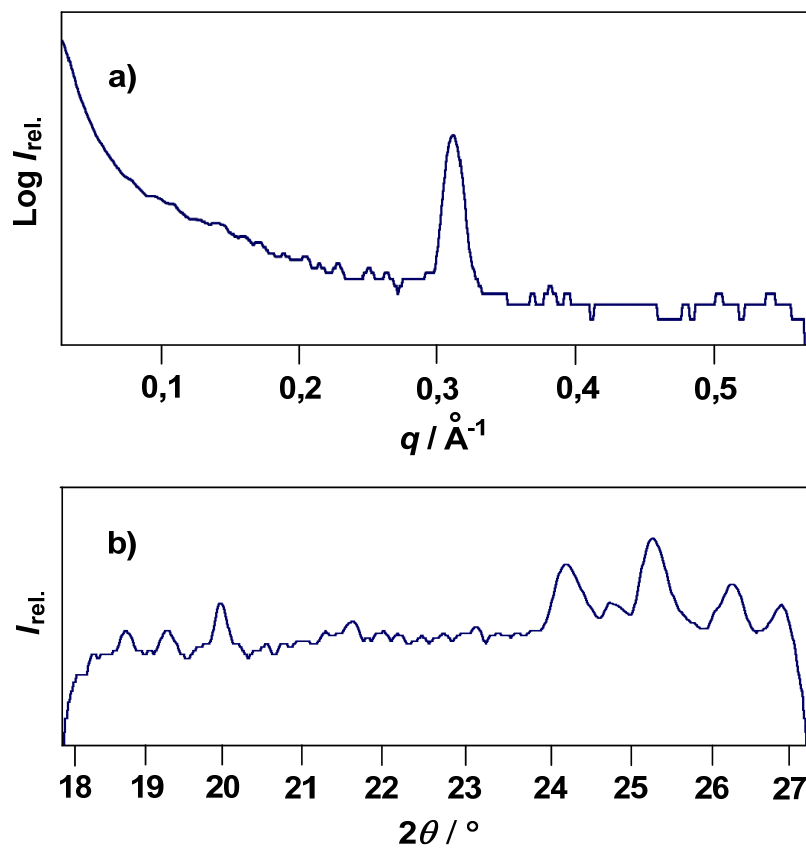
Slika 4.21. Uvećani prikaz NOESY korelacija između H- $\alpha$  i H-7 protona spoja **1**.

$^{13}\text{C}$  CP-MAS spektar spoja **1** assigniran je na temelju kemijskih pomaka ugljikovih atoma u otopini (Tablica 4.7) i prikazan na Slici 4.22 b). Signali pri 116,36 ppm, 118,89 ppm, 119,98 ppm, 128,09 ppm i 129,51 ppm odgovaraju aromatskim C-3, C-5, C-1, C-6 odnosno C-4 atomima. Pri 143,07 ppm nalazi se signal ugljikovog atoma u  $\alpha$ -položaju u odnosu na benzenski prsten. Nadalje, u spektru se mogu uočiti signali pri 157,31 ppm i 158,72 ppm koji pripadaju kvarternim ugljikovim atomima u položajima 2 i 8.



Slika 4.22. a)  $^1\text{H}$  MAS i b)  $^{13}\text{C}$  CP-MASspektar spoja **1**.

Za karakterizaciju kristala spoja **1** korištena je i tehnika SWAXS. Karakteristični signali identificirani su na temelju analize SAXS i WAXS spektara prikazanih na Slici 4.23. Kao što se može uočiti na Slici 4.23 a), u SAXS spektru se pojavljuje samo jedan signal pri  $q = 0,29$ , dok su u WAXS spektru (Slika 4.23 b)) prisutna tri jaka signala pri  $24,25^\circ$ ,  $25,25^\circ$  i  $26,06^\circ$  te signali manjeg intenziteta pri  $18,90^\circ$ ,  $20,05^\circ$ ,  $21,73^\circ$ . Navedeni signali su dalje korišteni za razlikovanje derivata **1** i **2** u kristalnim smjesama.



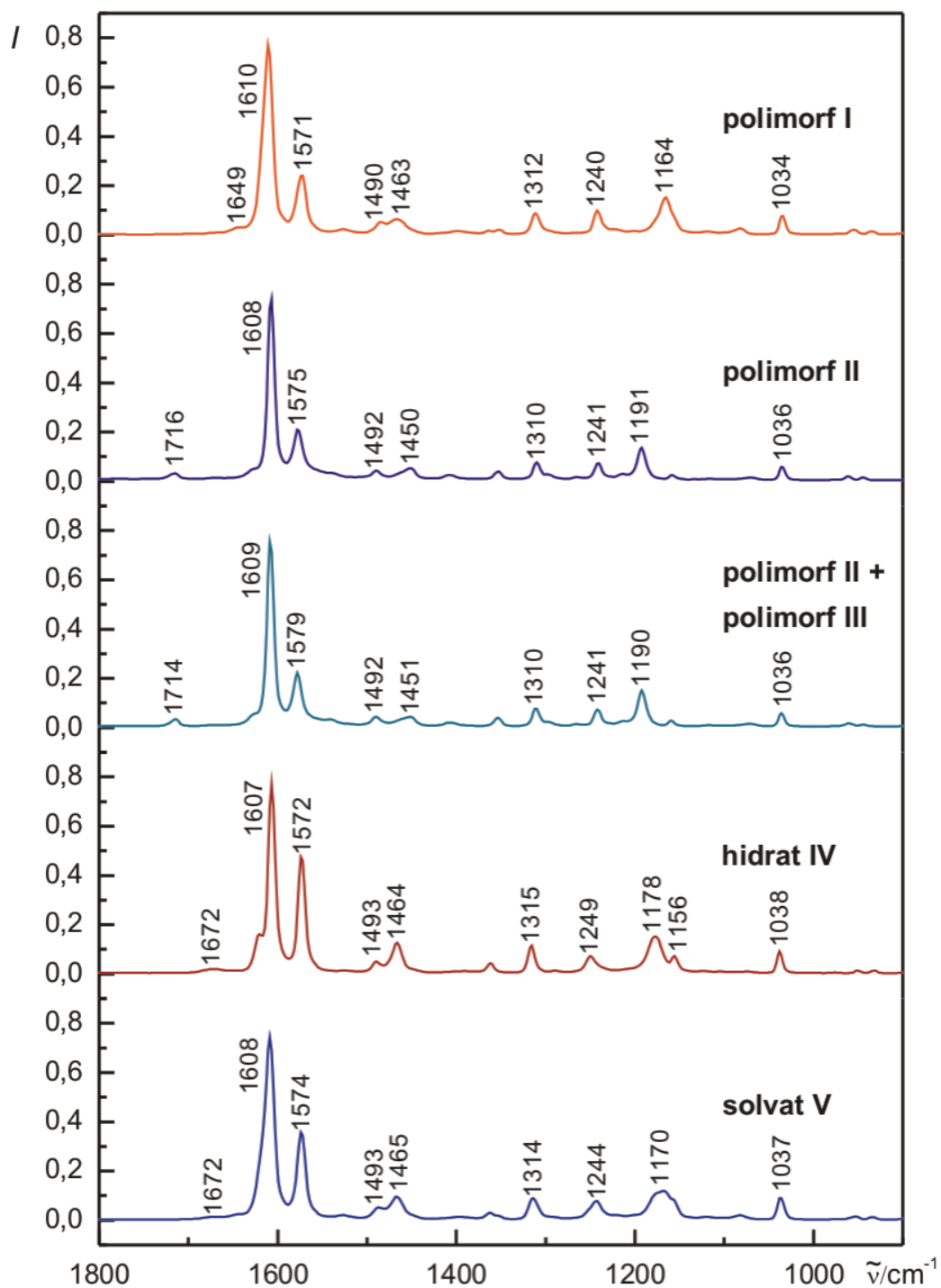
Slika 4.23. a) SAXS spektar (logaritamska skala) i b) WAXS spektar spoja **1**.

### 4.3.2. Strukturna karakterizacija spoja 2

Prijašnja istraživanja su pokazala da se disupstituirani salicilidenski derivat karbohidrazida (spoj 2) u čvrstom stanju može pojavljivati kao polimorf I, II i III, hidrat IV te di(*tert*-butanolni) solvat V.<sup>86</sup> Kristalografski oblici spoja 2 razlikuju se na temelju karakterističnih vibracijskih vrpce u području od 1800 cm<sup>-1</sup> do 900 cm<sup>-1</sup> čija je asignacija navedena u Tablici 4.8.

Ramanovi spektri kristalografskih oblika I–V spoja 2 prikazani su na Slici 4.24. Vrpce C=N i simetričnog C=C istezanja nalaze se u području od 1607 cm<sup>-1</sup> do 1610 cm<sup>-1</sup> odnosno od 1571 cm<sup>-1</sup> do 1579 cm<sup>-1</sup>. Relativni intenzitet vrpce simetričnog C=C istezanja najveći je u Ramanovom spektru hidrata IV (Slika 4.24). Slaba vrpca koja odgovara N–H svijanju nalazi se pri  $\approx 1490$  cm<sup>-1</sup>.<sup>87</sup> Položaj navedenih Ramanovih vrpce zajednički je svim kristalografskim oblicima. S druge strane, najznačajnije razlike uočene su u položaju vrpce C=O, asimetričnog C=C i C–O istezanja. Vrlo slaba Ramanova vrpca koja pripada karbonilnom istezanju polimorfa II i III nalazi se pri  $\approx 1715$  cm<sup>-1</sup>. Odgovarajuće vrpce u Ramanovim spektrima polimorfa I, hidrata IV i solvata V pomaknute su prema nižim valnim brojevima (1649 cm<sup>-1</sup>, 1672 cm<sup>-1</sup>, odnosno 1673 cm<sup>-1</sup>), što je u skladu s rezultatima rentgenske difrakcijske analize koja je ukazala na prisutnost NH $\cdots$ O=C vodikove veze u čvrstom stanju.<sup>86</sup> Vrpce asimetričnog C=C i C–O istezanja polimorfa II i III nalaze se pri  $\approx 1450$  cm<sup>-1</sup> odnosno  $\approx 1190$  cm<sup>-1</sup>. U Ramanovim spektrima polimorfa I, hidrata IV i solvata V (Slika 4.24) navedene vrpce pomaknute su prema višim (1463–1465 cm<sup>-1</sup>) odnosno nižim (1164–1178 cm<sup>-1</sup>) valnim brojevima. Nadalje, slabe vrpce u području od 1240 cm<sup>-1</sup> do 1249 cm<sup>-1</sup> te od 1034 cm<sup>-1</sup> do 1038 cm<sup>-1</sup> odgovaraju vibracijama C–H svijanja.

Vrpce u IR spektrima (Slika 7.9) odgovaraju komplementarnim Ramanovim vrpama (Tablica 4.18). Dodatne apsorpcijske vrpce u rasponu od 1266 cm<sup>-1</sup> do 1277 cm<sup>-1</sup> mogu se pripisati C–N istezanju. Apсорpcijske vrpce karbonilnog istezanja amida najvećeg su intenziteta, a nalaze se pri 1651 cm<sup>-1</sup> (polimorf I),  $\approx 1715$  cm<sup>-1</sup> (polimorfi II i III) te 1683 cm<sup>-1</sup> (hidrat IV i solvat V). Pomak vrpce C=O istezanja polimorfa I, hidrata IV i solvata V prema nižim valnim brojevima posljedica je NH $\cdots$ O=C vodikove veze u čvrstom stanju.<sup>86</sup>



Slika 4.24. Ramanovi spektri *off-line* kristalografskih oblika I–V spoja **2** u području od 1800  $\text{cm}^{-1}$  do 900  $\text{cm}^{-1}$ .

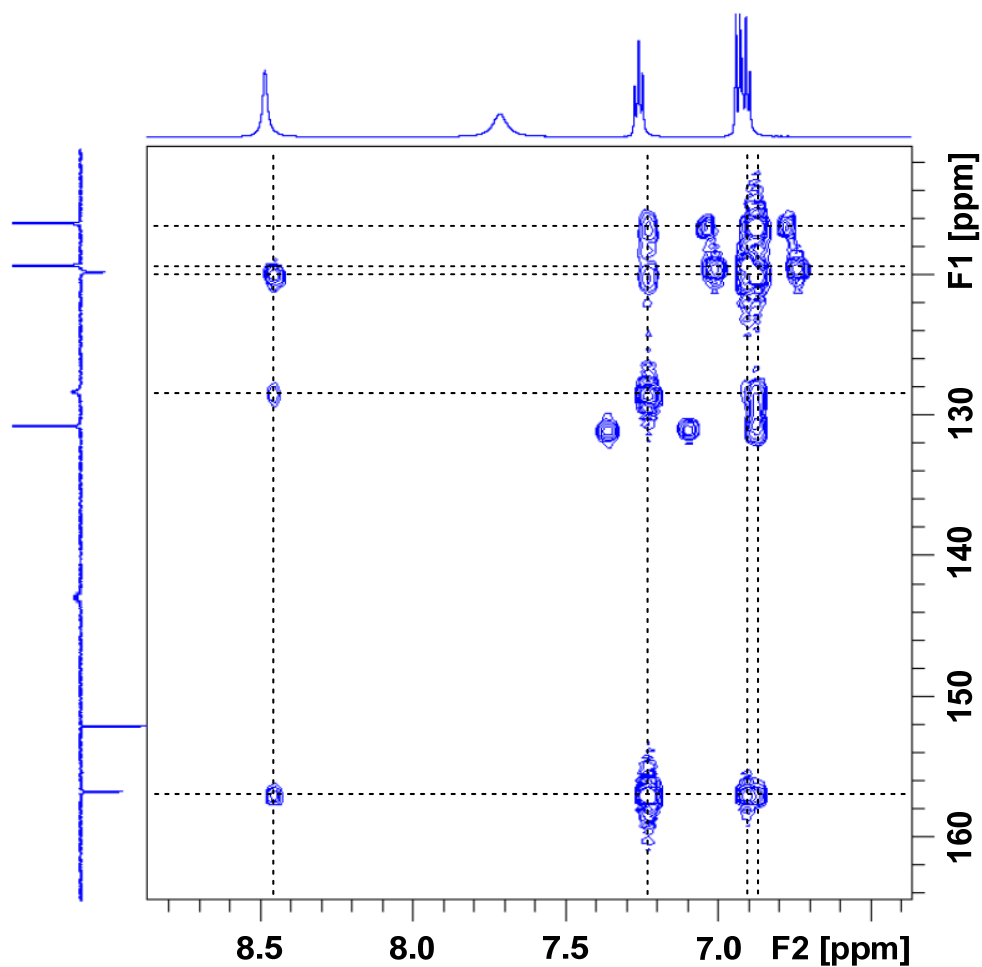
Tablica 4.8. Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpci kristalografskih oblika I–V spoja **2**.<sup>86,87</sup>

| Način vibracije                             | $\tilde{\nu}$ / cm <sup>-1</sup> (Raman) |      |      |      |      | $\tilde{\nu}$ / cm <sup>-1</sup> (IR) |      |      |      |      |
|---------------------------------------------|------------------------------------------|------|------|------|------|---------------------------------------|------|------|------|------|
|                                             | I                                        | II   | III  | IV   | V    | I                                     | II   | III  | IV   | V    |
| $\nu(\text{C=O})_{\text{amid}}$             | 1649                                     | 1716 | 1714 | 1672 | 1672 | 1651                                  | 1715 | 1714 | 1683 | 1683 |
| $\nu(\text{C=N})$                           | 1610                                     | 1608 | 1609 | 1607 | 1608 | 1618                                  | 1609 | 1610 | 1609 | 1609 |
| $\nu(\text{C=C})_{\text{simetrično}}$       | 1571                                     | 1575 | 1579 | 1572 | 1574 | 1572                                  | 1551 | 1551 | 1582 | 1573 |
| $\delta(\text{N-H})$                        | 1490                                     | 1492 | 1492 | 1493 | 1493 | 1486                                  | 1491 | 1489 | 1489 | 1493 |
| $\nu(\text{C=C})_{\text{asimetrično}}$      | 1463                                     | 1450 | 1451 | 1464 | 1465 | 1460                                  | 1460 | 1458 | 1464 | 1464 |
| $\nu(\text{C-N})$                           | —                                        | —    | —    | —    | —    | 1274                                  | 1266 | 1269 | 1270 | 1277 |
| $\delta(\text{C-H})_{\text{u ravni}}$       | 1240                                     | 1241 | 1241 | 1249 | 1244 | —                                     | 1242 | 1242 | 1250 | —    |
| $\nu(\text{C-O})$                           | 1164                                     | 1191 | 1190 | 1178 | 1170 | 1220                                  | 1189 | 1198 | 1219 | 1224 |
| $\delta(\text{C-H})_{\text{izvan ravnine}}$ | 1034                                     | 1036 | 1036 | 1038 | 1037 | 952                                   | 955  | 956  | 950  | 950  |

S obzirom da je spoj **2** simetričan, u  $^1\text{H}$  NMR spektru u otopini (Slika 7.10) prisutno je samo 6 signala čiji su kemijski pomaci navedeni u Tablici 4.9. Multipleti pri 6,90 ppm, 6,92 ppm i 7,26 ppm pripadaju međusobno spregnutim aromatskim protonima, što potvrđuju i COSY korelacije (Slika 7.14). Široki singleti pri 7,71 ppm i 8,48 ppm pripadaju protonima koji su odsjenjeni zbog prisutnosti heteroatoma i/ili dvostruke veze. Dodatni signali pri 1,10 ppm i 3,34 ppm karakteristični su za solvat V, a odgovaraju protonima metilne i hidroksilne skupine *tert*-butilnog alkohola ugrađenog u strukturu solvata. Singlet pri 10,86 ppm s integralom  $\approx 2$  pripada protonima hidroksilnih i/ili amino skupina.

Kemijski pomaci ugljikovih atoma u DMSO- $d_6$  asignirani su na temelju analize potpuno raspregnutog  $^{13}\text{C}$  i APT spektra i navedeni u Tablici 4.9. U potpuno raspregnutom  $^{13}\text{C}$  NMR spektru postoji 8 signala kemijski neekvivalentnih ugljikovih atoma (Slika 7.12). Da bi se utvrdila njihova multipletnost, snimljen je i APT spektar (Slika 7.13). Asignacijom APT spektra može se utvrditi da signali pri 120,14 ppm, 152,44 ppm i 157,12 ppm odgovaraju kvarternim ugljikovim atomima, dok signali pri 116,67 ppm, 119,65 ppm, 128,65 ppm, 131,10 ppm i 143,33 ppm pripadaju ugljikovim atomima metinskih skupina. HSQC korelacije (Slika 7.15) pokazuju da su navedeni ugljikovi atomi izravno vezani na protone pri 6,92 ppm, 6,90 ppm, 7,71 ppm, 7,26 ppm odnosno 8,48 ppm. S druge strane, protoni pri 10,86 ppm nemaju korelacije u HSQC spektru, što potvrđuje da se radi o amino i hidroksilnim skupinama.

Slika 4.25 prikazuje aromatski dio HMBC spektra spoja **2**. U spektru postoje korelacije između aromatskih protona pri 6,90 ppm, 6,92 ppm i 7,26 ppm s CH skupinama pri 116,67 ppm, 119,65 ppm, 128,65 ppm i 131,10 ppm te kvarternim ugljikovim atomima pri 120,14 ppm i 157,12 ppm. Signal pri 8,48 ppm u korelaciji je s CH skupinom pri 128,65 ppm te kvarternim ugljikovim atomima pri 120,14 ppm i 157,12 ppm, što pokazuje da je riječ o protonu u  $\alpha$ -položaju u odnosu na benzenski prsten. Na temelju vrijednosti kemijskih pomaka te COSY i HMBC korelacija može se utvrditi da su aromatski ugljikovi atomi pri 120,14 ppm i 157,12 ppm supstituirani CH odnosno OH skupinom koje se međusobno nalaze u *orto*- položaju. Kvarterni ugljikov atom pri 152,44 ppm odgovara karbonilnoj skupini čija se vrpca pojavljuje u IR i Ramanovom spektru.



Slika 4.25. Aromatski dio HMBC spektra spoja **2** snimljenog u DMSO- $d_6$ .

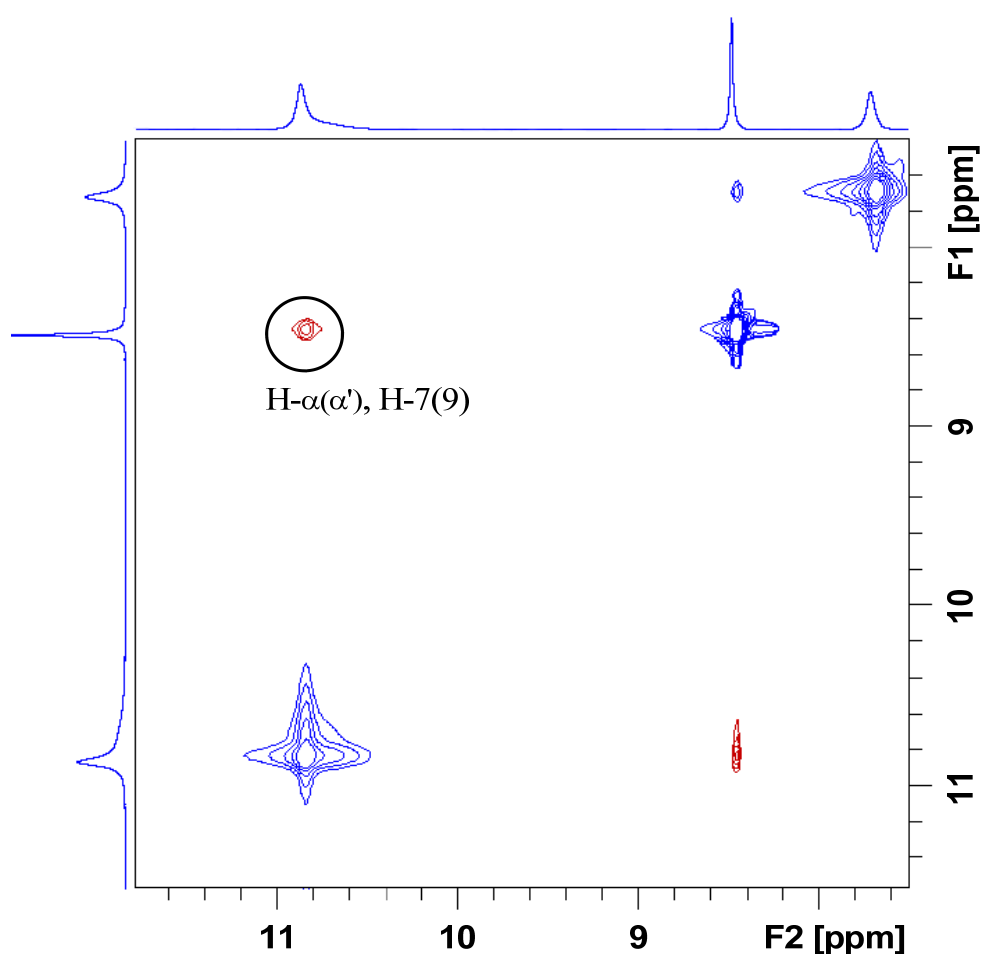
Slično kao i spoj **1**, disupstituirani derivat **2** se može pojavljivati u obliku tri tautomera (**2a–2c**, Slika 2.23). Zbog smanjene mogućnosti vrtnje oko dvostruke veze između ugljikovih atoma u  $\alpha(\alpha')$ -položaju i iminskih dušika, tautomeri **2a–2c** se mogu pojavljivati kao *cis*- i *trans*-izomeri. Međutim, širina i odsjenjenost signala OH i NH skupine pri 10,86 ppm ukazala je na prisutnost intramolekulske OH $\cdots$ N vodikove veze koja je moguća samo kod *trans*-izomera (Slika 2.23). Nadalje, na temelju NOESY korelacija između H- $\alpha$  i H-7 odnosno H- $\alpha'$  i H-9 protona (Slika 4.26) nedvojbeno je dokazano da se spoj **2** u otopini pretežito pojavljuje u obliku tautomera **2a**.

Tablica 4.9.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR kemijski pomaci spoja **2** u DMSO- $d_6$  pri sobnoj temperaturi.<sup>86</sup>

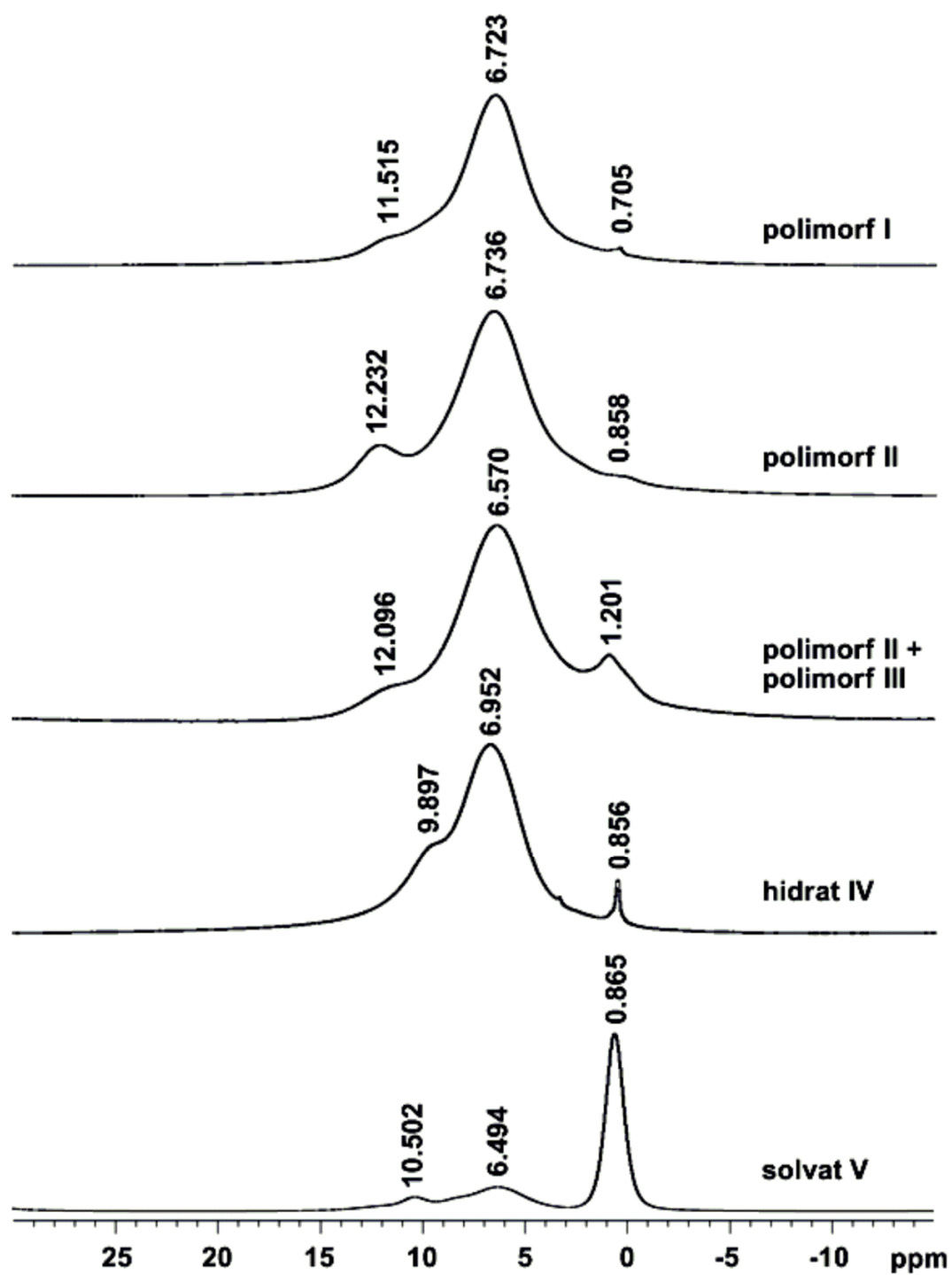
| Atom                   | $\delta$ / ppm |                 |
|------------------------|----------------|-----------------|
|                        | $^1\text{H}$   | $^{13}\text{C}$ |
| $\alpha$ ( $\alpha'$ ) | 8,48           | 143,33          |
| 1(1')                  |                | 120,14          |
| 2(2')                  |                | 157,12          |
| 3(3')                  | 6,92           | 116,67          |
| 4(4')                  | 7,26           | 131,10          |
| 5(5')                  | 6,90           | 119,65          |
| 6(6')                  | 7,71           | 128,65          |
| 7                      | 10,86          |                 |
| 8                      |                | 152,44          |
| 9                      | 10,86          |                 |
| OH                     | 10,86          |                 |

Asignacije kemijskih pomaka spoja **2** u otopini potvrđene su analizom NMR spektara u čvrstom stanju.  $^1\text{H}$  MAS spektri kristalografskih oblika spoja **2** prikazani su na Slici 4.27. Hidroksilnim i amino protonima polimorfa I i solvata V pripadaju signali s maksimumima pri 11,515 ppm odnosno 10,502 ppm. Odgovarajući signali u  $^1\text{H}$  MAS spektrima polimorfa II i III nalaze se pri višim vrijednostima kemijskog pomaka. Ovaj podatak je u skladu s rezultatima rentgenske strukturne analize, a ukazuje na prisutnost intermolekulskih vodikovih veza u kojima sudjeluju OH i NH skupine polimorfa II i III.<sup>86</sup> S druge strane, OH i NH protoni u  $^1\text{H}$  MAS spektru hidrata IV su zasjenjeniji (9,897 ppm), što je rezultat interakcije s molekulama vode i stvaranja molekulskih slojeva. Aromatskim protonima odgovara široki signal koji obuhvaća područje od 3 ppm do 9 ppm. Dodatni signali čiji se maksimumi nalaze u području od 0,7 ppm do 1,2 ppm u  $^1\text{H}$  MAS spektrima polimorfa I–III, hidrata IV i solvata V mogli bi pripadati protonima otapala u kojima je provedena sinteza.

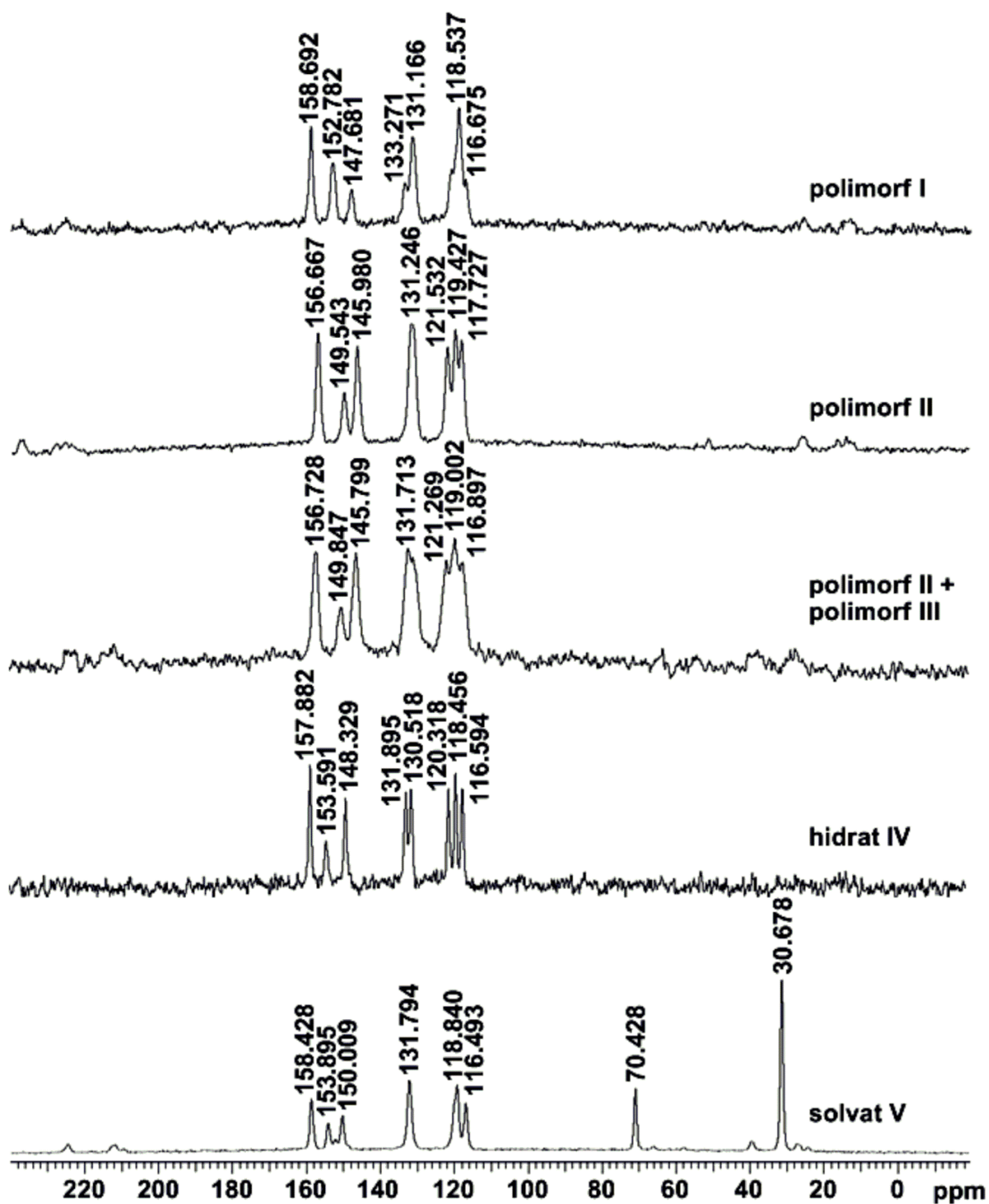
$^{13}\text{C}$  CP-MAS spektri kristalografskih oblika spoja **2** prikazani su na Slici 4.28. Kemijski pomaci ugljikovih atoma asignirani su na temelju analize NMR spektara u otopini (Tablica 4.9). Signali C- $\alpha$ , C-8 odnosno C-2 atoma nalaze se u području od 145 ppm do 159 ppm. Aromatskim protonima odgovaraju signali između 116 ppm i 134 ppm. Položaj i intenzitet ovih signala ovise o prostornom rasporedu atoma i lokalnoj strukturi pojedinog kristalografskog oblika. Dodatni signali pri 30,768 ppm i 70,428 ppm u  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spektru solvata V odgovaraju protonima metilne odnosno hidroksilne skupine *tert*-butilnog alkohola koji je dio njegove kristalne strukture (Slika 4.28).



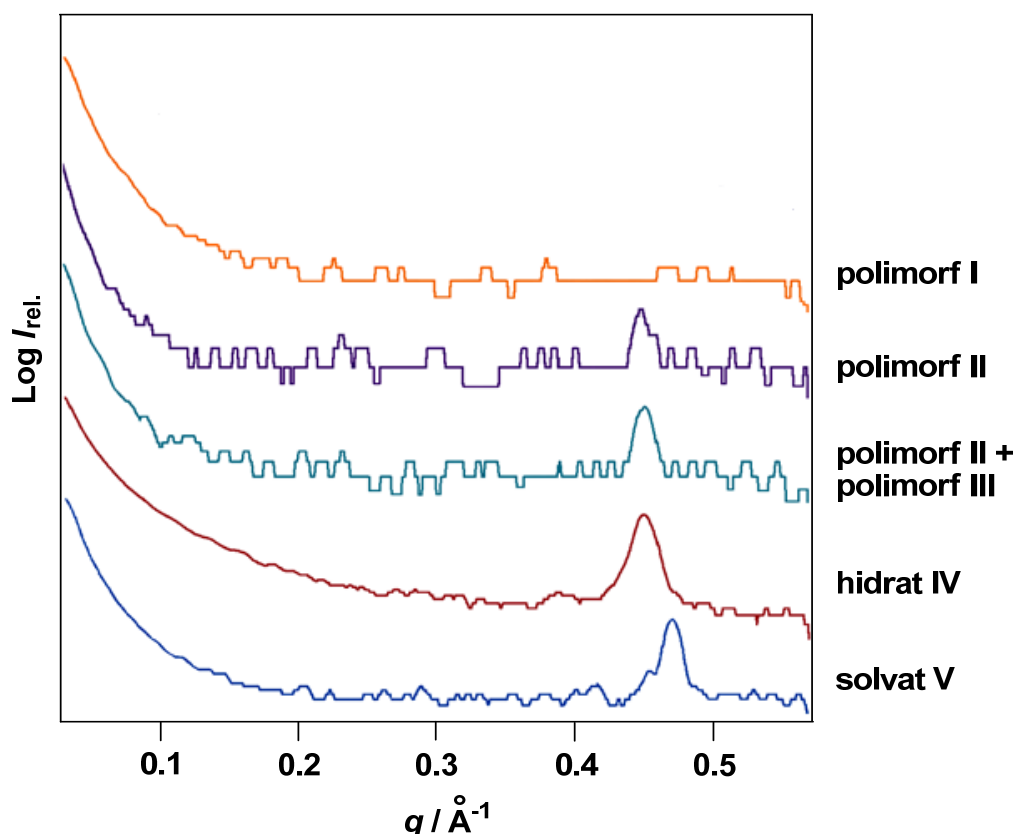
Slika 4.26. Uvećani prikaz NOESY korelacija između H- $\alpha$  i H-7 odnosno H- $\alpha'$  i H-9 protona spoja **2**.



Slika 4.27.  $^1\text{H}$  MAS spektri kristalografskih oblika I–V spoja **2**.<sup>86</sup>



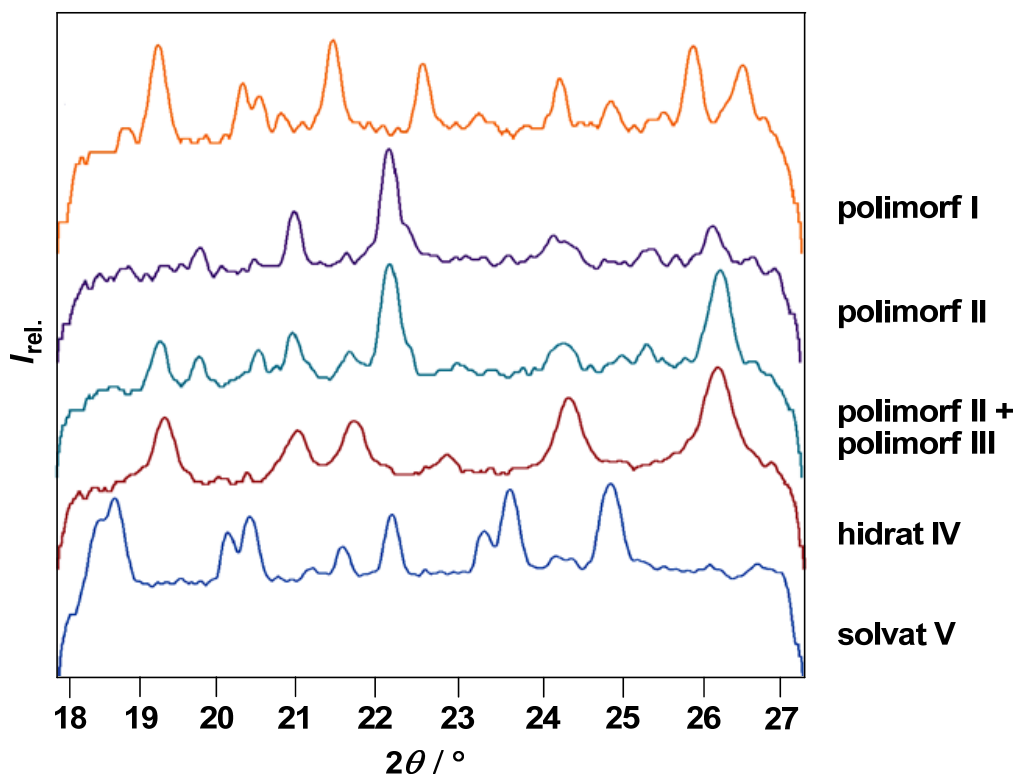
Slika 4.28.  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spektri kristalografskih oblika I–V spoja 2.<sup>86</sup>



Slika 4.29. SAXS spektri (logaritamska skala) kristalografskih oblika I–V spoja **2**.

Daljnju karakterizaciju spoja **2** u čvrstom stanju omogućila je tehnika SWAXS. SAXS spektri kristalografskih oblika spoja **2** prikazani su na Slici 4.29. Signal pri  $q = 0,45$  zajednički je polimorfima II i III te hidratu IV. Karakterističan signal solvata V nalazi se pri  $q = 0,47$ , dok polimorf I nema signala u SAXS području.

S druge strane, u WAXS spektru polimorfa I pojavljuje se 6 karakterističnih signala pri  $20,21^\circ$ ,  $20,37^\circ$ ,  $21,31^\circ$ ,  $22,28^\circ$ ,  $25,81^\circ$  i  $26,19^\circ$  (Slika 4.30). Signal pri  $19,41^\circ$  zajednički je polimorfima I i III te hidratu IV. WAXS signali pri  $20,95^\circ$  i  $22,17^\circ$  pripadaju hidratu IV te polimorfima II i III. Dodatni signal pri  $19,82^\circ$  prisutan je u WAXS spektrima polimorfa II i smjese polimorfa II i III, dok je signal velikog intenziteta pri  $18,90^\circ$  karakterističan za solvat V.



Slika 4.30. WAXS spektri kristalografskih oblika I–V spoja **2**.

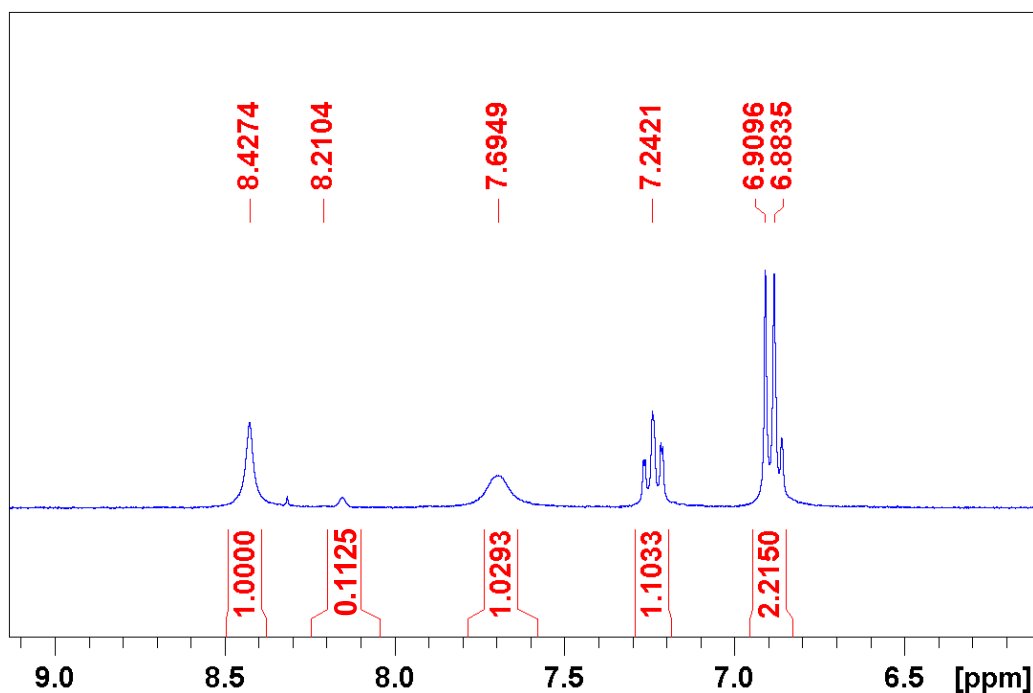
## 4.4. Reakcija kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida

Reakcijom kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida dobivena je smjesa biološki aktivnih spojeva **1** i **2** (Slike 2.22 i 2.23). Reakcija je praćena u metanolu, etanolu i propan-2-olu metodologijom vibracijske spektroskopije *in-line* prethodno razvijenom na djelatnoj tvari entakapon. Prije korištenja tehnika *in-line*, reakcijski produkti su identificirani *off-line* na temelju analize NMR spektara u otopini te SWAXS, NMR, Ramanovih i IR spektara u čvrstom stanju.<sup>89</sup>

### 4.4.1. Identifikacija reakcijskih produkata u otopini

Reakcijski produkti identificirani su u otopini pomoću spektroskopije NMR. U NMR spektrima uočena su dva skupa signala koji pripadaju spojevima **1** i **2**. Intenziteti signala protona ukazali su da je sastav produkata bio ovisan o temperaturi i otapalu korištenom za sintezu.

Udio spojeva **1** i **2** dobivenih u metanolu, etanolu i propan-2-olu procijenjen je na temelju omjera intenziteta signala H- $\alpha$ ( $\alpha'$ ) protona pri 8,20 ppm odnosno 8,43 ppm (Slike 4.31, 7.16 i 7.17). Kao što se može procijeniti iz  $^1\text{H}$  NMR spektara, reakcijski produkt sintetiziran u metanolu sadržavao je najveći udio spoja **1** (58 %). Reakcijom u propan-2-olu dobiveno je znatno manje spoja **1** (28 %), dok je kondenzacijom u etanolu nastalo najviše spoja **2** (90 %).

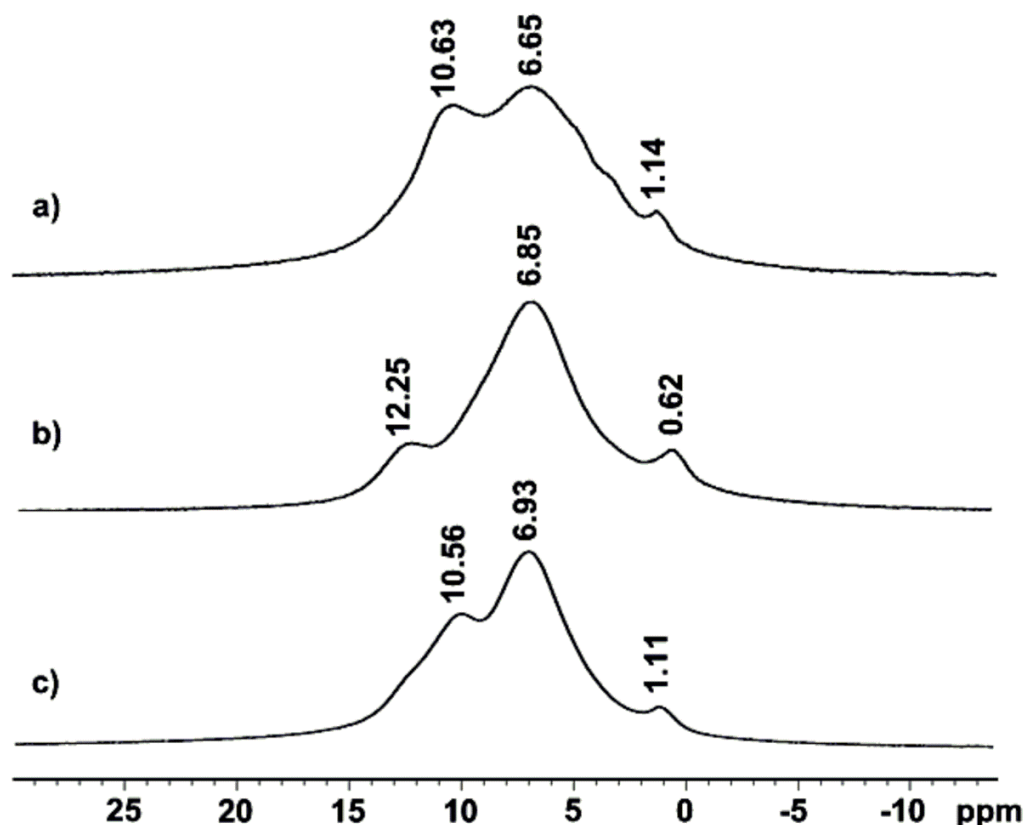


Slika 4.31. Uvećani prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra reakcijskog produkta dobivenog u etanolu snimljenog u DMSO- $\text{d}_6$  u području od 6,3 ppm do 9,1 ppm.

#### 4.4.2. Identifikacija reakcijskih produkata u čvrstom stanju

Kristalni uzorci reakcijskih produkata identificirani su na temelju analize njihovih NMR ( $^1\text{H}$  MAS i  $^{13}\text{C}$  CP-MAS), SWAXS (SAXS i WAXS) te Ramanovih i IR spektara u čvrstom stanju.

$^1\text{H}$  MAS i  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR spektri reakcijskih produkata prikazani na Slikama 4.32 odnosno 4.33 uspoređeni su s  $^1\text{H}$  MAS i  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR spektrima čistih spojeva **1** i **2** (Slike 4.22, 4.27 i 4.28).

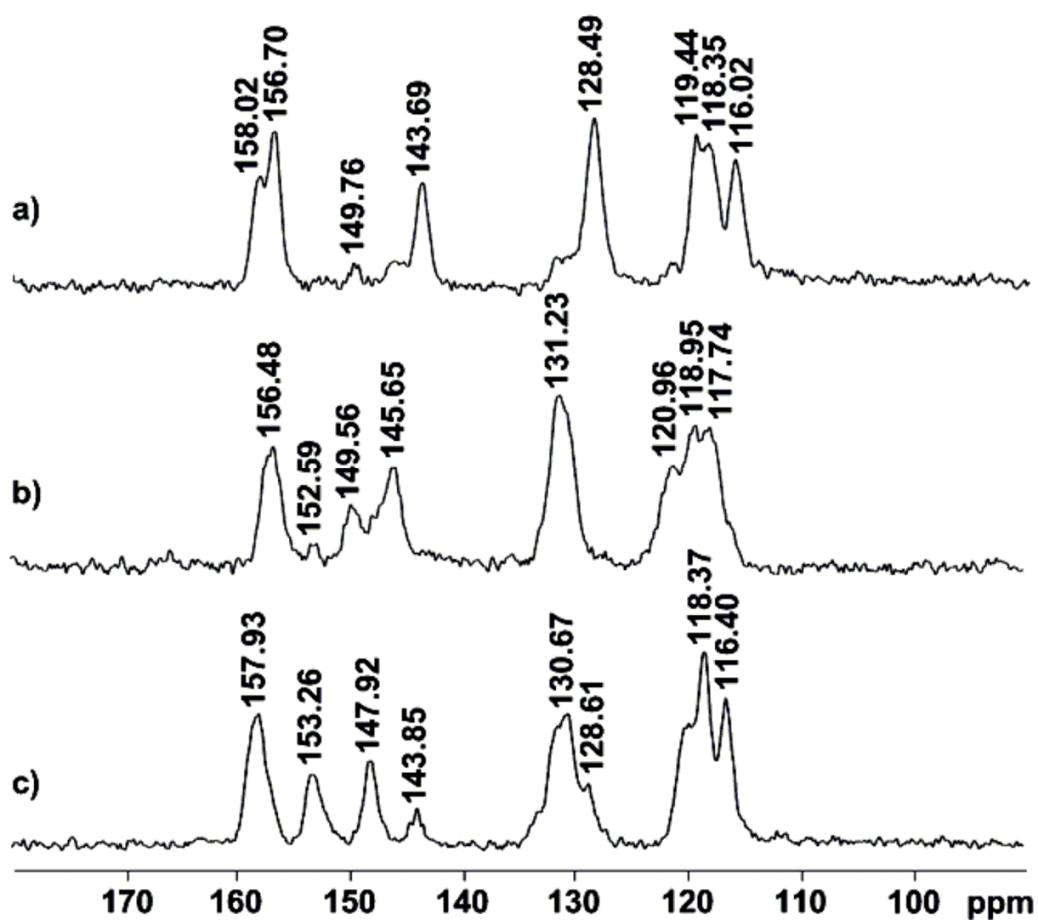


Slika 4.32.  $^1\text{H}$  MAS spektri reakcijskih produkata dobivenih u a) metanolu; b) etanolu i c) propan-2-olu.<sup>89</sup>

U  $^1\text{H}$  MAS spektrima reakcijskih produkata opažena su tri široka signala. Njihov oblik i položaj govori u prilog činjenici da su produkti sadržavali smjesu spojeva **1** i **2**, što je u skladu s rezultatima analize NMR spektara u otopini.

$^{13}\text{C}$  CP-MAS spektri asignirani su na temelju NMR kemijskih pomaka spojeva **1** i **2** u otopini (Tablice 4.7 i 4.9). Analiza  $^{13}\text{C}$  CP-MAS kemijskih pomaka potvrdila je prisutnost oba spoja u reakcijskim produktima. Kao što se može uočiti na Slici 4.33, u spektru produkta dobivenog u metanolu nalaze se signali pri 143,69 ppm, 156,70 ppm i 158,02 ppm koji odgovaraju C- $\alpha$ , C-2 odnosno C-8 atomu spoja **1**. Široki signali u području od 115 ppm do 130 ppm mogu se pripisati aromatskim ugljikovim atomima spojeva **1** i **2**.

Slab signal pri 149,76 ppm koji pripada C- $\alpha(\alpha')$  atomu potvrdio je prisutnost spoja **2**.<sup>86</sup> S druge strane, u  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spektrima produkata sintetiziranih u etanolu i propan-2-olu pojavili su se signali velikog intenziteta pri  $\approx 131$  ppm i  $\approx 153$  ppm, koji odgovaraju C-4(4') odnosno C-8 atomima spoja **2**.<sup>86</sup> Ovi rezultati su potvrdili da je kondenzacijskom reakcijom u etanolu i propan-2-olu nastalo više spoja **2** nego reakcijom u metanolu.

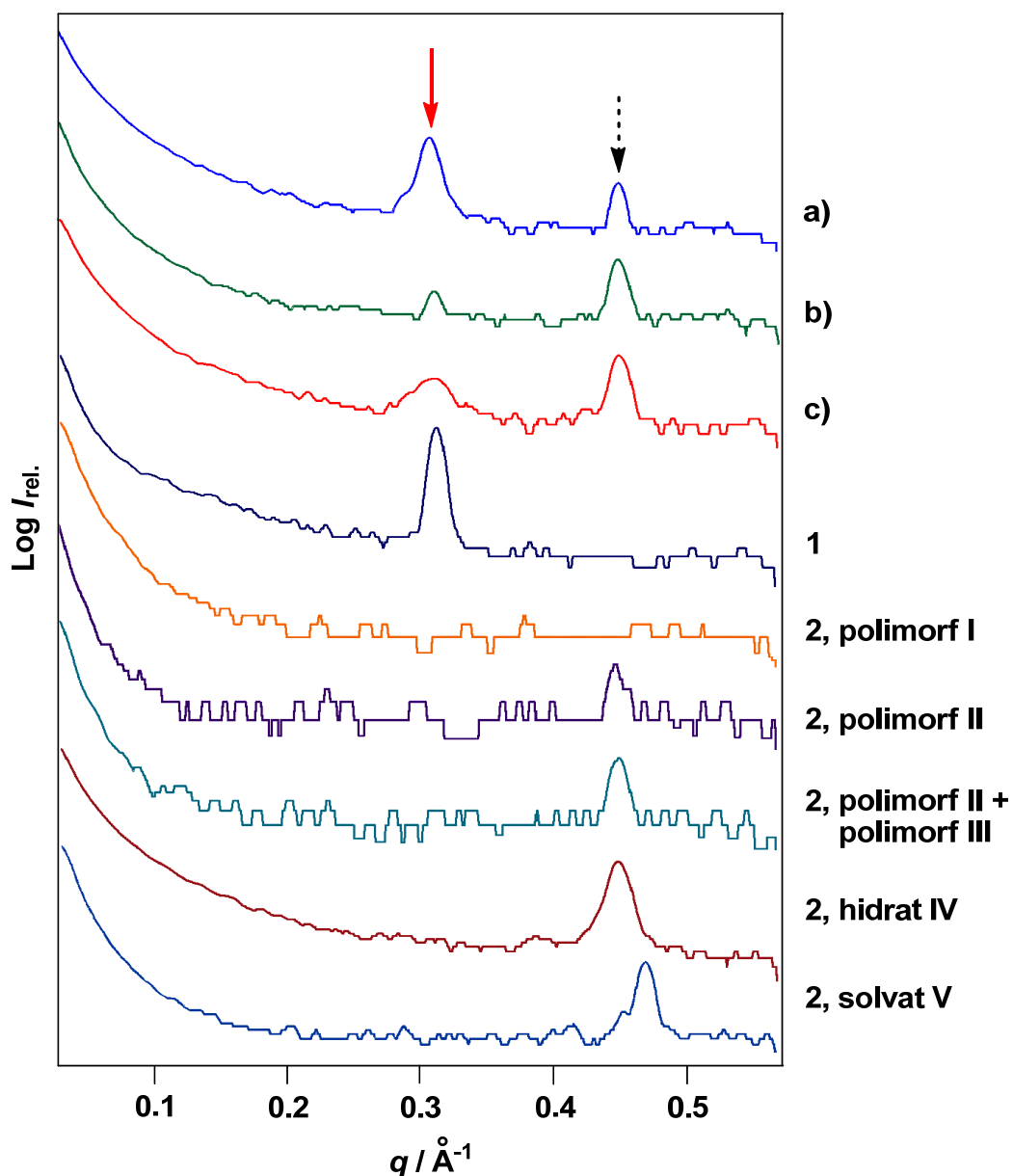


Slika 4.33.  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spektri reakcijskih produkata dobivenih u a) metanolu; b) etanolu i c) propan-2-olu.<sup>89</sup>

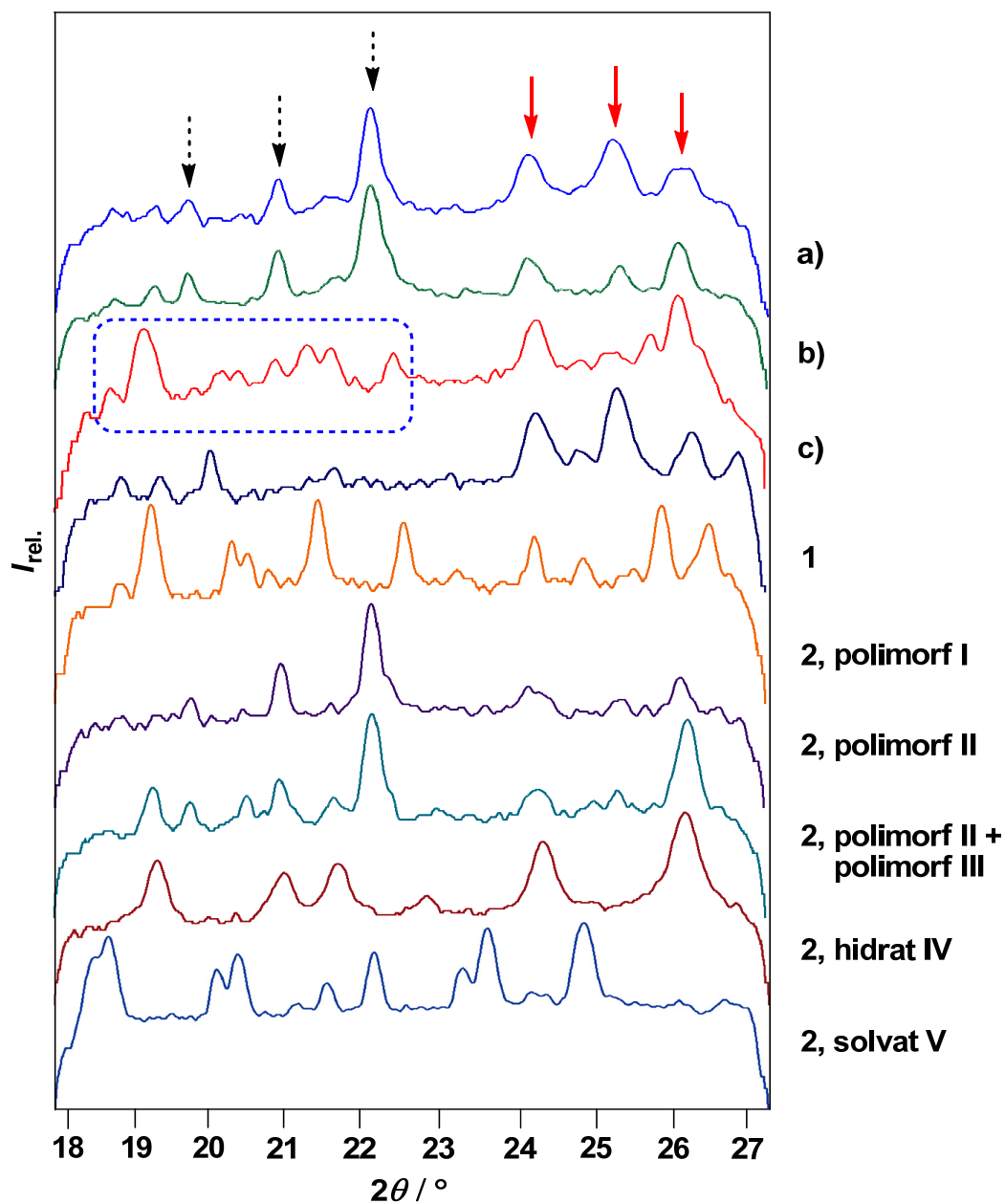
Daljnji uvid u sastav kristalnih produkata omogućila je tehnika SWAXS. SAXS spektri spoja **1** i kristalografskih oblika I–V spoja **2** uspoređeni su sa SAXS spektrima kristalnih uzoraka produkata dobivenih kondenzacijskom reakcijom u različitim otapalima (Slika 4.34). U SAXS spektrima reakcijskih produkata mogu se uočiti dva signala karakteristična za spojeve **1** i **2**, označena crvenom odnosno isprekidanom crnom strelicom na Slici 4.34. Intenzitet signala proporcionalan je sastavu produkta procijenjenom na temelju analize NMR spektara. Nadalje, SAXS signal pri  $q = 0,45$  ukazao je na prisutnost barem jednog ili smjese oblika II, III i IV spoja **2**. Solvat V, čiji se karakteristični signal pojavljuje pri  $q = 0,47$ , nije bio prisutan niti u jednom uzorku.

Sastav kristalnih produkata potvrđen je na temelju analize WAXS otisaka prsta karakterističnih za pojedini kristalografski oblik (Slika 4.35). Signali pri  $24,25^\circ$ ,  $25,25^\circ$  i  $26,06^\circ$  karakteristični za spoj **1** (crvene strelice na Slici 4.35) zajednički su reakcijskim produktima sintetiziranim u metanolu, etanolu i propan-2-olu. Dodatni signali pri  $19,82^\circ$ ,  $20,95^\circ$  i  $22,17^\circ$  označeni isprekidanim crnim strelicama na Slici 4.35 ukazali su da je reakcijom u metanolu i etanolu spoj **2** nastao pretežito u polimorfnom obliku II. Međutim, ne može se isključiti niti prisutnost polimorfa III i hidrata IV. Pažljivom analizom WAXS spektara može se uočiti da solvat V nije bio prisutan niti u jednom reakcijskom produktu. Nadalje, WAXS otisak prsta produkta sintetiziranog u propan-2-olu (isprekidana plava linija na Slici 4.35) odgovara smjesi polimorfa I i hidrata IV spoja **2**. Stoga se može zaključiti da je otapalo korišteno za sintezu znatno utjecalo na omjer produkata i prisutnost pojedinog polimorfa u smjesi.

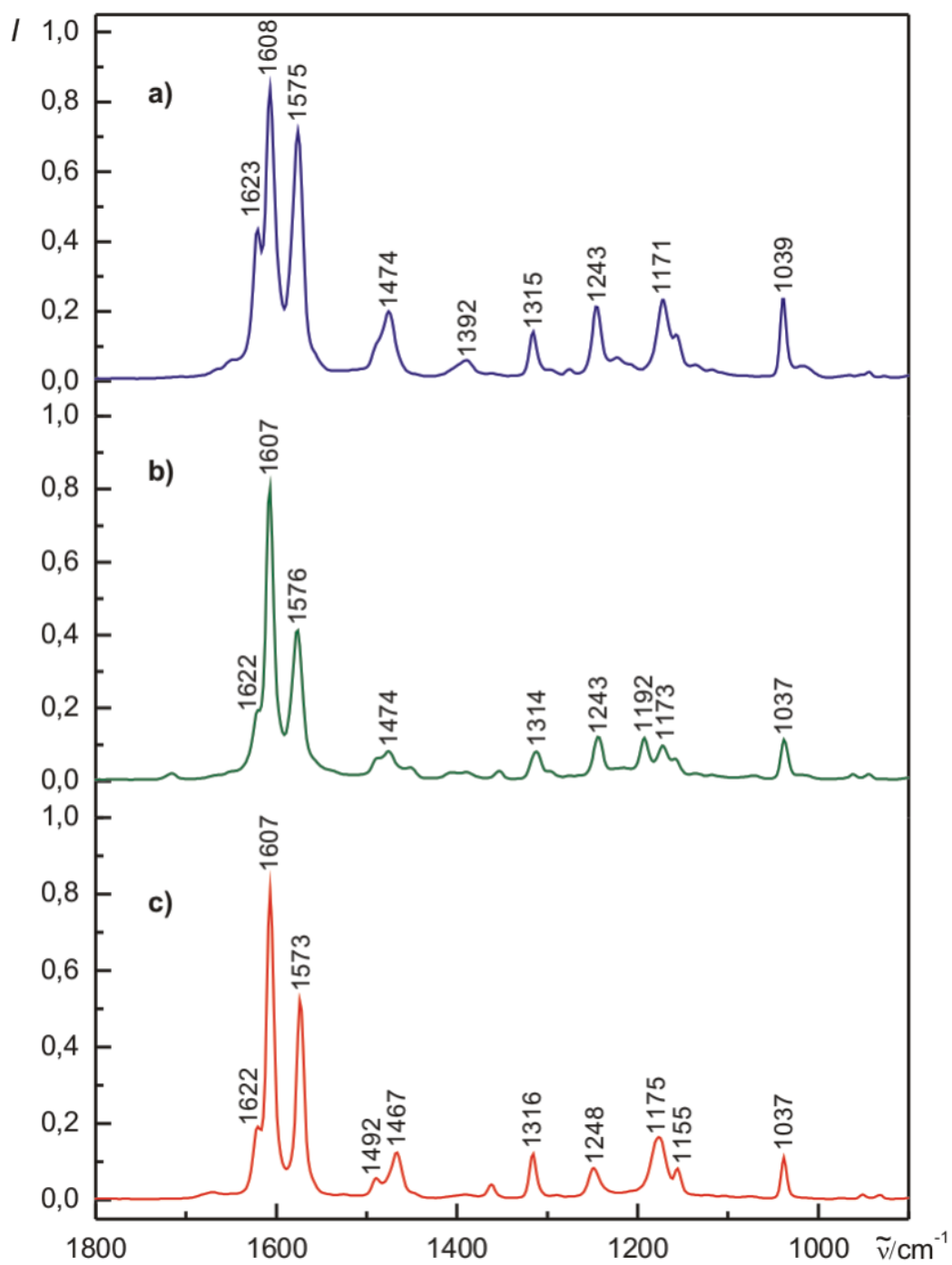
Ramanovi i IR spektri *off-line* reakcijskih produkata (Slike 4.36 i 7.18) u skladu su s rezultatima NMR i SWAXS analize. Karakteristične vibracijske vrpce potvrdile su prisutnost smjese spojeva **1** i **2** u svim reakcijskim produktima. Međutim, nedvojbeno identifikacija kristalografskih oblika spoja **2** nije bila moguća zbog sličnosti njihovih vrpce u Ramanovim (Slika 4.24) i IR spektrima (Slika 7.9). Na temelju analize vibracijskih spektara ipak se može isključiti prisutnost polimorfa II u reakcijskom produktu sintetiziranom u propan-2-olu.



Slika 4.34. SAXS spektri (logaritamska skala) reakcijskih produkata dobivenih u a) metanolu; b) etanolu i c) propan-2-olu te čistog spoja **1** i kristalografskih oblika I–V spoja **2**. Signal karakterističan za spoj **1** označen je crvenom strelicom, dok je signal polimorfa II, III i hidrata IV spoja **2** označen isprekidanom crnom strelicom.<sup>89</sup>



Slika 4.35. WAXS spektri reakcijskih produkata dobivenih u a) metanolu; b) etanolu i c) propan-2-olu te čistog spoja **1** i kristalografskih oblika I–V spoja **2**. Signali karakteristični za spoj **1** označeni su crvenim strelicama. WAXS signali koji odgovaraju polimorfima II i III spoja **2** označeni su isprekidanim crnim strelicama. Isprekidana plava linija označava WAXS otisak prsta koji pripada polimorfima I, III i hidratu IV spoja **2**.<sup>89</sup>



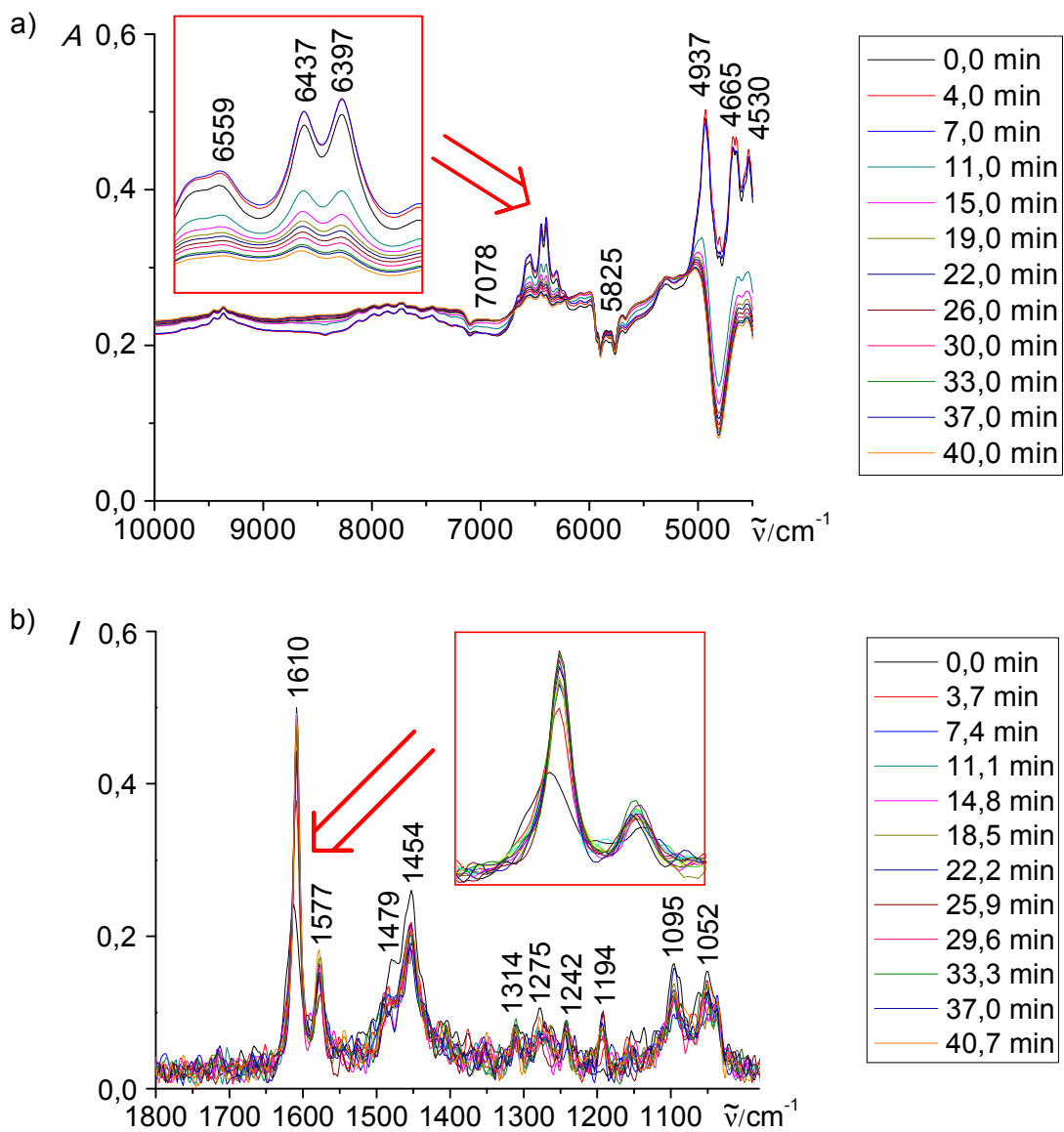
Slika 4.36. Ramanovi spektri *off-line* reakcijskih produkata dobivenih u a) metanolu; b) etanolu i c) propan-2-olu u području od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $900\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.4.3. Praćenje reakcije kondenzacije vibracijskom spektroskopijom *in-line*

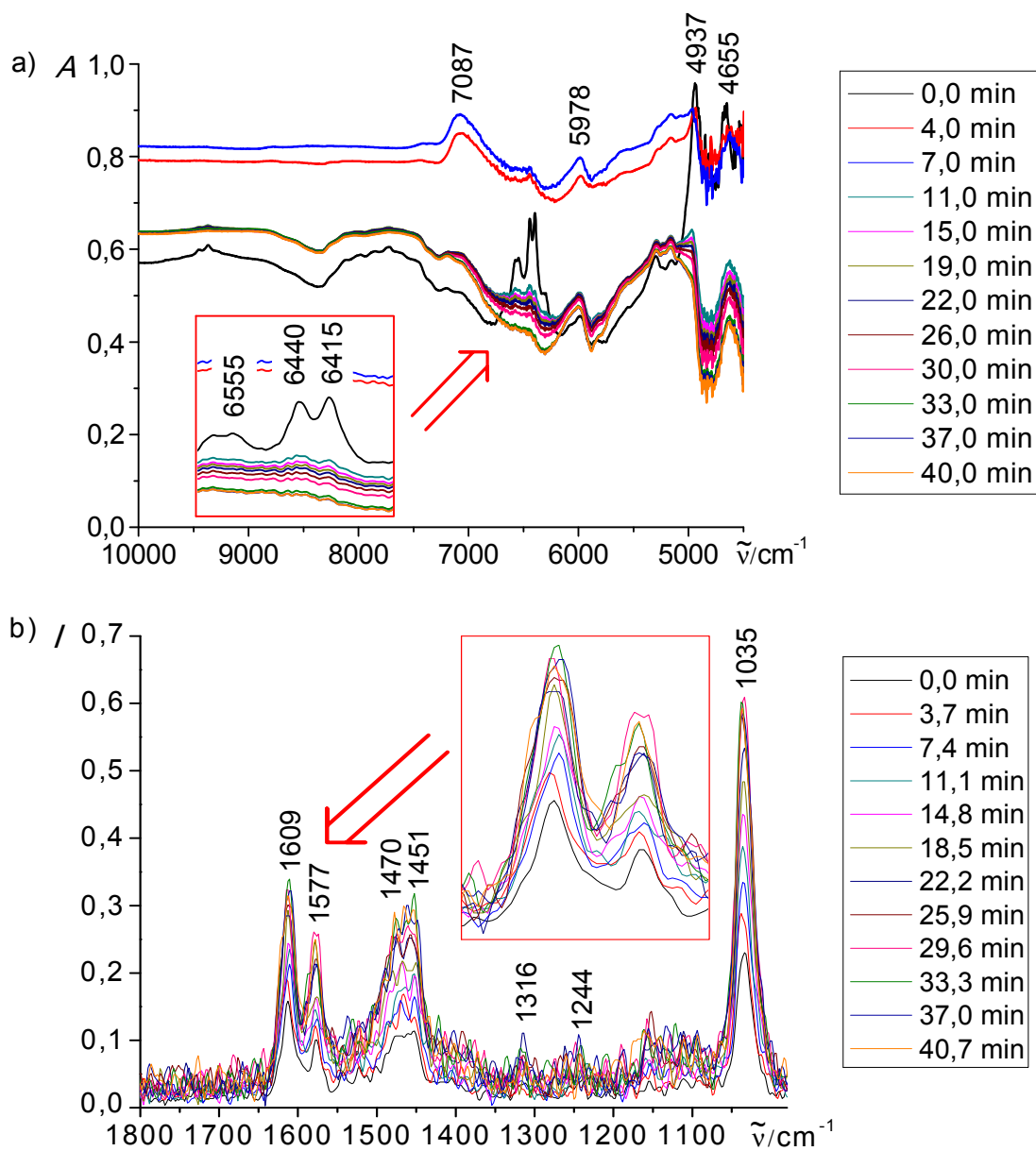
Reakcija kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u metanolu, etanolu i propan-2-olu praćena je vibracijskom spektroskopijom *in-line* pomoću sonde uronjene u reakcijsku smjesu (Slika 3.3) i optičkim vlaknima povezane sa spektrometrom.<sup>89</sup> NIR spektroskopija *in-line* korištena je za praćenje reaktanata, dok je Ramanova spektroskopija *in-line* primijenjena za praćenje reakcijskih produkata. Dobiveni spektri *in-line* statistički su obrađeni metodom PCA. NIR i Ramanovi spektri *in-line* snimani su kontinuirano (svakih 1,0 min odnosno 3,7 min) tijekom reakcije u metanolu, etanolu i propan-2-olu. Reprezentativni spektri snimljeni u različitim otapalima prikazani su na Slikama 4.37–4.39.

Kao što se može vidjeti na Slici 4.37 a), NIR vrpce *in-line* pri  $6559\text{ cm}^{-1}$ ,  $6437\text{ cm}^{-1}$  i  $6397\text{ cm}^{-1}$ , postupno su nestajale tijekom kemijske reakcije. Ove vrpce karakteristične su za derivate uree, a odgovaraju višim tonovima i kombinacijama NH i  $\text{NH}_2$  vibracija. Stoga se njihov nestanak može pripisati potrošnji reaktanta karbohidrazida. Tome u prilog govori i smanjenje intenziteta vrpce u području od  $5000\text{ cm}^{-1}$  do  $4500\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju kombinacijama viših tonova vibracija N–H i C–H istezanja odnosno svijanja. Nadalje, smanjio se i intenzitet kombinacijske vrpce pri  $7078\text{ cm}^{-1}$  koja pripada drugom reaktantu. Slične promjene opažene su u ostalim otapalima.

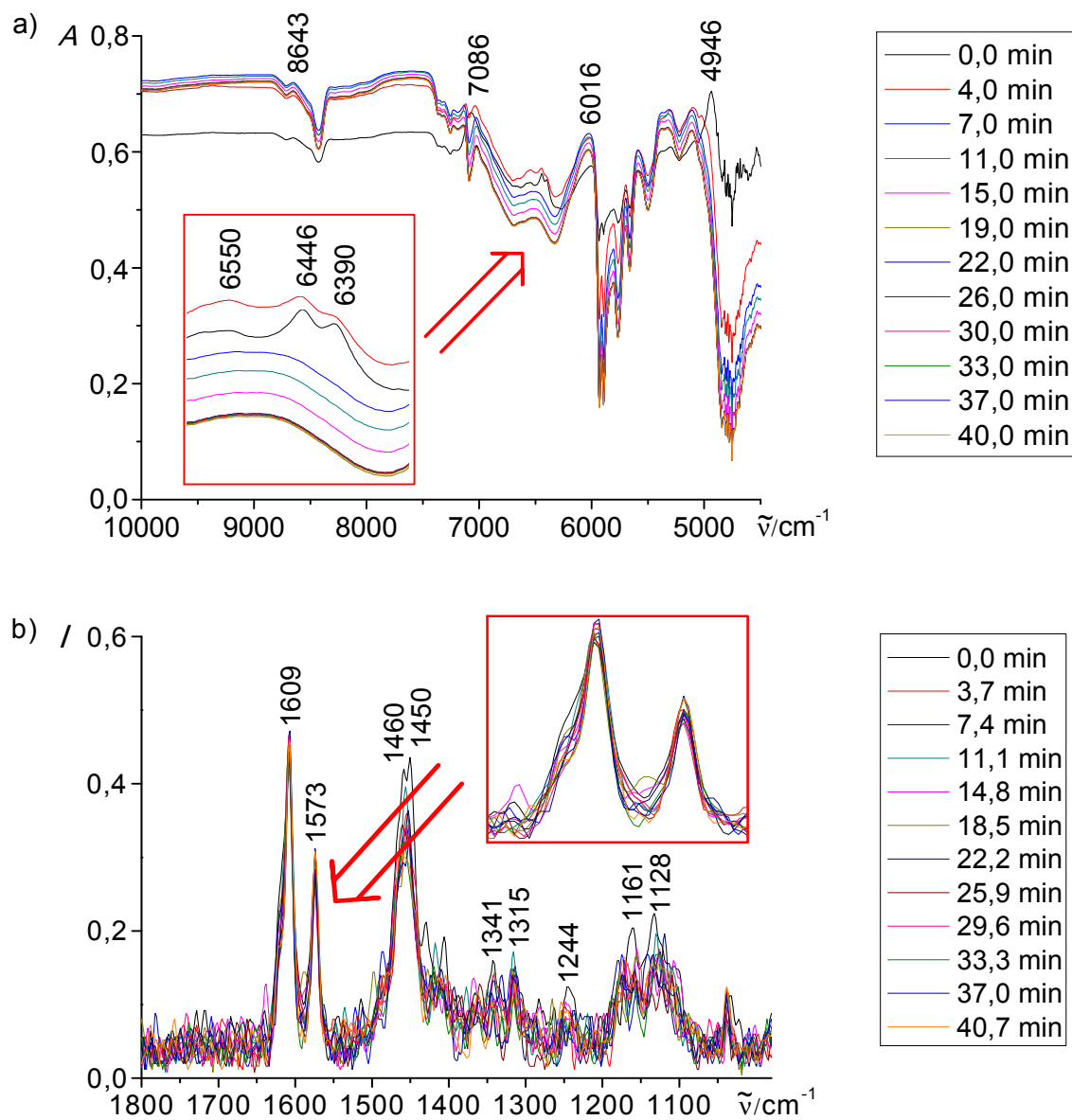
Reprezentativni Ramanovi spektri *in-line* snimljeni tijekom kondenzacijske reakcije u etanolu prikazani su na Slici 4.37 b). Ramanove vrpce pri  $\approx 1610\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju vibracijama C=N istezanja, a karakteristične su za oba derivata karbohidrazida. Pojava vrpce C–O istezanja i C–H svijanja u području od  $1400\text{ cm}^{-1}$  do  $1100\text{ cm}^{-1}$  potvrdila je nastanak reakcijskih produkata. Ramanova vrpca pri  $\approx 1454\text{ cm}^{-1}$  može se pripisati asimetričnom C=C istezanju. S druge strane, vibracijska vrpca N–H svijanja spoja **2**, koja se pojavljuje pri  $\approx 1479\text{ cm}^{-1}$ , najvjerojatnije je preklopljena vrpcom asimetričnog C=C istezanja spoja **1**.



Slika 4.37. Reprezentativni a) NIR i b) Ramanovi spektri *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u etanolu.<sup>89</sup>



Slika 4.38. Reprezentativni a) NIR i b) Ramanovi spektri *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u metanolu.<sup>89</sup>



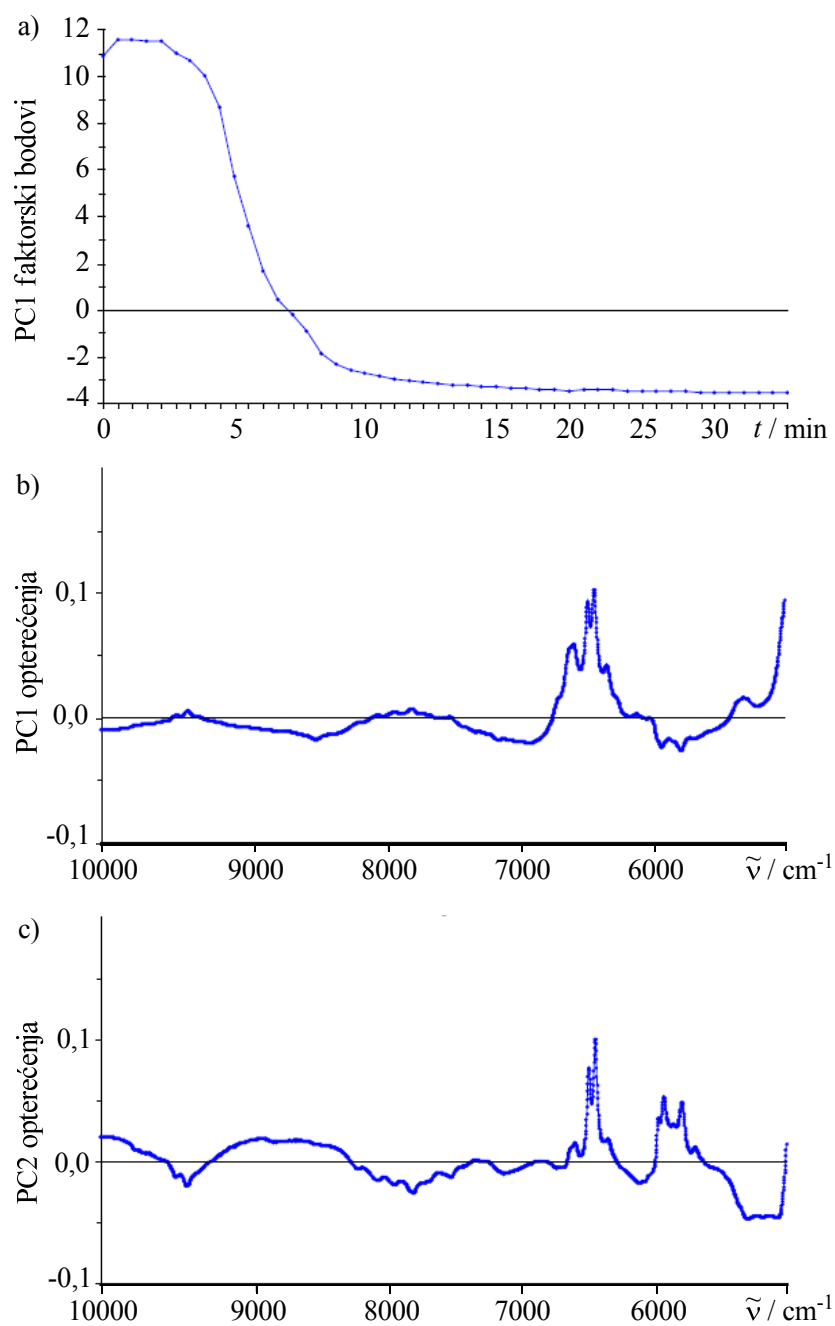
Slika 4.39. Reprezentativni a) NIR i b) Ramanovi spektri *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u propan-2-olu.<sup>89</sup>

Srednje jaka vrpca simetričnog C=C istezanja pri  $\approx 1580\text{ cm}^{-1}$  potvrdila je da su kemijskom reakcijom nastali spojevi **1** i **2**. Intenzitet ove vrpce u Ramanovim spektrima *in-line* u etanolu i propan-2-olu (Slike 4.37 i 4.39 b)) bio je manji u odnosu na metanol (Slika 4.38 b). Ramanova vrpca pri  $1621\text{ cm}^{-1}$ , karakteristična za NH<sub>2</sub> svijanje spoja **1**, nije se pojavila niti u jednom otapalu. Izostanak ove vrpce mogao bi se objasniti postojanjem vodikovih veza između amino skupine i molekula otapala koje pomiču njezin maksimum prema nižim valnim brojevima i uzrokuju preklapanje s vrpcom C=N istezanja pri  $\approx 1610\text{ cm}^{-1}$ .

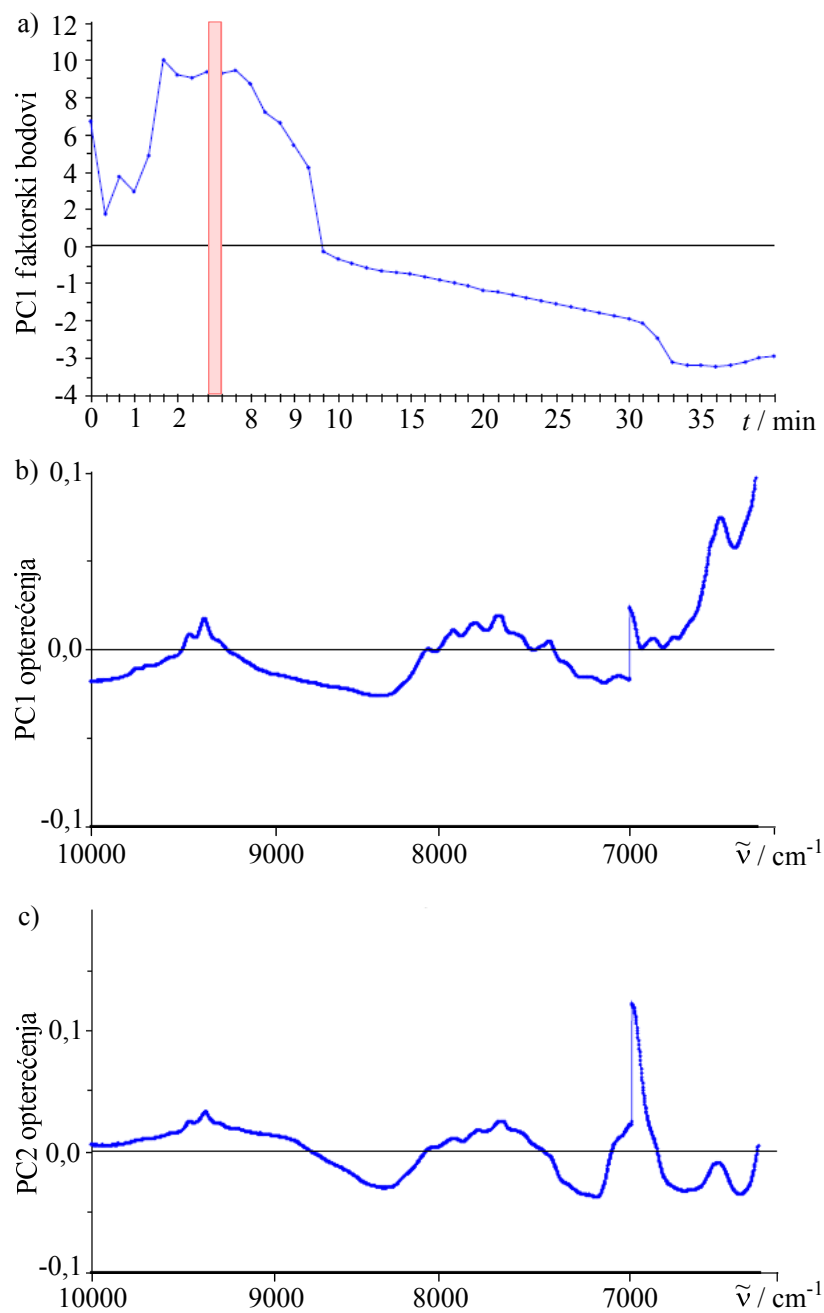
Da bi se moglo procijeniti trajanje reakcije u pojedinom otapalu, podaci dobiveni vibracijskom spektroskopijom *in-line* obrađeni su metodom PCA. Faktorski bodovi i opterećenja za NIR i Ramanove spektre *in-line* u etanolu, metanolu i propan-2olu prikazani su na Slikama 4.40–4.45. Najveći dio varijance podataka u svim spektrima *in-line* bio je predstavljen s PC1 (Tablica 4.10). Stoga je PC1 omogućila zadovoljavajući prikaz tijeka reakcije u korištenim otapalima.

Tablica 4.10. Individualne ( $s^2_{\text{indiv.}}$ ) i kumulativne ( $s^2_{\text{kumul.}}$ ) varijance opisane glavnim komponentama za NIR i Ramanove spektre *in-line* snimljene tijekom kemijske reakcije.<sup>89</sup>

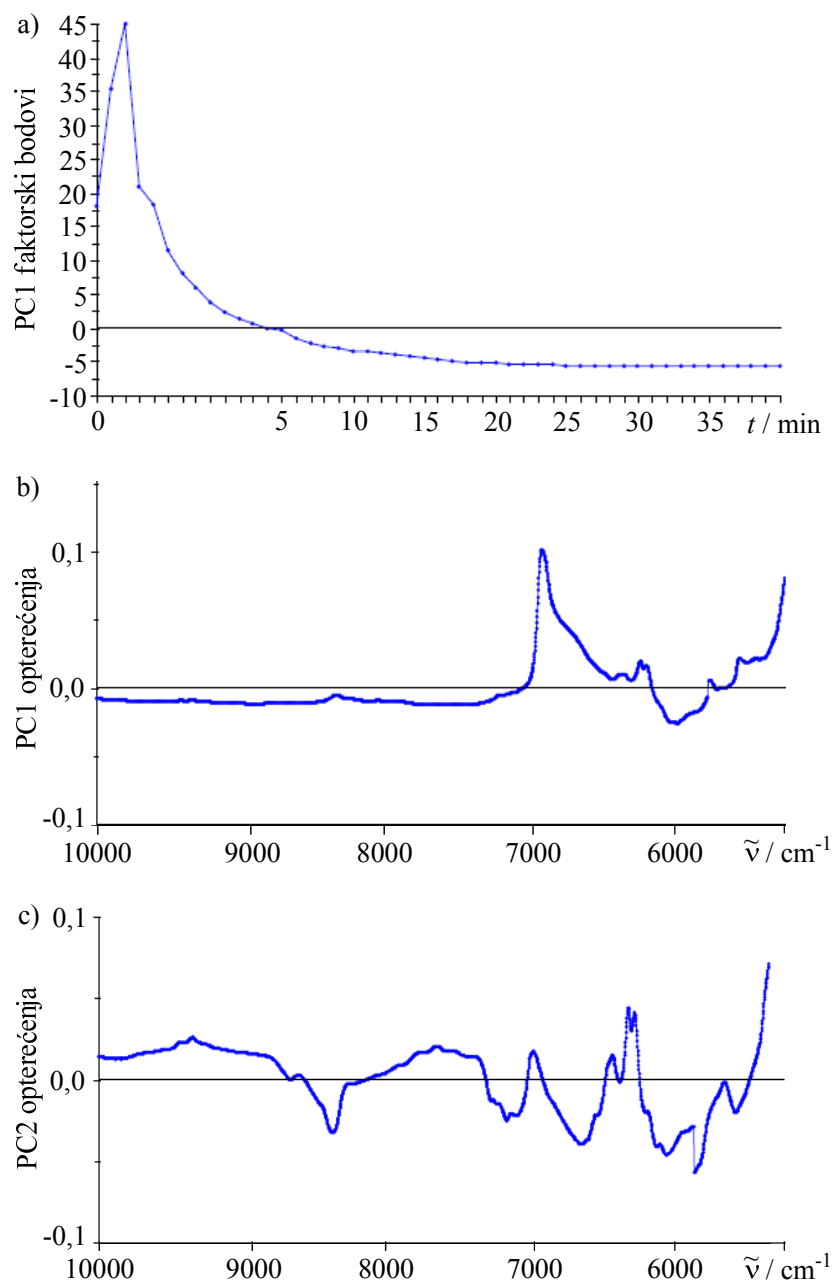
|                         |     | Udio varijance, %     |                       |                       |                       |                       |                       |
|-------------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                         |     | Metanol               |                       | Etanol                |                       | Propan-2-ol           |                       |
|                         |     | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ | $s^2_{\text{indiv.}}$ | $s^2_{\text{kumul.}}$ |
| NIR<br><i>in-line</i>   | PC1 | 86,14                 | 86,14                 | 99,12                 | 99,12                 | 93,02                 | 93,02                 |
|                         | PC2 | 7,89                  | 94,03                 | 0,67                  | 99,79                 | 5,56                  | 98,58                 |
| Raman<br><i>in-line</i> | PC1 | 85,53                 | 85,53                 | 63,14                 | 63,14                 | 49,96                 | 49,96                 |
|                         | PC2 | 3,61                  | 89,14                 | 9,56                  | 72,71                 | 11,84                 | 61,80                 |



Slika 4.40. a) PC1 faktorski bodovi te b) PC1 i c) PC2 opterećenja za skup od 50 NIR spektara *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u etanolu.<sup>89</sup>



Slika 4.41. a) PC1 faktorski bodovi te b) PC1 i c) PC2 opterećenja za skup od 50 NIR spektara *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u metanolu.<sup>89</sup>



Slika 4.42. a) PC1 faktorski bodovi te b) PC1 i c) PC2 opterećenja za skup od 50 NIR spektara *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u propan-2-olu.<sup>89</sup>

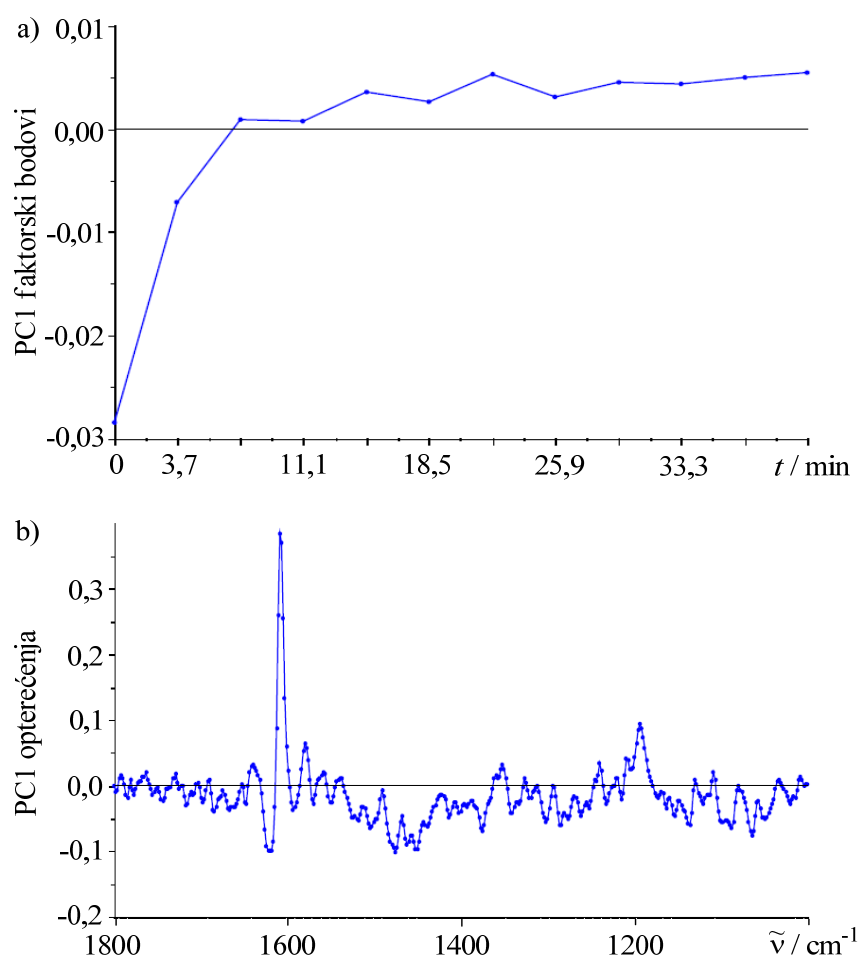
Postupno smanjenje PC1 faktorskih bodova za NIR spektre *in-line* (Slike 4.40–4.42) posljedica je potrošnje reaktanata karbohidrazida i salicilaldehida tijekom kondenzacijske reakcije, a u skladu je sa smanjenjem intenziteta karakterističnih NIR vibracijskih vrpca *in-line* (Slike 4.37–4.39 a)). S druge strane, nastanak produkata uzrokovao je povećanje PC1 faktorskih bodova za Ramanove spektre *in-line* tijekom reakcije u metanolu i etanolu. U slučaju propan-2-ola, PC1 faktorski bodovi su se smanjivali s vremenom, što je posljedica negativnih signala opterećenja koji pripadaju reakcijskim produktima.

Na temelju vremenske ovisnosti PC1 faktorskih bodova za NIR i Ramanove spektre *in-line* procijenjeno je trajanje reakcije u pojedinom otapalu (Tablica 4.11). Prema PC1 faktorskim bodovima za Ramanove spektre *in-line*, kemijska reakcija u etanolu i propan-2-olu završila je nakon približno 15 min odnosno 7 min. S druge strane, reakcija je bila najsporija u metanolu te je završila tek nakon 29 min. Slični rezultati dobiveni su iz PC1 faktorskih bodova za NIR spektre *in-line*. Podaci navedeni u Tablici 4.11 ukazali su da je brzina reakcije bila proporcionalna temperaturi reakcijske smjese. Iz PC1 faktorskih bodova prikazanih na Slikama 4.40–4.45 vidljivo je da reakcija započinje neposredno nakon dodatka salicilaldehida u otopinu karbohidrazida.

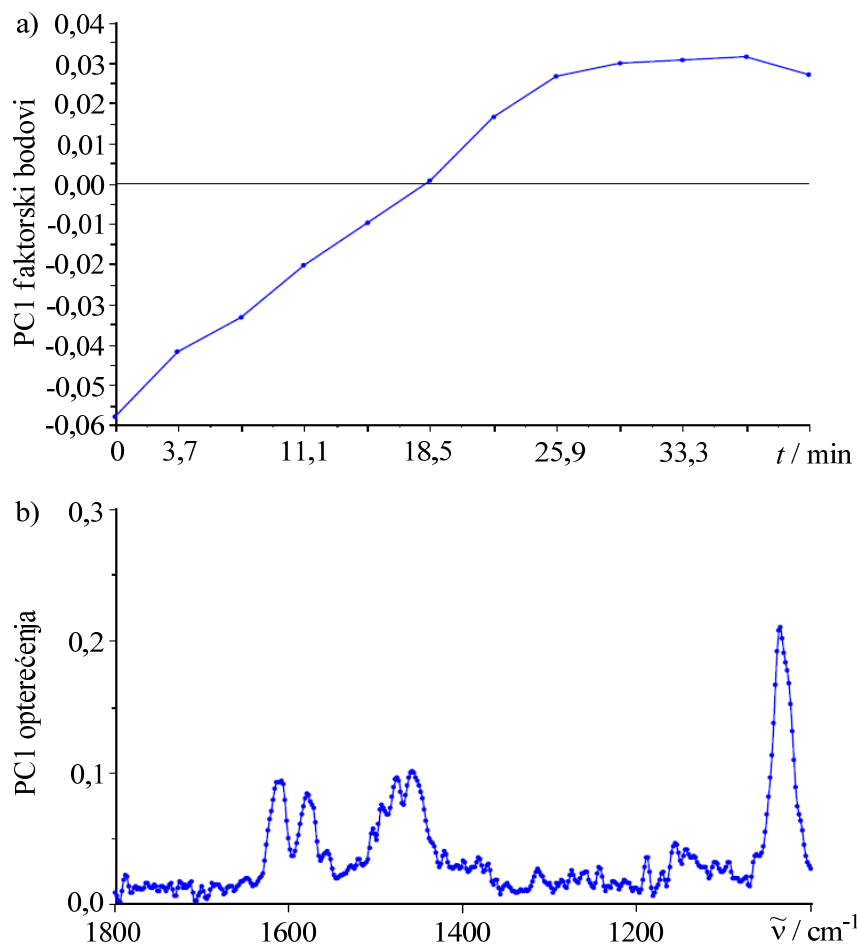
Tablica 4.11. Trajanje reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida pri različitim temperaturama procijenjeno iz PC1 faktorskih bodova za NIR i Ramanove spektre *in-line*.<sup>89</sup>

| Otapalo     | NIR <i>in-line</i> | Raman <i>in-line</i> | $\vartheta$ / °C |
|-------------|--------------------|----------------------|------------------|
|             | $t$ / min          | $t$ / min            |                  |
| Metanol     | $33 \pm 1$         | $29 \pm 3$           | 55               |
| Etanol      | $12 \pm 2$         | $15 \pm 2$           | 65               |
| Propan-2-ol | $9 \pm 1$          | $7 \pm 3$            | 75               |

Pozitivni signali pri  $\approx 6550\text{ cm}^{-1}$ ,  $\approx 6440\text{ cm}^{-1}$  i  $\approx 6400\text{ cm}^{-1}$  koji se pojavljuju u PC1 i PC2 opterećenjima za reakciju u etanolu odgovaraju NIR vrpčama *in-line* karakterističnima za karbohidrazid. Kombinačijskim vibracijama karbohidrazida odgovara i nekoliko slabijih vrpca u području od  $8200\text{ cm}^{-1}$  do  $7500\text{ cm}^{-1}$ . Smanjenje PC1 s vremenom i opaženi pozitivni signali ukazali su na potrošnju karbohidrazida tijekom kemijske reakcije. Široki signal drugog reaktanta, salicilaldehida, opažen je u PC2 opterećenjima oko  $7000\text{ cm}^{-1}$ .



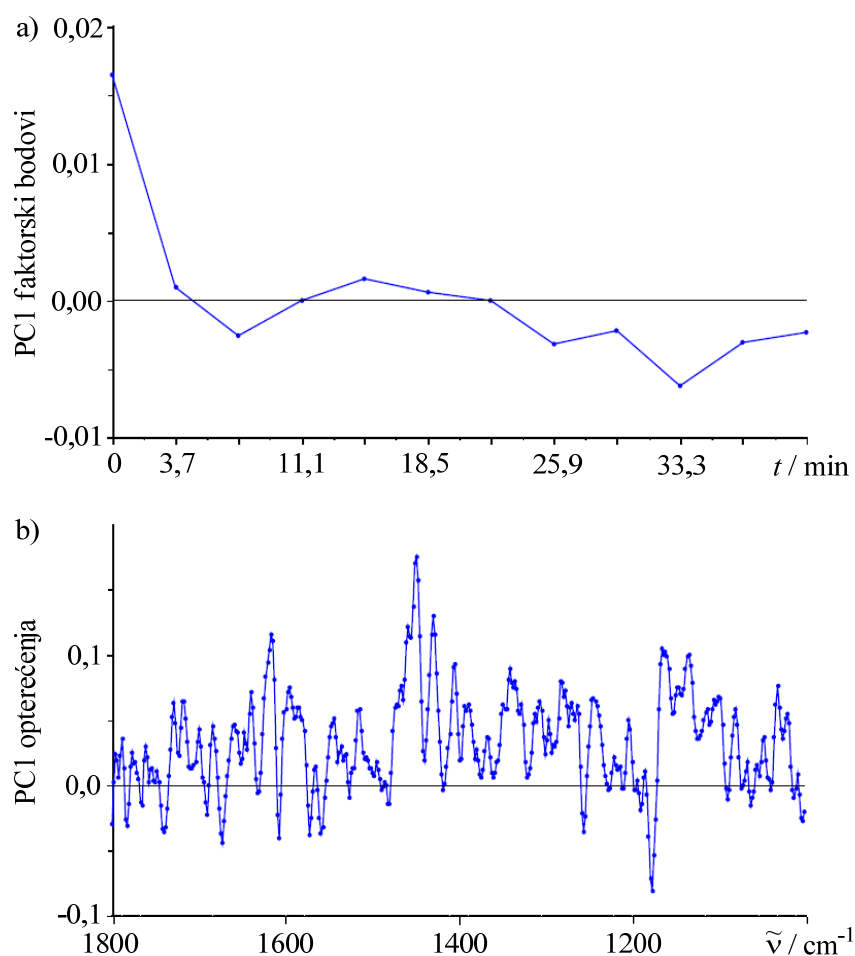
Slika 4.43. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 12 Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u etanolu.<sup>89</sup>



Slika 4.44. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 12 Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u metanolu.<sup>89</sup>

Vrpce karbohidrazida za reakciju u metanolu pojavile su se u PC1 i PC2 opterećenjima u područjima od 9500 cm<sup>-1</sup> do 9300 cm<sup>-1</sup>, od 8200 cm<sup>-1</sup> do 7500 cm<sup>-1</sup> te od 5400 cm<sup>-1</sup> do 5200 cm<sup>-1</sup>. Slična razmatranja mogu se primijeniti i na reakciju u propan-2-olu. Pojava vrpci u PC1 i PC2 opterećenjima karakterističnih za karbohidrazid i salicilaldehid nedvojbeno je dokazala da se njihova količina smanjivala tijekom kemijske reakcije.

Karakteristične vrpce za reakcijske produkte opažene su u PC1 opterećenjima za Ramanove spektre *in-line* (Slike 4.43–4.45 b)). Signali pri  $\approx 1600\text{ cm}^{-1}$  i  $\approx 1200\text{ cm}^{-1}$ , čiji se intenzitet povećavao tijekom kemijske reakcije, odgovaraju C=O i C–N vibracijama istezanja. Pojava signala simetričnog C=C istezanja pri  $\approx 1580\text{ cm}^{-1}$  potvrdila je nastanak reakcijskog produkta.



Slika 4.45. a) PC1 faktorski bodovi i b) PC1 opterećenja za skup od 12 Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u propan-2-olu.<sup>89</sup>

## **5. ZAKLJUČAK**



Ova istraživanja su pokazala da je vibracijska spektroskopija *in-line* pogodna tehnika za praćenje procesa sinteze i kristalizacije biološki aktivnih molekula. Primjenom metodologije vibracijske spektroskopije *in-line* bilo je moguće pratiti kemijsku reakciju sinteze entakapona u heptanu, toluenu i izobutil-acetatu. Pojava karakterističnih vibracijskih vrpce *in-line* ukazala je na nastanak entakapona u svim korištenim otapalima. Nadalje, rezultati PCA analize pokazali su da je reakcija u heptanu bila najbrža, što je posljedica manjeg gubitka katalizatora, piperidin-acetata. Dulje trajanje reakcija u toluenu i izobutil-acetatu provedenih pri višim temperaturama bilo je uzrokovano djelomičnim isparavanjem katalizatora, piperidin-acetata.

Isti pristup omogućio je praćenje kristalizacije *E*- izomera entakapona u smjesama otapala aceton/voda 30:70 i 40:60 te toluen/metanol 20:80 i 30:70. Multivarijatna (PCA i IHM) analiza Ramanovih spektara *in-line* pokazala je da polimorfni sastav kristala ovisi o korištenoj smjesi otapala, što je i potvrđeno na temelju usporedbe sa SWAXS spektrima *off-line*. Signali u SWAXS spektrima potvrdili su da je kristalizacijom entakapona u smjesi otapala toluen/metanol 30:70, uz polimorfe  $\beta$  i/ili  $\gamma$ , nastao i barem jedan od polimorfa A, D odnosno  $\alpha$ . S obzirom da se polimorfni oblici A, D i  $\alpha$  nisu mogli identificirati na temelju Ramanovih spektara *in-line*, može se zaključiti da je njihov udio u polimorfnoj smjesi bio vrlo malen. Nadalje, rezultati SWAXS analize su pokazali da su u preostalim otapalima dobiveni samo polimorfi  $\beta$  i/ili  $\gamma$ . Stoga je vidljivo daje polimorfni sastav kristala entakapona, a time i selektivnost kristalizacije bila posljedica različitih svojstava i omjera korištenih otapala.

Daljnja primjena ove metodologije obuhvatila je praćenje reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida u metanolu, etanolu i propan-2-olu kojom je nastala smjesa salicilidenskih derivata karbohidrazida **1** i **2**. Rezultati dobiveni analizom  $^1\text{H}$  NMR spektara pokazali su da udio spojeva **1** i **2** u reakcijskom produktu ovisi o korištenom otapalu. Reakcijski produkt sintetiziran u metanolu sadržavao je najveći udio spoja **1** (58 %). S druge strane, znatno manje spoja **1** dobiveno je reakcijom u propan-2-olu (28 %), dok je u etanolu dobiveno najviše spoja **2** (90 %). Nadalje, karakteristični signali u SWAXS spektrima pokazali su da otapalo utječe i na polimorfni sastav spoja **2** u reakcijskom produktu.

Pomoću NIR i Ramanove spektroskopije *in-line* bilo je moguće pratiti potrošnju reaktanata odnosno nastanak reakcijskih produkata. Rezultati PCA analize Ramanovih spektara *in-line* pokazali su da je brzina reakcije bila proporcionalna temperaturi reakcijske smjese. Tako je kemijska reakcija u etanolu (65°C) i propan-2-olu (75°C) završila nakon približno 15 min odnosno 7 min. S druge strane, reakcija je bila najsporija u metanolu (55 °C) te je završila nakon  $\approx$  29 min. Slični rezultati dobiveni su PCA analizom NIR spektara *in-line*.

Stoga se iz svega navedenog zaključuje da se ovakav istraživački pristup može uspješno primijeniti za *in situ* praćenje kemijske reakcije sinteze i kristalizacije biološki aktivnih molekula. Kombinacijom vibracijske spektroskopije *in-line* i statističkih tehnika moguće je brzo i učinkovito procijenjeniti trajanje pojedinog procesa te preliminarno identificirati dobiveni produkti. Međutim, nizak omjer signala i šuma može otežati analizu i onemogućiti točno određivanje sastava spojeva tehnikama *in-line* pa je stoga neophodno koristiti i tehnike *off-line*.

Za buduće korištenje vibracijske spektroskopije *in-line* u praćenju fizičkih i kemijskih procesa vrlo je važno poznavati karakteristike i složenost sustava koji se analizira kako bi čitav postupak bio uspješan.

## **6. LITERATURA**



1. K. E. Bakeev, *Process analytical technology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford 2005.
2. I. R. Lewis i H. G. M. Edwards, *Handbook of Raman spectroscopy*, Mercel Dekker, New York, 2001.
3. X. Lawrence Yu, R. A. Lionberger, A. S. Raw, R. D'Costa, H. Wu i A. S. Hussain, *Applications of process analytical technology to crystallization processes*, Elsevier Science, Amsterdam, 2003.
4. W. P. Findlay i D. E. Bugay, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **16** (1998) 921–930.
5. J. Li i L. Dai, *Sensor Actuat. B - Chem.* **173** (2012) 385–390.
6. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, Zagreb, 2010.
7. R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis*, John Wiley & Sons Inc., New York, 2000.
8. H. Günzler i H. U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju* (preveli prof. dr. sc. Z. Meić i dr. sc. G. Baranović), Školska knjiga, Zagreb, 2006.
9. M. Hesse, H. Maier i B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
10. Th. Rohe, W. Becker, A. Krey, H. Nägele, S. Kölle i N. Eisenreich, *J. Near Infrared Spectrosc.* **6** (1998) 325–332.
11. G. Tøgersen, J. F. Arnesen, B. N. Nilsen i K. I. Hildrum, *Meat Sci.* **63** (2003) 515–523.
12. C. Coffey, B. E. Cooley Jr. i D. S. Walker, *Analyt. Chim. Acta* **395**(3) (1999) 335–341.
13. M. J. Lee, D. Y. Seo, H. E. Lee, I. C. Wang, W. S. Kim, M. Y. Jeong i G. J. Choi, *Int. J. Pharm.* **403** (2011) 66–72.

14. A. D. Karande, P. W. S. Heng i C. V. Liew, *Int. J. Pharm.* **396** (2010) 63–74.
15. K. Kamada, S. Yoshimura, M. Murata, H. Murata, H. Nagai, H. Ushio i K. Terada, *Int. J. Pharm.* **368** (2009) 103–108.
16. J. Mantanus, E. Ziémons, E. Rozet, B. Streel, R. Klinkenberg, B. Evrard, J. Rantanen i P. Hubert, *Talanta* **83** (2010) 305–311.
17. A. Gupta, G. E. Peck, R. W. Miller i K. R. Morris, *J. Pharm. Sci.* **94** (2005) 1589–1597.
18. D. Pappas, B. W. Smith i J. D. Winefordner, *Talanta* **51** (2000) 131–144.
19. A. M. Schwartz i K. A. Berglund, *J. Cryst. Growth* **203** (1999) 599–603.
20. K. C. Schuster, H. Ehmoser, J. R. Gapes i B. Lendl, *Vib. Spectrosc.* **22** (2000) 181–190.
21. I. L. Tuinman, J. Veenstra, J. C. M. Marijnissen, B. Scarlett i J. Schoonman, *J. Aerosol Sci.* **27** (1996) S295–S296.
22. S. E. Barnes, M. G. Sibley, H. G. M. Edwards i P. D. Coates, *Trans. Inst. Meas. Contr.* **29** (2007) 453–465.
23. B. H. Stuart, *Spectrochim. Acta Part A* **53** (1997) 107–110.
24. P. Novak, A. Kišić, T. Hrenar, T. Jednačak, S. Miljanić i G. Vrbanec, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **54** (2011) 660–666.
25. T. Jednačak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, M. Marijan, J. G. Khinast i P. Novak, *Acta Pharm.*, u tisku.
26. N. Chieng, T. Rades i J. Aaltonen, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **55** (2011) 618–644.
27. O. Svensson, M. Josefson i F. W. Langkilde, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **49** (1999) 49–66.

28. T. R. M. De Beer, W. R. G. Baeyens, J. Ouyang, C. Vervaet i J. P. Remon, *Analyst* **131** (2006) 1137–1144.
29. H. Wikström, P. J. Marsac i L. S. Taylor, *J. Pharm. Sci.* **94** (2005) 209–219.
30. G. Févotte, *Chem. Eng. Res. Des.* **85** (2007) 906–920.
31. J. Aaltonen, K. C. Gordon, C. J. Strachan i T. Rades, *Int. J. Pharm.* **364** (2008) 159–169.
32. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi i J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of chemometrics and qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
33. K. R. Beebe, R. J. Pell i M. B. Seasholtz, *Chemometrics: a practical guide*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1998.
34. M. J. Adams, *Chemometrics in analytical spectroscopy*, 2nd Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2004.
35. E. Kriesten, F. Alsmeyer, A. Bardow i W. Marquardt, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **91** (2008) 181–193.
36. E. Kriesten, D. Mayer, F. Alsmeyer, C. B. Minnich, L. Greiner i W. Marquardt, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **93** (2008) 108–119.
37. H.-E. Lee, M.-J. Lee, W.-S. Kim, M.-Y. Jeong, Y.-S. Cho i G.-J. Choi, *Int. J. Pharm.* **420** (2011) 274–281.
38. J. B. Lambert i E. P. Mazzola, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications and experimental methods*, Pearson Education Inc., New Jersey, 2002.
39. E. D. Becker, *High resolution NMR*, Academic Press, San Diego, 2000.

40. E. Breitmaier, *Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide*, John Wiley & Sons Inc., Chichester, 2002.
41. L. Ronconi i P. J. Sadler, *Coordin. Chem. Rev.* **252** (2008) 2239–2277.
42. O. Zerbe, *Bio NMR in drug research*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002.
43. P. Novak i T. Jednačak, u Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery and development*, IAPC Publishing, Zagreb 2012, str. 189.
44. T. Jednačak, P. Novak, K. Užarević, I. Bratoš, J. Marković i M. Cindrić, *Croat. Chem. Acta* **84**(2) (2011) 203–209.
45. P. Novak, T. Jednačak, J. Parlov Vuković, K. Zangger, M. Rubčić, N. Galić i T. Hrenar, *Croat. Chem. Acta* **85** (4) (2012) 451–456.
46. O. Glatter i O. Kratky, *Small angle X-ray scattering*, London/Tokyo: Academic Press, 1982.
47. A. Hodzic, M. Llusa, S. D. Fraser, O. Scheibelhofer, D. M. Koller, F. Reiter, P. Laggner i J. G. Khinast, *Int. J. Pharm.* **428** (2012) 91–95.
48. A. Hodzic, M. Llusa, N. Heigl, W. Tritthart, S. D. Fraser, P. Laggner i J. G. Khinast, *Powder Tech.* **221** (2012) 447–452.
49. A. Hodzic, P. Zoumpoulakis, G. Pabst, T. Mavromoustakos i M. Rappolt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14** (2012) 4780–4788.
50. A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner i G. Pabst, *Biophys. J.* **94** (2008) 3935–3944.

51. C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, K. Viras, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, G. Pabst, F. Cacho-Nerin, P. Laggner i M. Rappolt, *Biochym. Biophys. Acta* **1808** (2011) 1753–1763.
52. R. Hilfiker, *Polymorphism in the pharmaceutical industry*, John Wiley & Sons Inc., Weinheim, 2006.
53. A. S. Myerson, *Handbook of industrial crystallization*, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 2002.
54. J. Halebian i W. McCrone, *J. Pharm. Sci.* **58**(1969) 911–929.
55. D. Singhal i W. Curatolo, *Adv. Drug Delivery Rev.* **56** (2004) 335–347.
56. B. Yu. Shekunov i P. York, *J. Cryst. Growth*, **211** (2000) 122–136.
57. A. Hédoux, Y. Guinet i M. Descamps, *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 17–31.
58. T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J. P. Remon i C. Vervaet, *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 32–47.
59. G. X. Zhou, L. Crocker, J. Xu, J. Tabora i Z. Ge, *J. Pharm. Sci.* **95** (2006) 2337–2347.
60. G. Févotte, J. Calas, F. Puel i C. Hoff, *Int. J. Pharm.* **273** (2004) 159–169.
61. E. Räsänen, J. Rantanen, A. Jørgensen, M. Karjalainen, T. Paakkari i J. Yliruusi, *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 389–396.
62. L. E. O’Brien, P. Timmins, A. C. Williams i P. York, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **36** (2004) 335–340.
63. H. Qu, H. Alatalo, H. Hatakka, J. Kohonen, M. Louhi-Kultanen, S.-P. Reinikainen i J. Kallas, *J. Cryst. Growth* **311** (2009) 3466–3475.

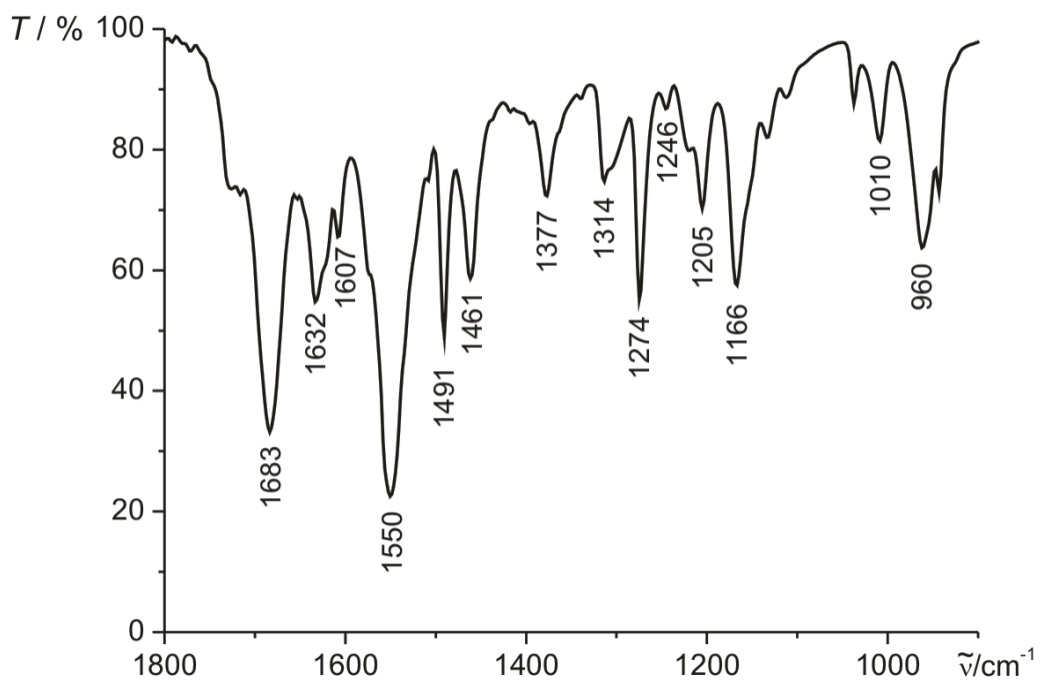
64. P. T. Männistö i S. Kaakkola, *Pharmacol. Rev.* **51** (1999) 593–628.
65. R. Iannsek i M. Danoudis, *Parkinsonism Relat. D.* **17** (2011) 533–536.
66. J. Leppänen, E. Wegelius, T. Nevalainen, T. Järvinen, J. Gynther i J. Huuskonen, *J. Mol. Struct.* **562** (2001) 129–135.
67. T. Wikberg, P. Ottoila i J. Taskinen, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **18** (1993) 359–367.
68. M. Ratkaj, T. Biljan i S. Miljanić, *Appl. Spectrosc.* **66** (2012) 1468–1474.
69. G. S. Chittoor, J. Munusamy, N. V. S. P. A. Muppid i R. B. Uday, *Eur. Patent Appl.* EP 1976824 A1.
70. M. S. M, Jaweed, R. A. R. Khan, R. P. Yadav i Z. G. Shaikh, *US Patent Appl.* WO 2005/066117 A1.
71. T. Bader, M. Furegati i O. Jungmann, *Eur. Patent Appl.* EP 1713768 A2.
72. S. Mantegazza, P. Allegrini i G. Razzetti, *Eur. Patent Appl.* EP 1 935 873 B1.
73. A. Kwokal, T. T. H. Nguyen i K. J. Roberts, *Cryst. Growth. Des.* **9** (2009) 4324–4334.
74. M. Zia-ur-Rehman, J. A. Choudary, M. R. J. Elsegood, H. L. Siddiqui i K. M. Khan, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 1311–1316.
75. N. Ahmad, M. Zia-ur-Rehman, H. L. Siddiqui, M. F. Ullah i M. Parvez, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 2368–2377.
76. T. Aboul-Fadl, F. A. S. Bin-Jubair i O. Aboul-Wafa, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 4578–4586.
77. A. S. Nazari Formagio, P. R. Santos, K. Zanolli, T. Ueda-Nakamura, L. T. Düsman Tonin, C. V. Nakamura i M. H. Sarragiotto, *Eur. J. Med. Chem.* **44**(2009) 4695–4701.

78. W. X. Feng, Y. N. Hui, G. X. Shi, D. Zhou, X. Q. Lü, J. R. Song, D. D. Fan, W. K. Wong i R. A. Jones, *Inorg. Chem. Commun.* **20** (2012) 33–36.
79. F. J. Barragan de la Rosa, J. L. Gómez Ariza i F. Pino, *Talanta* **30** (1983) 555–564.
80. D. Rosales, G. Gonzalez i J. L. Gómez Ariza, *Talanta* **32** (1985) 467–474.
81. F. J. Barragan de la Rosa, R. Escobar Godoy i J. L. Gómez Ariza, *Talanta* **35** (1988) 343–349.
82. F. Alvarez, F. de Pablos i J. L. Gómez Ariza, *Talanta* **35** (1988) 493–495.
83. M. Hosseini, M. R. Ganjali, B. Veismohammadi, P. Norouzi, K. Alizadeh i S. D. Abkenar, *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **30** (2010) 348–351.
84. S. Chandra, Deepshikha i A. Sarkar, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **107** (2013) 271–279.
85. E. Pelttari, E. Karhumäki, J. Langshaw i H. Elo, *Z. Naturforsch.* **62c** (2007) 483–486.
86. M. Rubčić, N. Galić, P. Novak, T. Jednačak, J. Plavec i P. Šket, poslano u *Cryst. Growth Des.*
87. F. R. Dollish, W. G. Fateley i F. F. Bentley, *Characteristic Raman frequencies of organic compounds*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1974.
88. J. Workman (Jr.) i L. Weyer, *Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008.
89. T. Jednačak, P. Novak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, J. G. Khinast, J. Plavec, P. Šket i J. Parlov Vuković, poslano u *Acta Chim. Slov.*

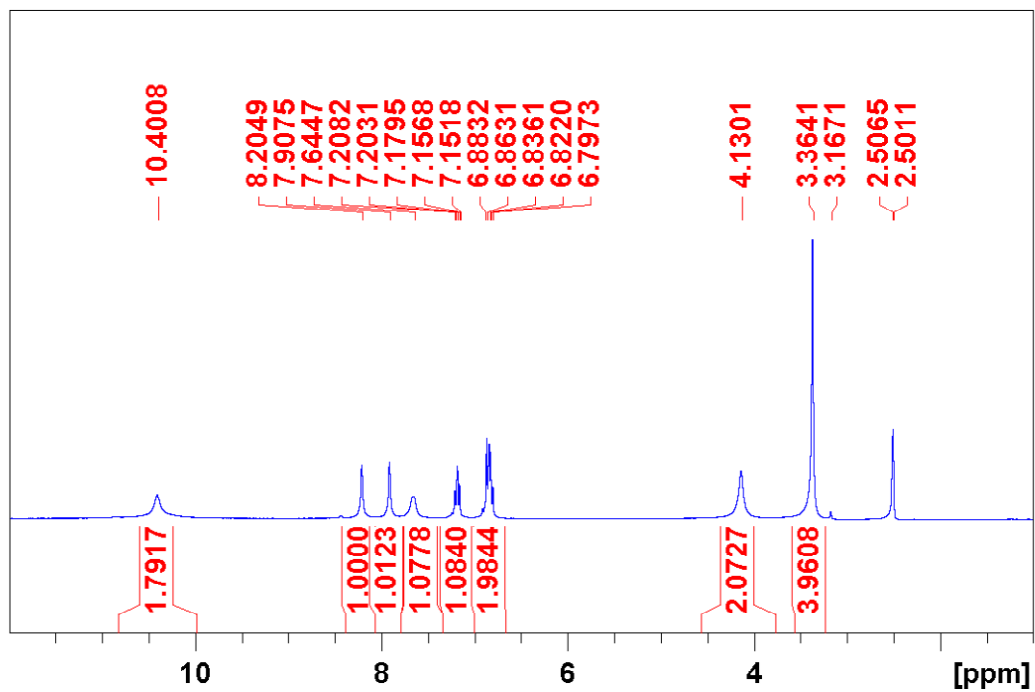


## **7. DODATAK**

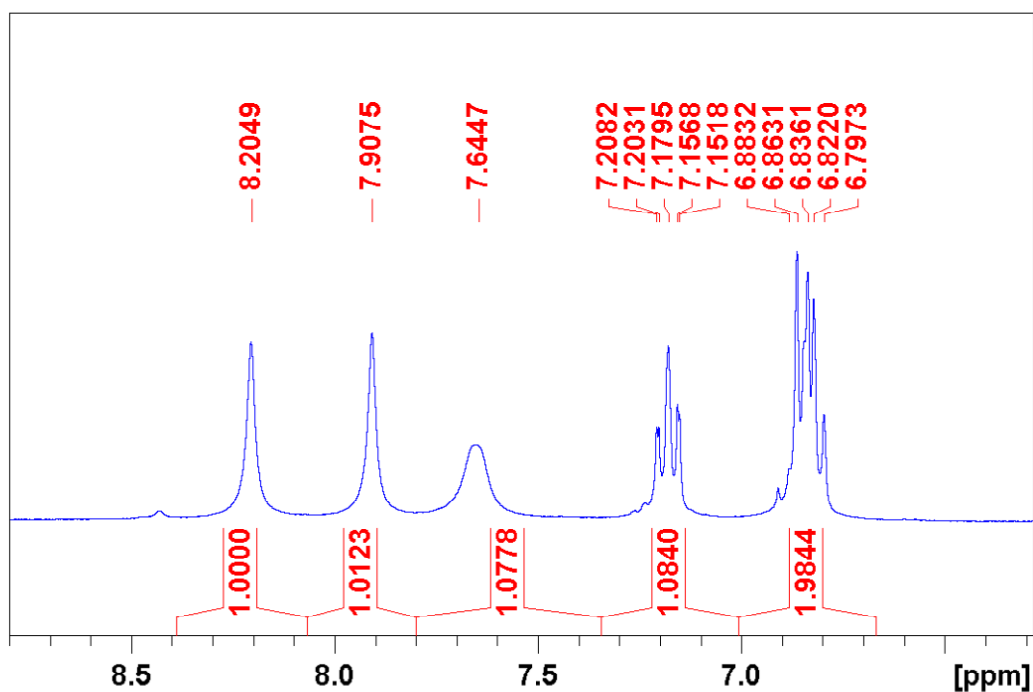




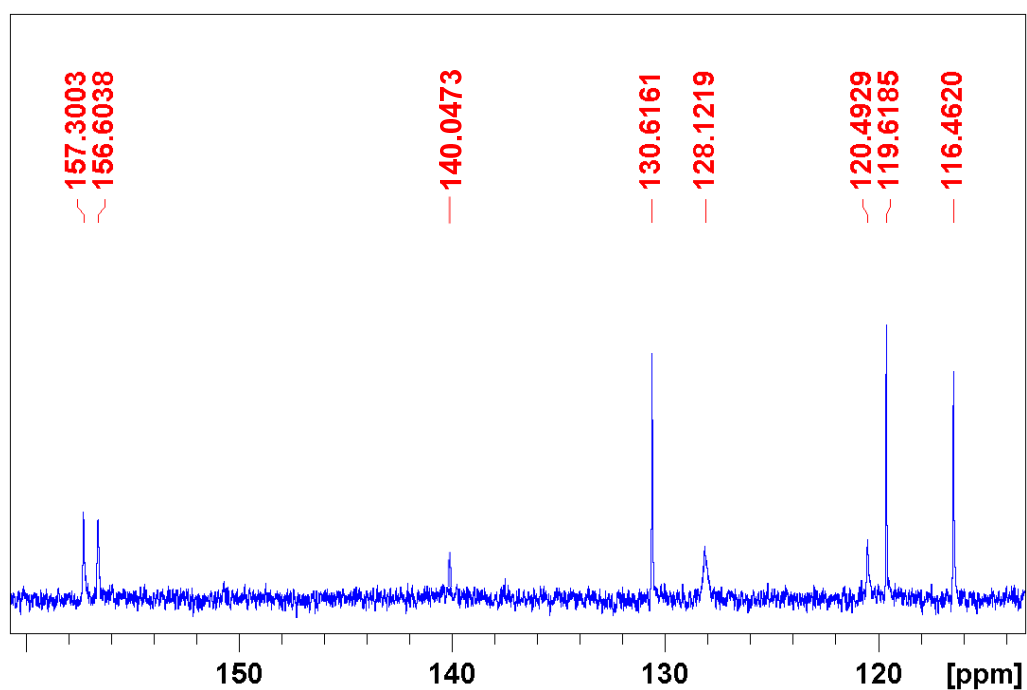
Slika 7.1. IR spektar spoja **1** snimljen tehnikom KBr pastile.



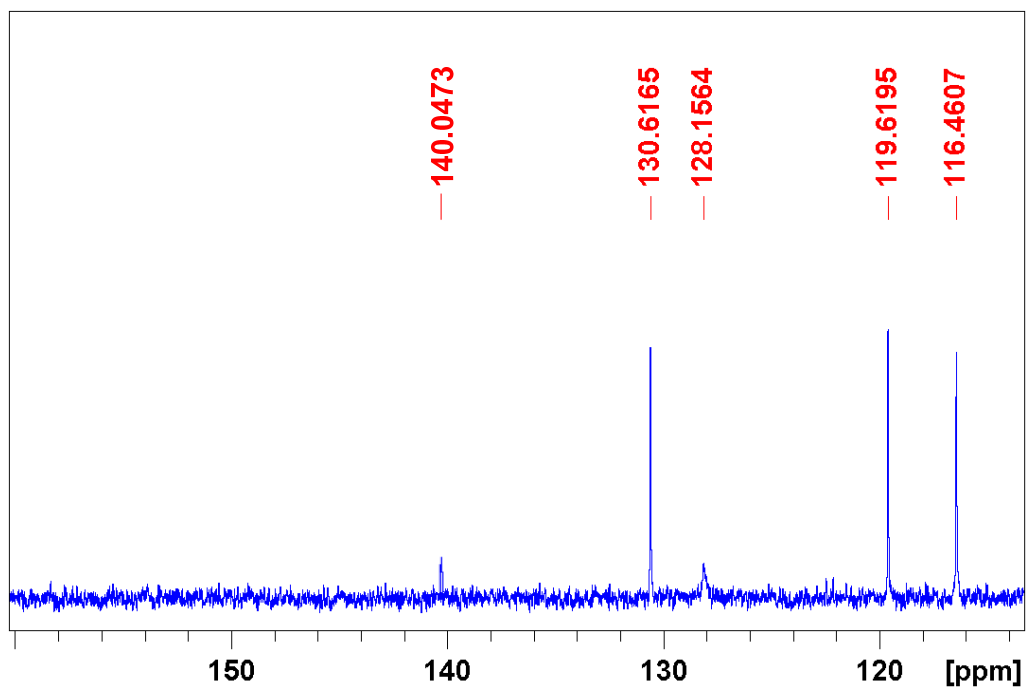
Slika 7.2.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **1** snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$ .



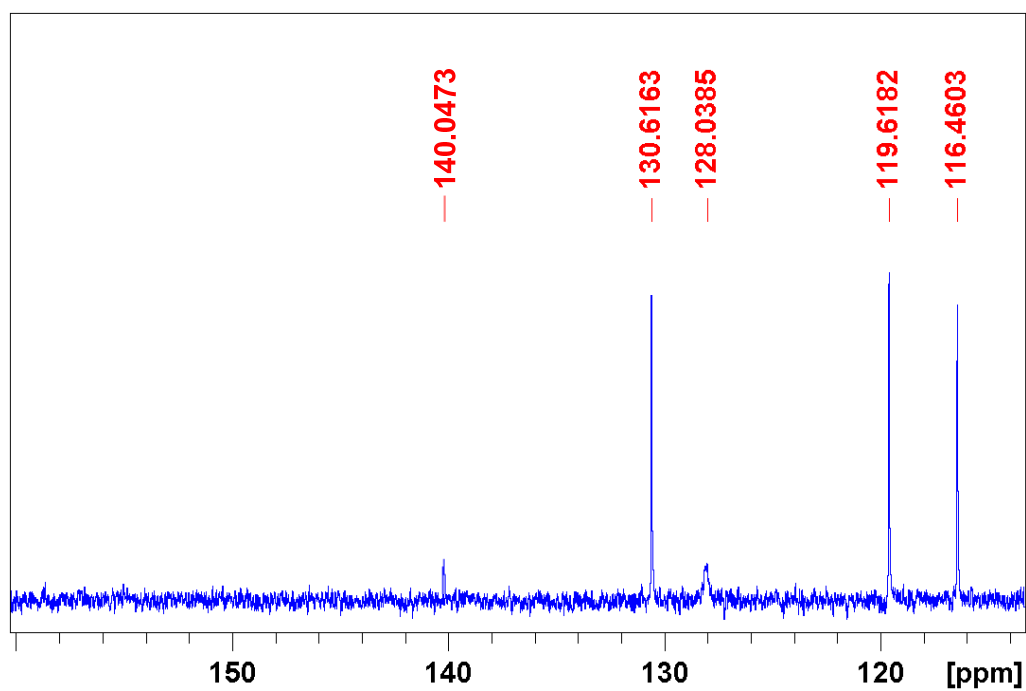
Slika 7.3. Uvećani prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra spoja **1** snimljenog u  $\text{DMSO-d}_6$  u području od 5,8 ppm do 8,8 ppm.



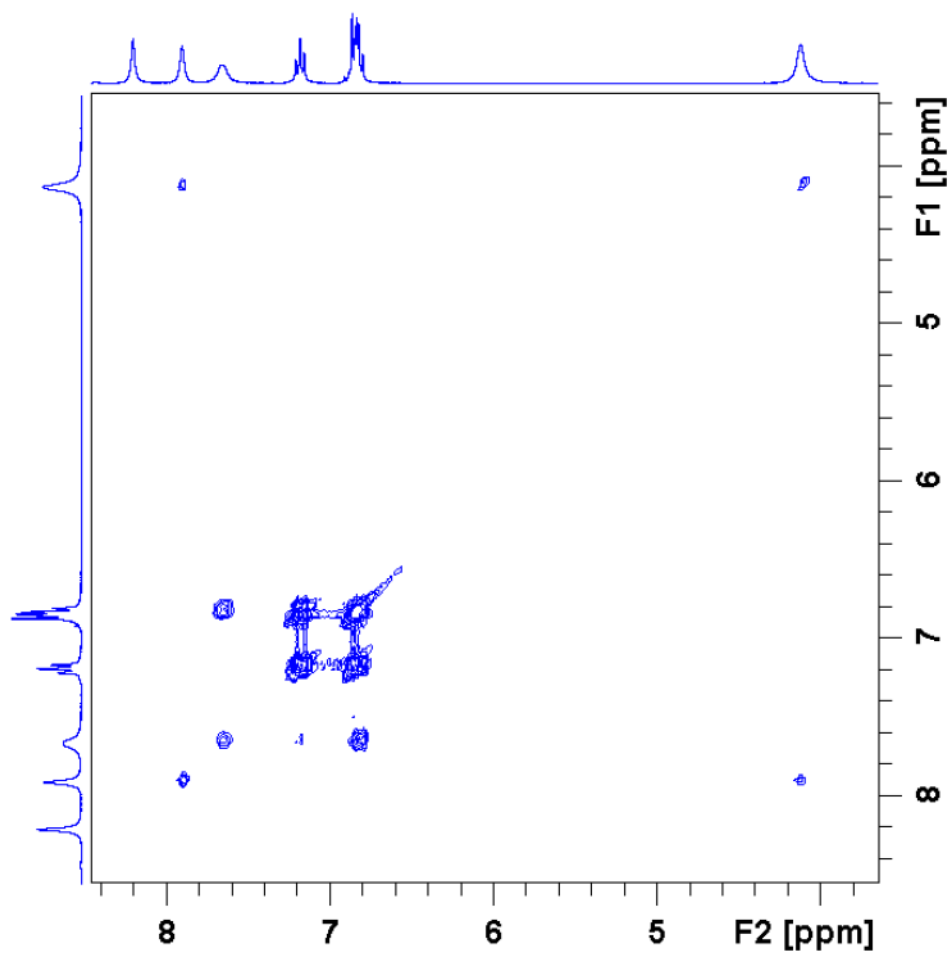
Slika 7.4. Potpuno raspregnuti  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **1** snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$ .



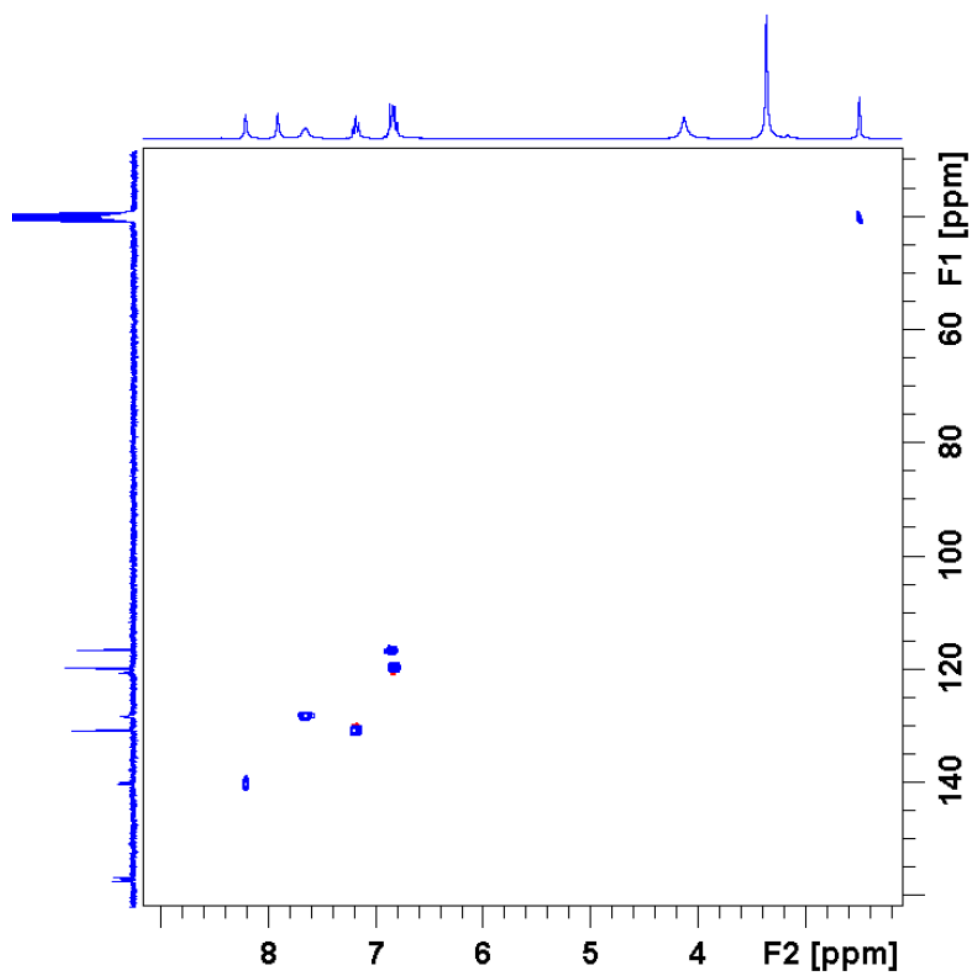
Slika 7.5. DEPT-135 NMR spektar spoja **1** snimljen u DMSO-d<sub>6</sub>.



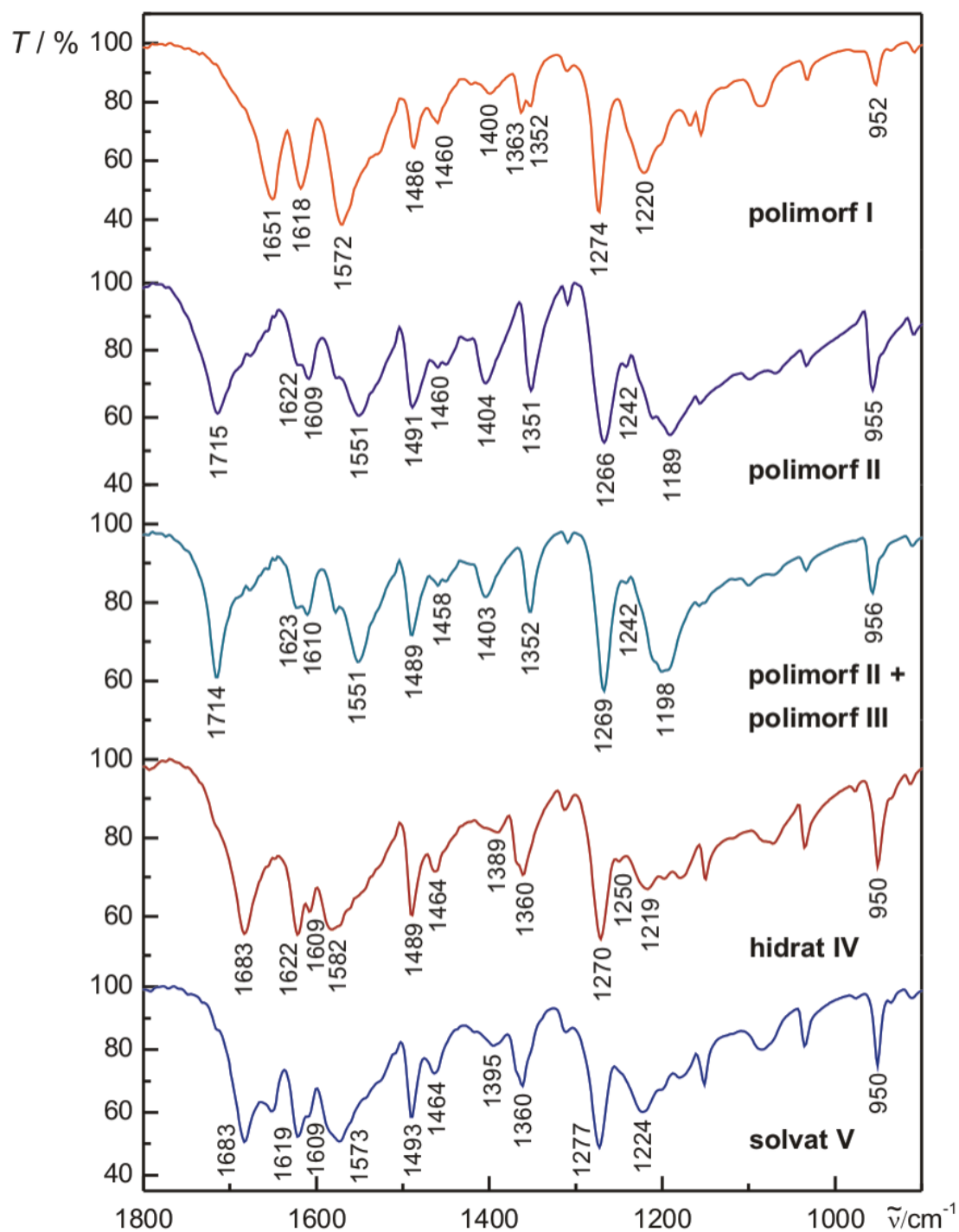
Slika 7.6. DEPT-90 NMR spektar spoja **1** snimljen u DMSO-d<sub>6</sub>.



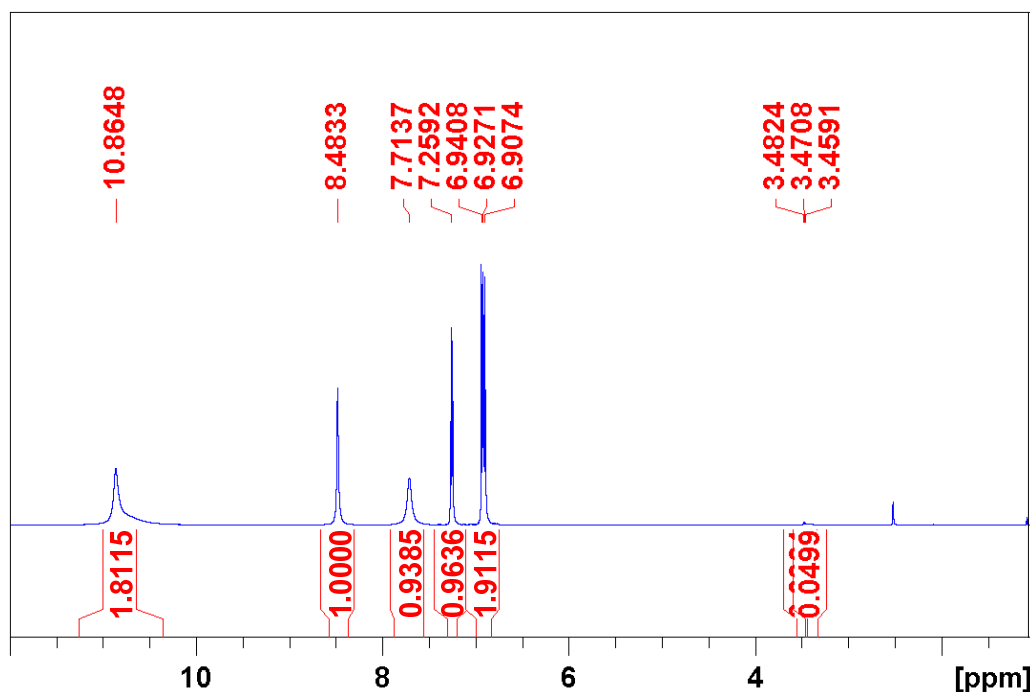
Slika 7.7. COSY spektar spoja **1** snimljen u DMSO- $d_6$ .



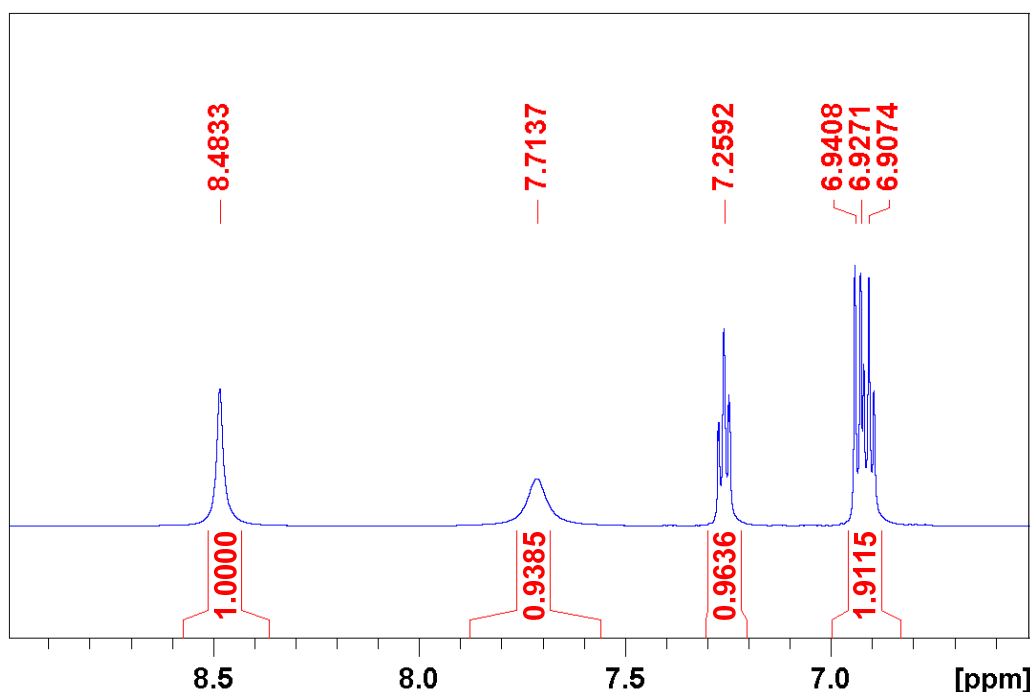
Slika 7.8. HSQC spektar spoja **1** snimljen u DMSO-d<sub>6</sub>.



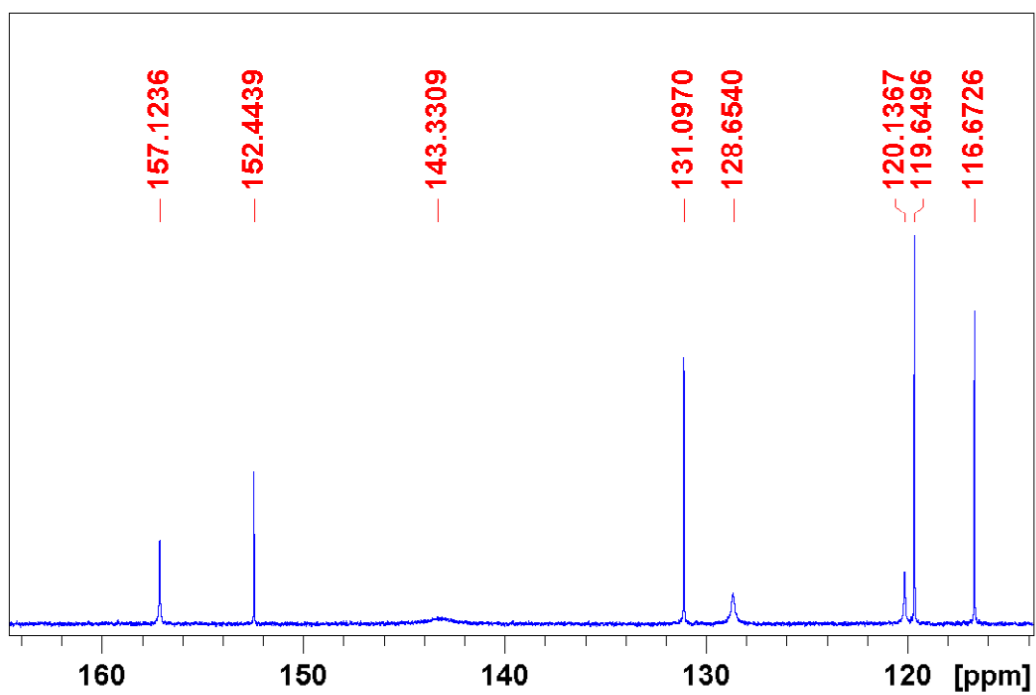
Slika 7.9. IR spektri *off-line* kristalografskih oblika I–V spoja 2 u području od  $1800 \text{ cm}^{-1}$  do  $900 \text{ cm}^{-1}$ .



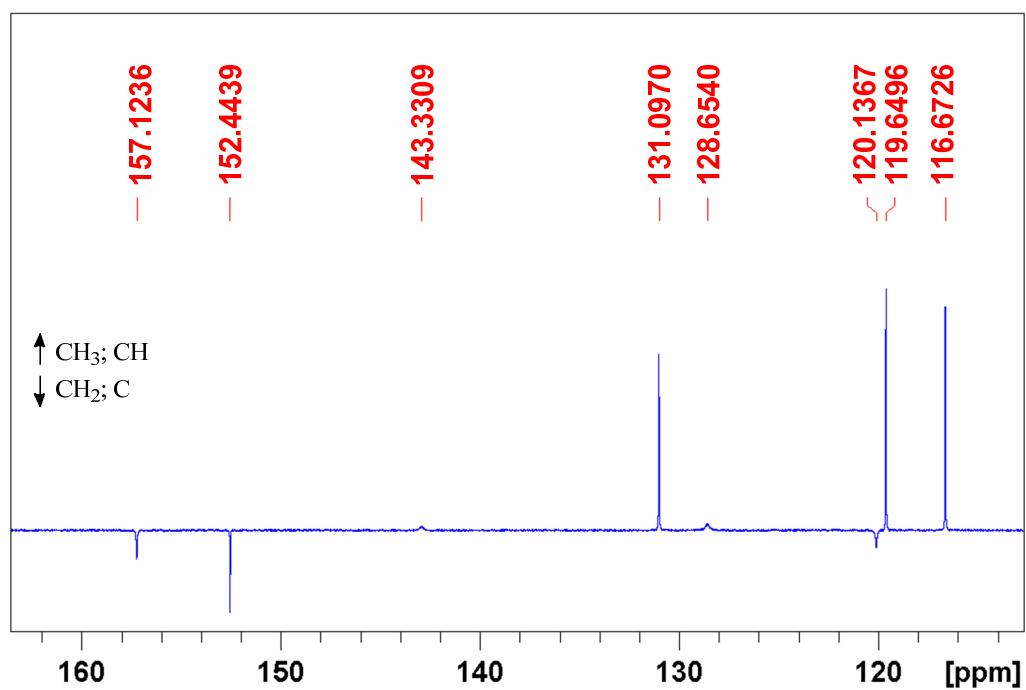
Slika 7.10. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 2 snimljen u DMSO-d<sub>6</sub>.



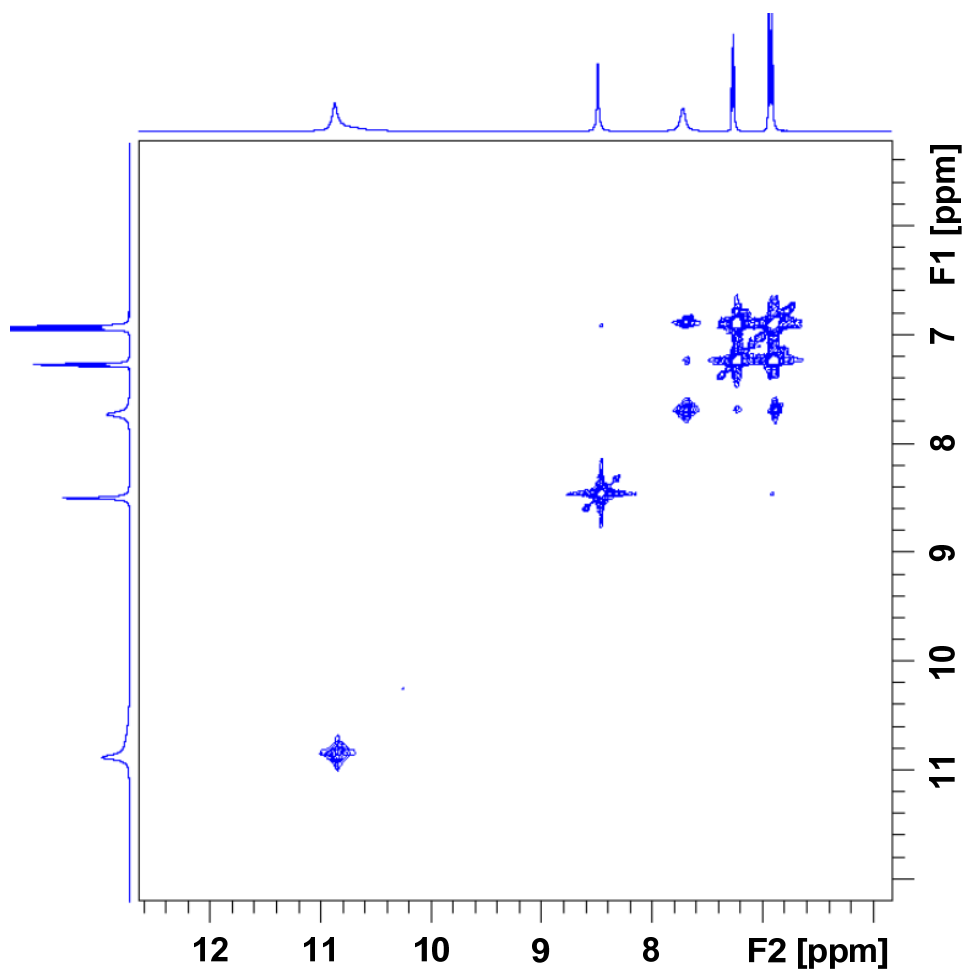
Slika 7.11. Uvećani prikaz <sup>1</sup>H NMR spektra spoja 2 snimljenog u DMSO-d<sub>6</sub> u području od 6,0 ppm do 9,0 ppm.



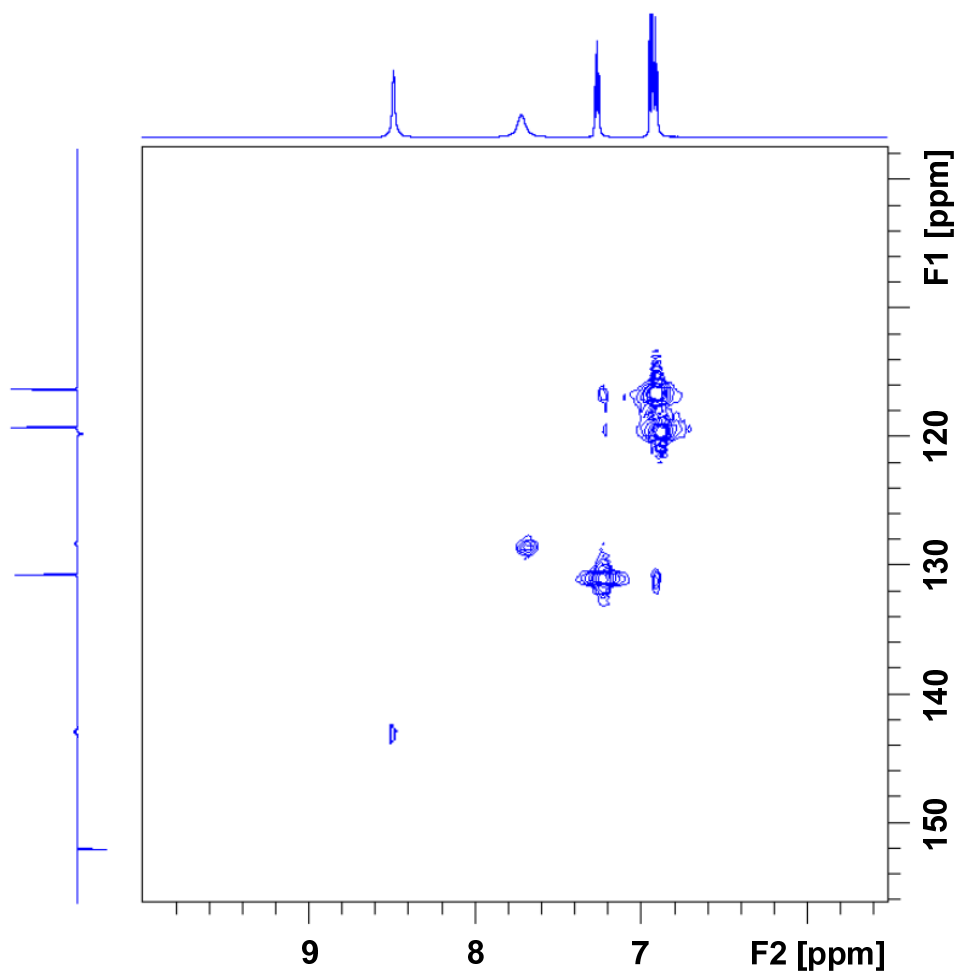
Slika 7.12. Potpuno raspregnuti  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **2** snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$ .



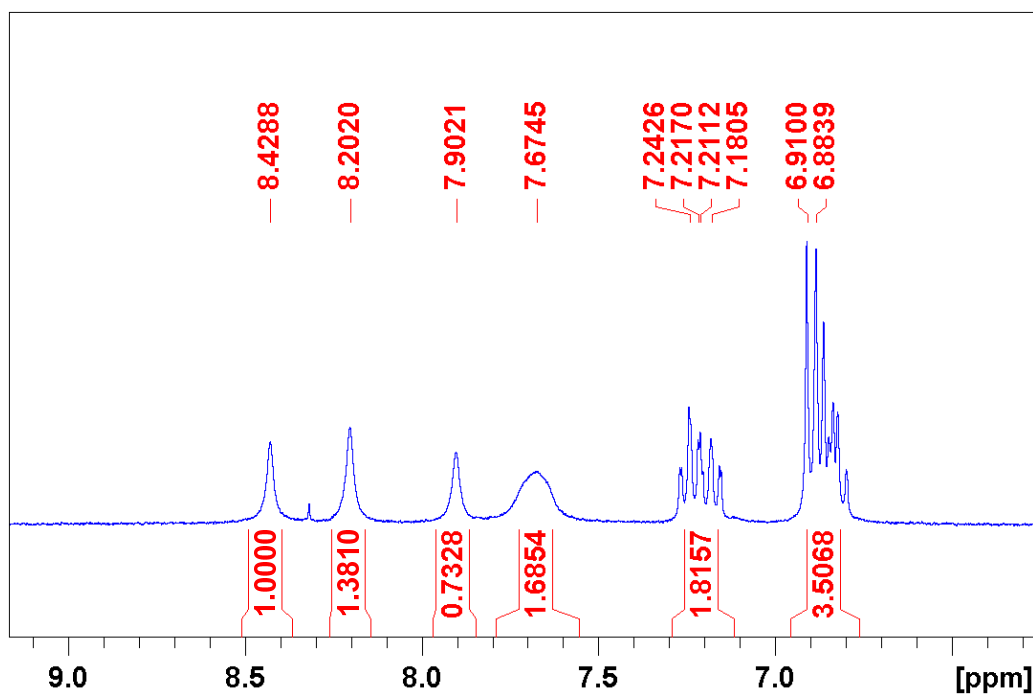
Slika 7.13. APT spektar spoja **2** snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$ .



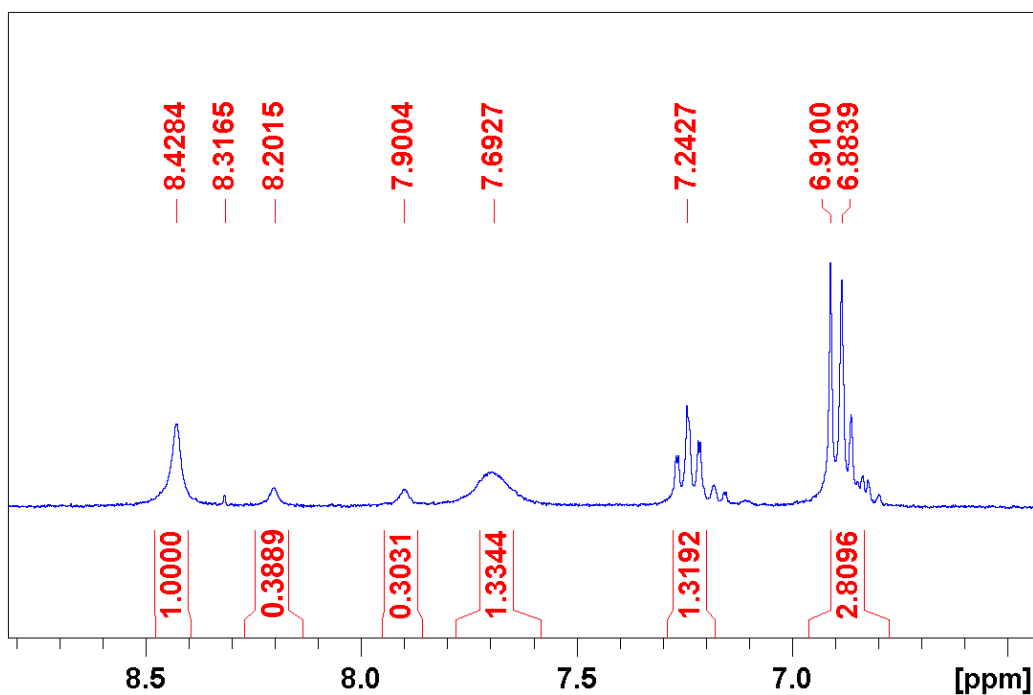
Slika 7.14. COSY spektar spoja **2** snimljen u DMSO-d<sub>6</sub>.



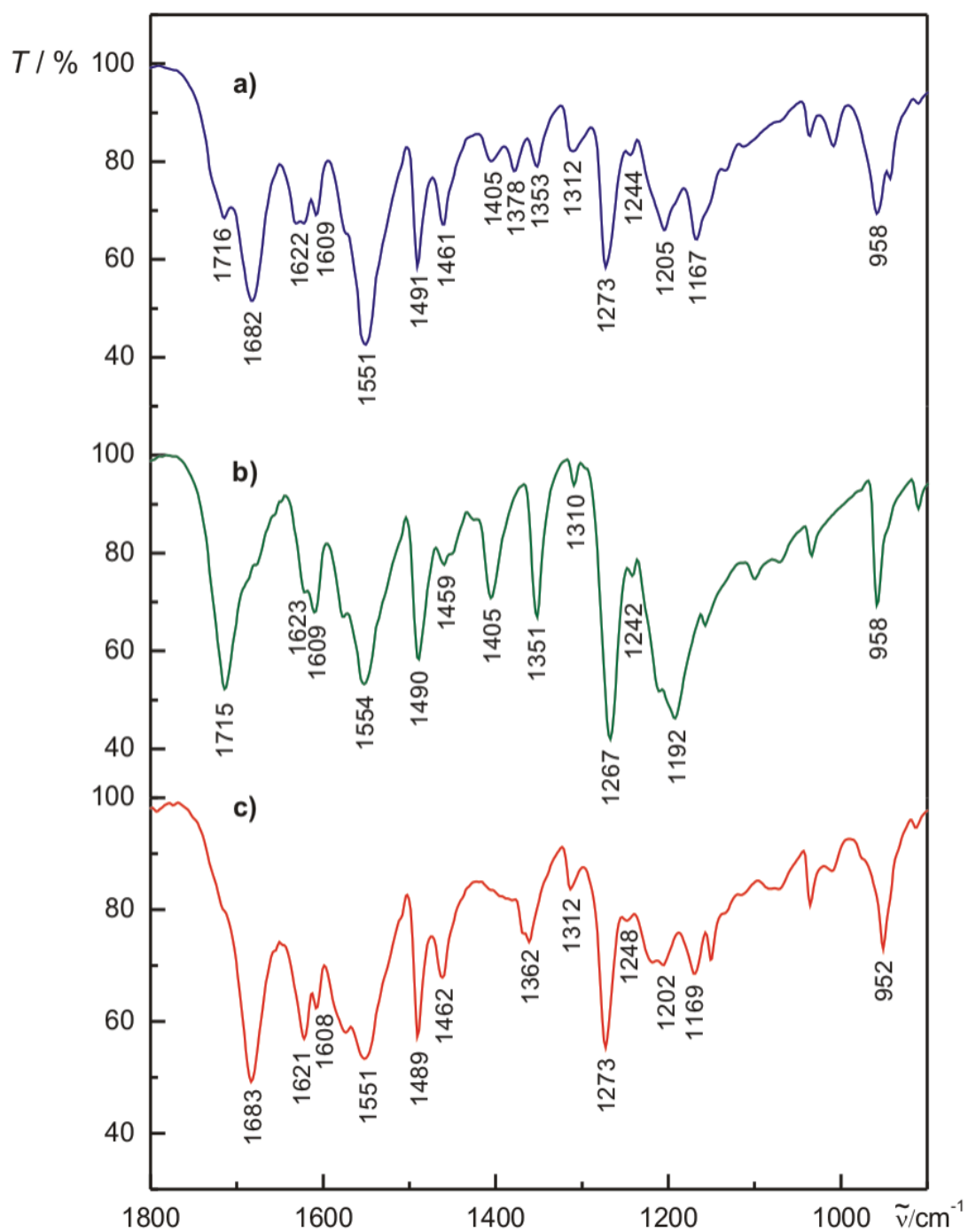
Slika 7.15. HSQC spektar spoja **2** snimljen u DMSO-d<sub>6</sub>.



Slika 7.16. Uvećani prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra reakcijskog produkta dobivenog u metanolu snimljenog u  $\text{DMSO-d}_6$  u području od 6,3 ppm do 9,1 ppm.



Slika 7.17. Uvećani prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra reakcijskog produkta dobivenog u propan-2-olu snimljenog u  $\text{DMSO-d}_6$  u području od 6,5 ppm do 8,8 ppm.



Slika 7.18. IR spektri *off-line* reakcijskih produkata dobivenih u a) metanolu; b) etanolu i c) propan-2-olu u području od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $900\text{ cm}^{-1}$ .

## **8. ŽIVOTOPIS**



Rođen sam 14. kolovoza 1985. godine u Sisku, gdje sam pohađao osnovnu i srednju školu. Nakon položene mature u Gimnaziji Sisak, 2004. godine sam upisao Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kemijski odsjek, smjer dipl. ing. kemije gdje sam diplomirao 2008. godine. Zaposlio sam se na istoj ustanovi 2009. godine u znanstveno-nastavnom zvanju asistenta. Područje istraživanja kojim se trenutno bavim obuhvaća razvoj metodologije vibracijske spektroskopije *in-line* za *in situ* praćenje sinteze i kristalizacije biološki aktivnih molekula te njihovu strukturnu karakterizaciju u otopini i čvrstom stanju pomoću tehnika vibracijske spektroskopije, spektroskopije NMR i SWAXS analize. Tijekom doktorskog studija boravio sam Tehničkom sveučilištu u Grazu gdje sam proučavao kemijske reakcije i kristalizaciju biološki aktivnih tvari koristeći NIR spektroskopiju *in-line*, multivarijatne metode analize i tehniku SWAXS te na Sveučilištu u Pečuhu gdje sam usavršavao eksperimentalnu primjenu tehnika spektroskopije NMR.

Sudjelovao sam s usmenim priopćenjima na VIII. skupu mladih inženjera (Zagreb, Hrvatska, 2010.), XXII. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera (Zagreb, Hrvatska 2011.) te međunarodnom skupu "Magnetic moments in central Europe" (Semmering, Austrija 2013.). Nadalje, sudjelovao sam kao koautor na posterskim priopćenjima na međunarodnim skupovima "European congress on molecular spectroscopy" (Opatija, Hrvatska 2008.) i "XXII International conference on Raman spectroscopy" (Boston, SAD, 2010.) te na XXII. i XXIII. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera održanom u Zagrebu odnosno Osijeku. Bio sam i sudionik Ljetne škole spektroskopije NMR održane u Niederöblarnu, Austrija, 2010. te Škole forenzike održane u Izmiru, Turska 2013.

Doktorsku disertaciju sam izradio na Zavodu za analitičku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Predraga Novaka, red. prof.



## **9. POPIS RADOVA**



## Originalni znanstveni članci

1. P. Novak, A. Kišić, T. Hrenar, T. Jednačak, S. Miljanić, G. Vrbanec, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 660–666.
2. T. Jednačak, P. Novak, K. Užarević, I. Bratoš, J. Marković, M. Cindrić, *Croat. Chem. Acta* **84** (2) (2011) 203–209.
3. P. Novak, T. Jednačak, J. Parlov Vuković, K. Zangger, M. Rubčić, N. Galić, T. Hrenar, *Croat. Chem. Acta* **85**(4) (2012) 451–456.
4. T. Jednačak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, M. Marijan, J. G. Khinast, P. Novak, "Fast real-time monitoring of entacapone crystallization and characterization of polymorphs via Raman spectroscopy, statistics and SWAXS", *Acta Pharm.*, u tisku
5. T. Jednačak, P. Novak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, J. G. Khinast, J. Plavec, P. Šket, J. Parlov Vuković, "In situ monitoring of condensation reaction between carbohydrazide and salicylaldehyde and characterization of the reaction products", poslano za publiciranje u *Acta Chim. Slov.*

## Pregledni članci

1. T. Jednačak, P. Novak, *Kem. Ind.* **62** (3-4) (2013) 71–80.

## Sveučilišni udžbenik

1. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, Zagreb, 2013., u tisku.

## Poglavlja u knjizi

1. P. Novak, T. Jednačak, "NMR spectroscopy for studying interactions of bioactive molecules" u Z. Mandić (ur.), "Physico-chemical methods in drug discovery and development", IAPC Publishing, Zagreb 2012.
2. P. Novak, T. Jednačak, "The use of vibrational spectroscopy as a tool for in-line process monitoring", poslano za publiciranje u "Process control: theory, applications and challenges", Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, SAD.