Sintetske, strukturne i stabilitetne studije u redu tireostatika metimazola

Štefan, Leo

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:571156

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Leo Štefan

SINTETSKE, STRUKTURNE I STABILITETNE STUDIJE U REDU TIREOSTATIKA METIMAZOLA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Miljenko Dumić

Rijeka, 2021.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Leo Štefan

SYNTHETIC, STRUCTURAL AND STABILITY STUDIES IN THE SERIES OF THYREOSTATIC METHIMAZOLE

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof.dr.sc. Miljenko Dumić

Rijeka, 2021

Ova doktorska disertacija izrađena je uz financijsku potporu Jadran galenskog laboratorija (JGL) d.d.

U sklopu disertacije ostvarena je uspješna među institucijska suradnja s Institutom Ruđer Bošković, Prirodoslovno matematičkim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu, Odjelom za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci te tvrtkom Fidelta d.o.o iz Zagreba.

Najljepše se zahvaljujem mentoru prof dr. sc. Miljenku Dumiću na pruženom povjerenju, uloženom vremenu, vođenju i trudu tijekom svih ovih godina te savjetima tijekom izrade i pisanja disertacije. Bez njegove podrške, razumijevanja, sjajnog vodstva i velikog, velikog strpljenja ove zahvale ne bi ni bilo.

Hvala kolegici dr.sc. Ani Čikoš na prijateljskom pristupu, korisnim savjetima i neprocjenjivoj logističkoj potpori tijekom snimanja NMR spektara, a kolegi dr.sc. Robertu Vianellu dugujem riječi hvale na potpori oko računalnih simulacija.

Prof.dr.sc. Dubravki Matković Čalogović i prof.dr.sc. Ivici Điloviću hvala na snimljenim strukturama, na diskusijama i znanju koji ste mi prenijeli.

Hvala dragom kolegi dr.sc. Darku Filiću na asistenciji tijekom difrakcijskih i termalnih analiza i dugim diskusijama oko kemije čvrstog stanja.

Zahvala dr.sc. Lari Saftić Martinović na pomoći oko interpretacije masenih spektara i svekolikim diskusijama.

Veliko hvala JGL timu Istraživanja i razvoja na razumijevanju i strpljenju.

Zahvaljujem se svim dragim kolegama iz JGL-a na prenesenom znanju i savjetima.

Hvala svim mojim prijateljima na podršci.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima, Loredani i Tončiju, na potpori i ljubavi, na svim malim i velikim ustupcima te znakovima pažnje.

Najveće hvala mojoj supruzi Ani koja je sa mnom prošla kroz baš svaku fazu ovog studija, svaku krizu i svaki uspjeh. Hvala za godine podrške, velike ljubavi i razumijevanja.

Veliko hvala i mojoj djeci Filipu i Juliji na neizmjernom strpljenju.

Zahvaljujem poslovodstvu Jadran galenskog laboratorija (JGL) d.d. na financijskoj podršci i povjerenju.

Leo

Sadržaj

SAŽETAK……X

ABSTRACT……XI

1. UVOD……...1

2. LITERATURNI PREGLED……...3

2.1. Štitnjača, njezine bolesti i terapija……3

2.1.1. Anatomija i funkcija štitnjače……....3

2.1.2. Biosinteza hormona štitnjače……4

2.1.3. Bolesti štitnjače……5

2.1.4. Liječenje hipertireodizma……..5

2.1.5. Tržište tireostatika……7

2.2. Metimazol……8

2.2.1. Opis……...9

2.2.2. Spektroskopska svojstva……...9

2.2.3. Čvrste forme metimazola……12

2.2.4. Kemijska svojstva……...15

2.2.5. Sinteze metimazola……20

2.2.6. Stabilnost i onečišćenja metimazola……22

2.2.7. Metalni kompleksi……...24

2.2.8. Primjena……..26

Humana medicina……..26

Veterinarska medicina……27

Tehnika……..28

2.2.9. Mehanizam djelovanja i metabolizam……..…28

2.2.10. Toksicitet…….……32

2.2.11. Metode analize……33

3. EKSPERIMENTALNI DIO……...37

3.1. Karakterizacija metimazola prema farmakopeji……..……37

3.2. Određivanje topljivosti metimazola……..……...38

3.3. Metode spektroskopske karakterizacije……..……39

3.3.1. Infracrvena spektrofotometrija (IR)……..……39

3.3.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)…….……..39

3.3.3. MALDI TOF/TOF……...40

3.3.4. MS-QQQ……40

3.4. Termalne metode…….…..41

3.4.1. Termogravimetrijska analiza (TGA)……...41

3.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)……41

3.4.3. Termalna mikroskopija (HSM)……...41

3.5. Kromatografske metode…….……..41

3.5.1. UHPLC……41

3.5.2. LC-MS……42

3.5.3. Ionska kromatografija…….……43

3.5.4. Plinska kromatografija…….……44

3.6. Difrakcijske metode……..……44

3.6.1. Difrakcija rentgenskih zraka na polikristaliničnom uzorku (PXRD)……..44

3.6.2. Rentgenska strukturna analiza……44

3.7. Sintetske studije…….……...45

3.7.1. 1,1-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2b**)……45

3.7.2. Diklormetanski solvat 1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidrogenklorida (**2c**)……..…46

3.7.3. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid tetrahidrat (**3b**)……...…….…..47

3.7.4. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3a**)…….……47

3.7.5. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidrat (**3c**)…….……48

3.7.6. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid (**3d**)…….……...48

3.7.7. 2-[(Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**)…….……...49

3.7.8. 7-Metil-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**)…….……...50

3.7.9. 7-Metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum tetrafluoroborat (**7b**)…….…….51

3.7.10. Bis-{2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebro(I)tetrafluoroborat (**10**)……...….51

3.7.11. 2,3-Dihidro-1-kloretil-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion (**9**)……..…….52

3.7.12. 2,3-Dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tioetil]-1*H*-imidazol-2-tion (**11**)..52

3.7.13. 1,2-Bis(2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)etan (**12**)…..……53

3.7.14. Kinetika izomerizacije **6** u **7a** praćena ^{1}H NMR-om……53

3.7.15. Pokušaj detekcije tiiranijevog međuprodukta **8** u reakciji **6** sa srebrnim tetrafluoroboratom u toluen-d_8 ^{1}H NMR-om……..……54

3.7.16. Pokušaj detekcije tiiranijevog međuprodukta **8** u reakciji **6** s srebrnim tetrafluoroboratom u DMSO-d_6 ^{1}H NMR-om……..…...54

3.7.17. 2-[(2-Hidroksietil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**13**)……..……..55

3.7.18. 1-Metil-2-(viniltio)-1*H*-imidazol (**14**)……..……...55

3.7.19. Reakcija **6** s kalijevim cijanidom u DMSO-d_6……..……*55*

3.7.20. 1-Metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol (**4a**)……..……..56

3.7.21. 1-Metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol hidrojodid (**4b**)……...……57

3.7.22. 1,3-Dimetil-2-metiltio-1*H*-imidazolijev jodid (**18**)…..……...57

3.7.23. 1,3-Dimetilimidazol-2-tion (**17**)……..……58

3.7.24. 2,2'-Disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**)…..……58

3.7.25. 2,2'-Disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5b**)……..……..…59

3.7.26. Kristalizacija 2,2'-disulfandiilbis (1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**) iz drugih otapala…....59

3.7.27. pH Profil razgradnje **5a……..……..…59**

3.7.28. Oksidacija metimazola s vodikovim peroksidom…..……..60

3.7.29. *N*-Metilimidazolijum hidrogensulfat (**20**)……..……..61

3.8. Računalne studije……61

3.9. Probir polimorfa metimazola (1)……..……..……62

3.9.1. Kristalizacijske probe pri sobnoj temperaturi…….……62

3.9.2. Kristalizacijske probe pri povišenoj temperaturi…….……63

3.9.3. Kristalizacijske probe taloženjem i difuzijom kontraotapala……..63

3.10. Karakterizacija nepoznatih onečišćenja primjenom HPLC-MS-QTOF...……...65

3.11. Priprava farmaceutskih smjesa……...……..…66

3.12. Studija prisilne razgradnje metimazola (1)…...……..70

3.13. Stabilnost metimazola u otopini fotoinicijatora...……...71

4. REZULTATI I RASPRAVA…...……..72

4.1. Karakterizacija metimazola (1)……..……...72

4.1.1. Karakterizacija metimazola prema EU farmakopeji…….…...72

4.1.2. Topljivost metimazola i definiranje BCS klase……....73

4.1.3. Karakterizacija NMR metodama……75

4.1.4. Karakterizacija termalnim metodama……..76

4.1.5. Karakterizacija difrakcijskim metodama……77

4.2. Reaktivnost metimazola i njegovih srodnih tvari……...77

4.2.1. Reaktivnost metimazola u kloriranim otapalima…….77

Reakcija s diklormetanom (DCM)……..……..77

Reakcija s 1,2-dikloretanom (DCE)……..……80

4.2.2. Kemizam stvaranja 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana (**3a**)…….....83

*NMR studij transformacije **6** u 7-Metil-2H,3H,7H-imidazol[2,1-b]tiazol-4-ijum klorid (**7a**)……..……86*

*Pokušaj detekcije tiiranijevog međuprodukta **8** uz $AgBF_4$……88*

Razlučivanje sintetskog puta i studije izomerizacije……..……90

4.2.3. Računalna studija…….…92

*Transformacija **6** u **7a** preko tiiranijeva međuprodukta……..……..93*

*Reakcija **6** s **1** kao nukleofilom i dobivanje **3a**……..…….....95*

*Ravnoteža između **7a** i **9**……..…….....98*

4.2.4. Reakcije **6** s drugim nukleofilima……....98

4.2.5. Metilacijske studije metimazola (**1**)……...102

4.2.6. Oksidacijske studije **1**……....107

*Oksidacija **1** s jodom……..……..108*

*Oksidacija **1** s vodikovim peroksidom…….……..111*

4.3. Čvrste forme metimazola i njegovih srodnih tvari……...…114

4.3.1. Studij probira polimorfa metimazola (**1**)……..……....115

4.3.2. Čvrste forme srodnih tvari…….……....120

*1,1-Bis[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2b**) i njegova transformacija u čvrstom stanju……..……120*

*1,2-Bis[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tio]etana (**3**) i njegova transformacija u čvrstom stanju……..……..122*

*Čvrste forme 7-metil-2H,3H,7H-imidazol[2,1-b]tiazol-4-ijum klorida (**7a**) i tetrafluoroborata (**7b**)……130*

*Čvrsta forma Bis-{2-[(kloretil)tio]-1-metil-1H-imidazol}-srebro(I) tetrafluoroborata (**10**)……..132*

*Čvrsta forma 2,3-dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tioetil]-1H-imidazol-2-tiona (**11**)……..……..133*

*Čvrsta forma 1-metil(2-tiometil)-1H-imidazol hidrojodida (**4b**)……..……134*

*Čvrste forme 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1H-imidazola) (**5**)……136*

4.4. Stabilnost metimazola (1) u farmaceutskim formulacijama ……140

4.4.1. DSC studija kompatibilnosti metimazola u smjesama……140
4.4.2. Stabilitetna studija metimazola u smjesama……..142
4.4.3. Stabilitetna studija prototipa ciljne formulacije……143
4.4.4. Studija prisilne razgradnje……146
4.4.5. Stabilnost metimazola u otopini fotoinicijatora……147
4.4.6. Identifikacija detektiranih onečišćenja metimazol……147
5. ZAKLJUČAK……153
6. LITERATURNA VRELA……156
7. ŽIVOTOPIS……179
8. PRILOZI……179
8.1. Popis oznaka kratica i simbola……182
8.2. Osnovni kristalografski podaci za studirane strukture……184
8.3. Preslike publikacija ostvarenih u sklopu ove doktorske disertacije……186

SAŽETAK

SINTETSKE, STRUKTURNE I STABILITETNE STUDIJE U REDU TIREOSTATIKA METIMAZOLA

Leo Štefan
Jadran Galenski Laboratorij (JGL) d.d., Svilno 20, 51 000 Rijeka

U sklopu ove disertacije provedene su sintetske, strukturne i stabilitetne studije u redu tireostatika metimazola (**1**). Primjenom kemo- i regioselektivnih kemijskih transformacija pripremljene su nove, ali i neke poznate srodne supstancije metimazola, tj. njegova poznata ali i nepoznata potencijalna onečišćenja. Posebno je studirana stabilnost metimazola u kloriranim otapalima poput diklormetana i dikloretana, sveprisutnih u kemiji i farmaceutici. Dobiveni premošteni bis metilenski i etilenski derivati su izolirani i strukturno karakterizirani, a provedena je karakterizacija i transformacija njihovih čvrstih formi. U okviru toga poseban je naglasak stavljen na utvrđivanje kemizma stvaranja 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana (**3a**) koji uključuje pokušaj detekcije i izolacije možebitnog tiranijevog (episulfonijevog) međuprodukta (**8**). Temeljem provedenih sintetskih, spektroskopskih, termalnih, difrakcijskih i računalnih studija, uključujući i mjerenja kinetike, međuprodukt **8** nije pronađen već njegov izomer 7-metil-2*H,*3*H,*7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**), a prema našim saznanjima, to je prvi poznati stabilni izomer tiiranijevih iona. Ujedno je utvrđeno da **3a** nastaje direktno nukleofilnom supstitucijom primarno stvorenog međuprodukta klor etil derivata, 2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol, **6**) s metimazolom.
Također su pripravljeni i karakterizirani oksidacijski i metilacijski derivati **1** te u kontekstu poznatih onečišćenja metimazola B i C pripravljeni su i standardizirani njihovi uzorci.
U okviru predformulacijskih istraživanja provedena je studija stabilnosti **1** u čvrstom stanju, a u prisutnosti odabranih pomoćnih tvari. Pritom je utvrđena visoka stabilnost **1** u planiranim farmaceutskim formulacijama, ali su pronađeni i karakterizirani novi, dosad nepoznati, dimer i trimer metimazola, kao njegova potencijalna onečišćenja. Ujedno je i predložen kemizam njihova stvaranja.
Rezultati provedenog istraživanja upotpunjuju trenutne spoznaje o metimazolu (**1**) te daje iscrpan uvid u svojstva njegovih strukturnih analoga, kao potencijalnih onečišćenja **1**. To pridonosi povećanju kakvoće, sigurnosti i učinkovitosti metimazola kao djelatne tvari tako i njegovih finalnih doznih oblika.

(200 stranica, 96 slika, 24 sheme, 34 tablice, 255 literaturna citata, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: metimazol, srodne tvari metimazola, dikloretan, 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan, 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid, tiiranijev ion, čvrste forme, rentgenska strukturna analiza, predformulacijska istraživanja, stabilnost.

ABSTRACT

SYNTHETIC, STRUCTURAL AND STABILITY STUDIES IN THE SERIES OF THYREOSTATIC METHIMAZOLE

Leo Štefan
Jadran Galenski Laboratorij (JGL) d.d., Svilno 20, 51 000 Rijeka

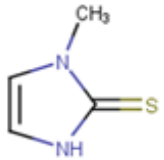
Within this dissertation, synthetic, structural and stability studies in the series thyrostatic methimazole (**1**) were performed. By applying chemo- and regioselective chemical transformations, new, but also some known related substances of methimazole were prepared, ie. its known but also unknown potential impurities. In particular, the stability of methimazole in chlorinated solvents such as dichloromethane and dichloroethane, ubiquitous in chemistry and pharmaceuticals, has been studied. The obtained bridged bis methylene and ethylene derivatives were isolated and structurally characterized, and the characterization and transformation of their solid forms was performed. In this context, special emphasis is placed on the chemistry of 1,2-bis [(1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl) thio] ethane (**3a**) formation which includes an attempt to detect and isolate a possible thiiranium (episulfonium) intermediate (**8**). Based on the conducted synthetic, spectroscopic, thermal, diffraction and computational studies, including kinetic measurements, intermediate **8** was not found but its isomer 7-methyl-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazole [2,1-*b*] thiazol-4-ium chloride (**7a**) is to our knowledge the first known stable isomer of thiiranium ions. It was also found that **3a** was formed directly by nucleophilic substitution of the primarily formed intermediate chlorine ethyl derivative, 2-[(chloroethyl) thio]-1-methyl-1*H*-imidazole, **6**) with methimazole.
Oxidation and methylation derivatives of **1** have also been prepared and characterized, and in the context of known methimazole impurities B and C, samples have been prepared and standardized.
As part of the preformulation studies, a solid state study of **1** was performed in the presence of selected excipients. High stability of **1** in the planned pharmaceutical formulations was determined, but also a new unknown, dimer and trimer of methimazole were found and characterized, as its potential impurities. At the same time, the chemistry of their formation was proposed.
The results of the study complements the current knowledge about methimazole (**1**) which provides a comprehensive insight into the properties of its structural analogues, as potential impurities. This contributes to increasing the quality, safety and efficacy of both methimazole and its final dosage forms.

(200 pages, 96 figures, 24 scheme, 34 tables, 255 references, original in Croatian)

Keywords: methimazole, methimazole related substances, dichloroethane, 1,2-bis [(1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)thio]ethane, 7-methyl-2*H*,3*H*, 7*H*-imidazole [2,1-*b*] thiazole -4-ium chloride, thiiranium ion, solid forms, X-ray structural analysis, preformulation studies, stability.

1. UVOD

Tireostatik metimazol (1-metil, 2,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-tion, **1**) već je osamdeset godina prisutan u liječenju bolesti štitnjače u humanoj i veterinarskoj medicini.[1] Unatoč toga, prema istraživanjima Američke agencije za lijekove i medicinske proizvode raste mu broj propisanih recepata u odnosu na tržišne konkurente, prvenstveno zbog manje izražene hepatotoksičnosti, bolje efikasnosti te manjeg broja zabilježenih nuspojava.[2] Novija medicinska istraživanja proširuju njegovu primjenu na neka druga terapeutska područja, a nalazi primjenu i u tehnici.



1

Iako je tijekom vremena opsežno studiran, neki podaci su zastarjeli, neki nedostaju, kako zbog novih analitičkih tehnika te novih usmjerenja u farmaceutici (npr. Kvaliteta dizajnom s naglaskom na detaljno poznavanje onečišćenja, te studije čvrstog stanja), jer istraživanja nisu ili su ograničeno provedena, a neki rezultati, zbog poslovnih interesa, nisu objavljeni.

U tom kontekstu, ukazala se potreba unijeti više svjetla u kemiju metimazola i njegovih srodnih tvari, ali isto tako i na poznavanje i karakterizaciju njihovih čvrstih formi, koje mogu utjecati na njegovu, ali i stabilnost njegovih formulacija.

U tom kontekstu prikladnom kemo- i regio-selektivnom sintetskom metodologijom pripravljene su neke poznate i neke potencijalne srodne tvari metimazola te karakterizirane i kvantificirane naprednim analitičkim metodama te je ispitana njihova stabilnost kinetika, termodinamika, kao i kemizam njihova stvaranja i razgradnje.

Studiran je i polimorfizam metimazola te transformacije čvrstih formi nekih, od studiranih derivata. Na kraju, cilj ove disertacije je stvaranje zbirke podataka i uzoraka studiranih spojeva, kao podloge za sustavan pristup osiguranju kvalitete metimazola i njegovih farmaceutskih oblika.

Cjelokupni rad sažet je u četiri dijela. Nakon uvoda, u drugom dijelu dan je literaturni pregled o štitnjači, terapiji njenih bolesti te metimazolu i njegovu tireostatskom djelovanju. U trećem dijelu nalazi se detaljan opis provedenih eksperimenata, a u četvrtom, pregled vlastitih istraživanja s diskusijom rezultata. Rezultati ovih istraživanja dijelom su, zbog aktualnosti,

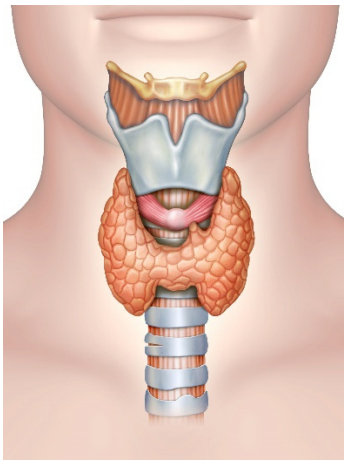
referirani ili prihvaćeni za objavu na pet na znanstvenih skupova u zemlji i inozemstvu, te manjim dijelom objavljeni[3] ili u postupku objavljivanja.[4]

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Štitnjača, njezine bolesti i terapija

2.1.1. Anatomija i funkcija štitnjače

Štitna žlijezda ili štitnjača je mala endokrina žlijezda koja je anatomski smještena na prednjoj strani vrata uz grkljan i dušnik koje obuhvaća poput potkove. Sastoji se od desnog i lijevog režnja. Zbog jače razvijenih pobočnih dijelova i tankoga središnjeg dijela, štitna žlijezda ima oblik slova H (Slika 1).[5]



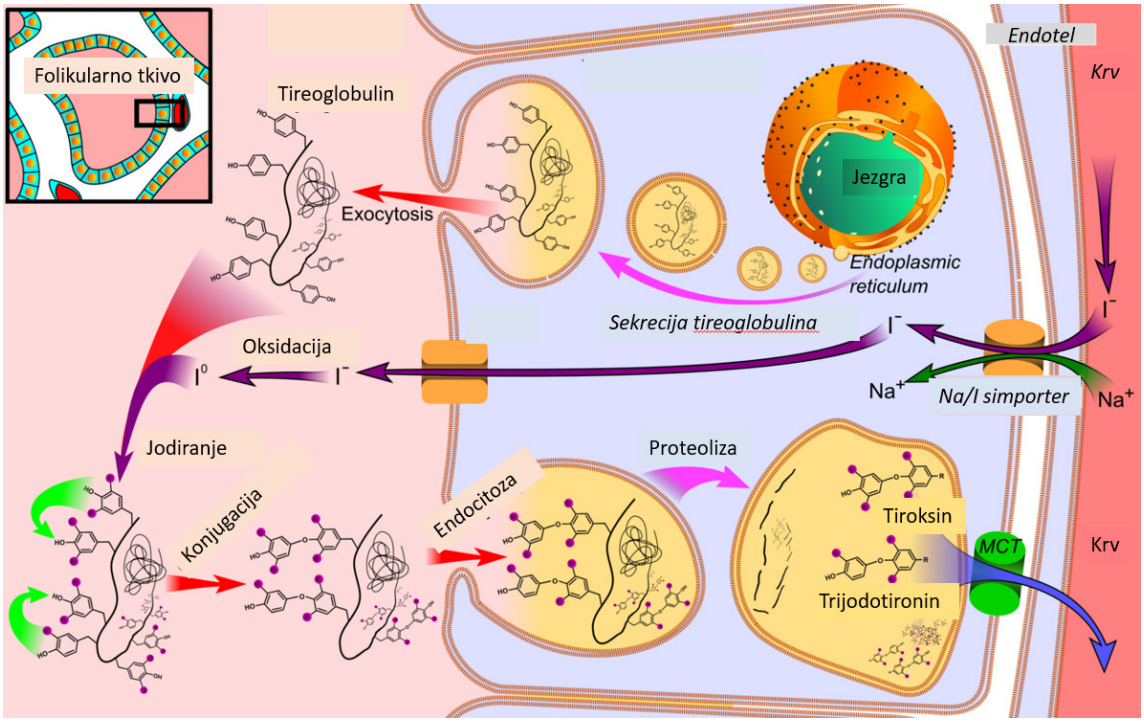
Slika 1. Anatomska pozicija štitnjače (preuzeto s: https://teachmeanatomy.info/neck/viscera/thyroid-gland/ - datum pretrage 16.07.2021.).

Glavni hormoni štitne žlijezde su tiroksin (T4) i trijodtironin (T3), koji reguliraju intenzitet metabolizma u tijelu, a zbog toga se štitnjača smatra „kontrolorom metabolizma“. Pri manjku tih hormona bazalni se metabolizam smanjuje za 40%, a pri prekomjernu izlučivanju može se povećati čak dvostruko iznad normalnih vrijednosti. Osim regulacije metabolizma, hormoni štitnjače također imaju važnu funkciju u regulaciji ekspresije gena. Uz navedena dva hormona, štitnjača izlučuje i kalcitonin, hormon koji sudjeluje u regulaciji koncentracije kalcijevih iona u tjelesnim tekućinama. Za sintezu hormona štitnjače potreban je jod. Jod uglavnom dobivamo iz hrane u obliku jodida. Količina joda (oko 50 mg godišnje) koja je potrebna za normalno funkcioniranje organizma osigurava se jodiranjem kuhinjske soli. Radom štitne žlijezde upravljaju hipofiza i hipotalamus mehanizmom povratne sprege. Primjerice, izlučuje li štitna žlijezda previše hormona smanjit će oslobađanje TSH (tireostimulirajućih hormona hipofize) i TRH (tireoliberina kojeg izlučuje hipotalamus) koji doprinose stabilizaciji rada štitnjače. S

druge strane niska razina hormona poticaj je hipofizi i hipotalamusu da luče veće količine TSH i TRH.[6]

2.1.2. Biosinteza hormona štitnjače

Biosinteza hormona štitnjače započinje transportom jodidnog iona u folikularno tkivo preko jod/natrij trans membranskog glikoproteinskog nosača, a koliko je jod važan u radu štitnjače govori i podatak da je koncentracija jodida u štitnjači za 20-40% veća nego u plazmi.[7] Prvi stupanj u proizvodnji tireoidnih hormona uključuje oksidaciju enzima tireoidne peroksidaze s endogeno stvorenim vodikovim peroksidom. Tireoidna peroksidaza je glikoprotein sa strukturom hema.



Slika 2. Biosinteza tiroidnih hormona iz tiroglobulina (prilagođeno prema https://bs.wikipedia.org/wiki/Tireoidni_hormoni#/media/Datoteka:Thyroid_hormone_synthesis.png, datum pretrage 10.08.2021).

Tako oksidirani enzim reagira s jodom pri čemu se formira „jodirani međuprodukt“ čija struktura nije u potpunosti istražena. Sljedeći stupanj je interakcija jodiranog međuprodukta s tirozinskim ostacima u tiroglobulinu pri čemu dolazi do formiranja monojodotirozina i dijodotirozina. Daljnjom intarmolekulskom reakcijom kondenzacije između monojodotirozina

i dijoodtirozina nastaje T3 (3,3,5-trijodotironin), a kondenzacijom dviju molekule dijodotirozina stvara se T4 (Slika 2).[8]

2.1.3. Bolesti štitnjače

Guša je stanje u kojem je štitnjača povećana, no njezina je funkcija održana. Obično ne uzrokuje tegobe, no zbog svoje veličine može uzrokovati kašalj, promuklost, otežano disanje ili kašalj.[9]

Hipotireoza je stanje u kojem je smanjena funkcija štitnjače, tj. smanjeno je lučenje hormona pri čemu dolazi do usporavanja metabolizma. U 90% slučajeva uzrokovana je autoimunom upalom štitnjače, a ostali uzorci su: operacije štitnjače, stanje nakon terapije radioaktivnim jodom, zračenje područje vrata zbog drugih tumora, lijekovi itd.

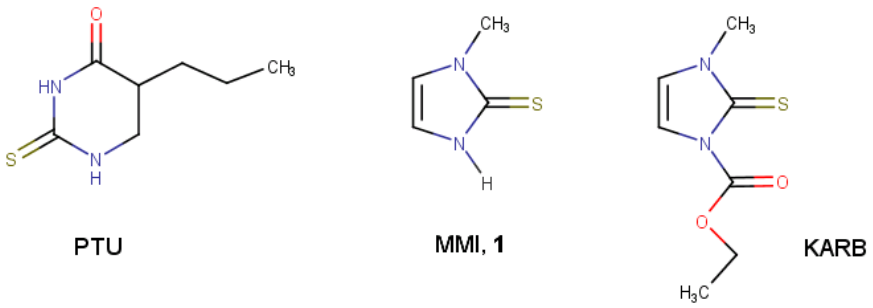
Tumori štitnjače su novotvorine smještene unutar štitne žlijezde, koje mogu dovesti do otežanog disanja ili gutanja a najčešće se otkrivaju slučajno. Zbog svoje dobre prokrvljenosti u njoj se često otkivaju metastaze primarnih tumora. Mogu biti uzorkovani različitim utjecajima no najznačajniji je djelovanje ionizirajućeg zračenja. Razlikujemo adenome kao dobroćudne i karcinome kao zloćudne tumore.

Hipertireodizam nazvan još i tireotoksikoza je patološki poremećaj u kojem štitnjača luči prekomjernu količinu tireoidnih hormona trijodtreonina (T3) ili tiroksina (T4) ili oboje, dok su istovremeno u serumu uočavaju niske koncentracije tiroid stimulirajućeg hormona. Najčešći uzrok hipertireoze je autoimuna bolest štitnjače (Basedowljeva ili Gravesova bolest),[10] a ostali uzroci mogu biti: subakutni tireoditis (prva faza), lijekovi, metastaze folikularnog karcinoma štitnjače, koriokarcinom ili tumor hipofize koji luči TSH. Među pacijentima s hipertireozom, 60% do 80% ima Gravesovu bolest. Studija u Velikoj Britaniji pokazala je incidenciju hipertireoze od 25 do 30 slučajeva na uzorku od 10 000 žena.[9] Hipertireoza je izlječiva bolest, može recidivirati u više različitih slučajeva, a u 5-20% bolesnika nakon izliječene hipertireoze pojavljuje se hipotireoza. Hipertireoza se javlja u svim životnim dobima, a najviše u žena od dvadesete do pedesete godine života dok je kod muškaraca 4-10 puta rjeđa.

2.1.4. Liječenje hipertireodizma

Prije 1940. godine operativni zahvat bio je jedini način liječenja hipertireoze. Godine 1942. Astwood započinje s prvim istraživanjima na primjeni tvari poput sulfoguanidina i propiltiouree

na sveučilištu Harvard, a uz to što je potvrđen pozitivan utjecaj na štitnjaču došlo je i do poboljšanje zdravstvenog stanja pacijenata. U provedenoj studiji ispitano je preko 100 strukturnih analoga tiouree, a najdjelotvorniji se pokazalo 2-propiluracil.[11] Godine 1947. ispitano je dodatnih 300 tvari, a iz te studije proizašao je 6-propil-2-tiouracil (PTU) koji je iste godine odobren od strane Američke agencije za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA).[12] Metimazol (1-metil-2,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-tion, **1**) dolazi prvi puta na tržište 1949. godine s manje izraženijom toksičnosti od PTU.[13] Četiri godine kasnije na tržište dolazi karbimazol (1-etoksikarbonil-3-metil-1,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-tion) prolijek metimazola za koji se smatralo da ima manje izraženu toksičnost u odnosu na dva na tržištu prisutna tireostatika.[14] Danas se prekomjerna sinteza tireoidnih hormona T3 i T4 u hipertireodizmu može kontrolirati a) primjenom specifičnih inhibitora (tireostatika) koji ili blokiraju biosintezu hormona ili smanjuju konverziju T4 u T3, b) terapijom radioaktivnim jodom ili c) operativnim zahvatom (tiroidektomija). Upotreba navedenih tireostatika najzastupljenija u Sjedinjenim Američkim državama, Europi i Aziji (Slika 3).[15,8]



Slika 3. Strukture na tržištu prisutnih tireostatike, PTU (6-propil-2-tiouracil), MMI (1-metil-2,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-tion, **1**), KARB (1-etoksikarbonil-3-metil-1,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-tion).

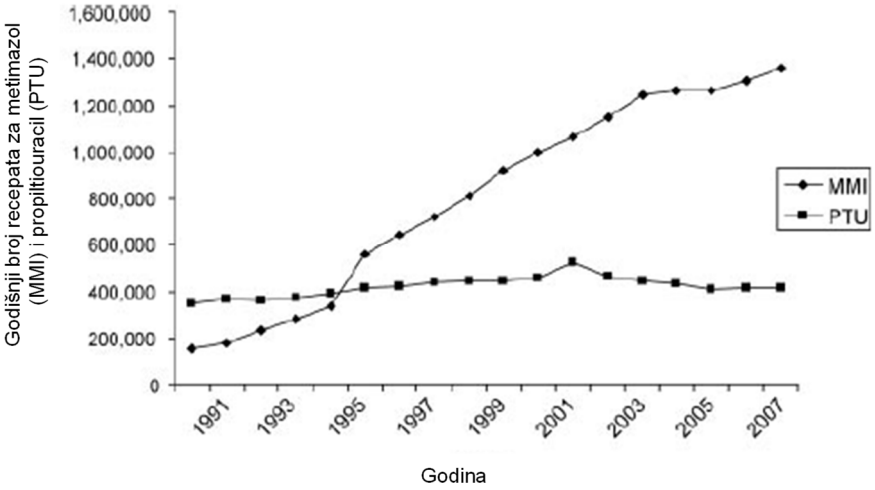
Antitireoidni lijekovi primjenjuju se 8 tjedana prije terapije radioaktivnim jodom.[10] Kod primjene ove skupine lijekova često se javljaju nuspojave poput leukopenije, a u rjeđim slučajevima agranulocitoza dok su česti čirevi u području usta I povišena temperature.[9] Terapija radioaktivnim jodom najčešće se u primjenjuje u Sjevernoj Americi i to kod pacijenata iznad 50 godine života. Njegova primjena je kontraindicirana kod žena u trudnoći i dojilja. Glavna nuspojava kod terapije radioaktivnim jodom je hipotireoza.[10]

Operativni zahvat na štitnjači provodi se kod izraženije guše i kod slučajeva gdje postoje čvorići nepoznate prirode. Osam tjedana prije operativnog zahvata pripisuju se antitireoidni lijekovi.

Najčešća post operativna komplikacija tireokotmije je hipotireoza, a njezin intenzitet ovisi o postotku uklonjenog tkiva štitnjače.[10]

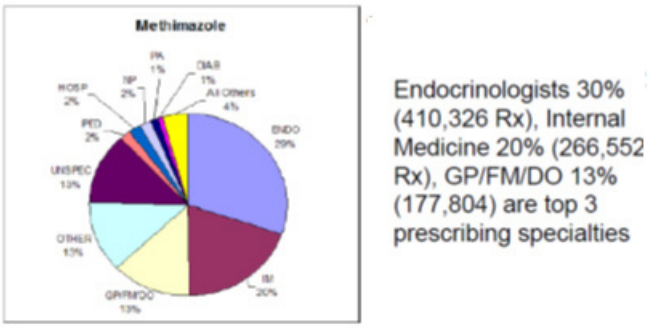
2.1.5. Tržište tireostatika

Navedeni tireostatici su još i danas na tržištu i predstavljaju osnovu za liječenje bolesti štitnjače. U svijetu današnjice zbog ubrzanog načina života i posljedično svekolikog stresa dolazi do povećanog broja zabilježenih slučajeva bolesnih stanja štitnjače. U prilog tome govori i značajno povećanje propisanih recepata u zadnja tri desetljeća u Sjedinjenim Američkim državama što metimazol čini najčešće prepisanim antitireoidnim lijekom (Slika 4).[16]



Slika 4. Ukupni broj recepata za MMI i PTU u ljekarnama SAD za period 1991. – 2008. (Prema: Surveillance Data, Vector One: National Database, extracted March 2009[16]).

Ovome u prilog govori i analiza stučnjaka Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), koja donosi detaljnu pregled potrošnje metimazola i propiltiouracila za period 2002. - 2008. U tom je periodu broj propisanih recepata metimazola porastao za 28 %, a u 2008. metimazol zauzima tri četvrtine tržišta. Pritom, oko 30 % propisanih recepata u 2008. daju endokrinolozi, 20 % internisti, a preostalih 50 % svi ostali (Slika 5).[17]



Slika 5. Deset najvećih propisivača recepata za metimazol u SAD tijekom 2008.[17]

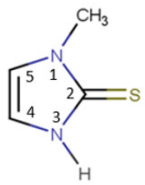
Karbimazol se koristi kao tireostatik u Europi i Japanu.

Broj oboljelih od Gravesove bolesti koja predstavlja hipertireozu razvijenu kao posljedica autoimunog poremećaja na tržištu Sjeverne Amerike, Europe, Bliskog istoka i Afrike na temelju epidemioloških podataka u 2018. godini procjenjuje se na 385 500 oboljelih u populaciji uz visoku incidenciju od 1,2%. Novi podaci iz 2021. godine proizašli iz marketinških analiza procjenjuju tržište antireoidnih lijekova na 2,46 milijardi dolara, dok se na razini tržišta Sjedinjenih Američkih država, Europe, Bliskog istoka i Afrike u 2022. godini očekuje porast na 2,79 milijardi dolara.[18]

Postoji malo dostupnih podatka koji analiziraju učestalost hipertireodizma u različitim rasama, no ipak rezultati upućuju da je veća prevalencija zastupljena u bijeloj u odnosu na druge rase.[19] Incidencija hipertireodizma raste s godinama, a više je izraženiji u žena. Važno je istaknuti da bolesti štitnjače smanjuju kvalitetu života, a svaki poremećaj štitnjače ne bi trebalo zanemariti, već liječiti kako bi se spriječile daljnje komplikacije.

2.2. Metimazol

Methimazol (**1**) se prema IUPAC nomenklaturi imenuje kao 1-metil-1,3-dihidro-2*H*-imidazol-2-tion (CAS: 60-56-0). U literaturi se može naći i kao: 1-methyl-1*H*-imidazol-2-thiol; 1-methyl-1*H*-imidazole-2(3*H*)-thione; 1-methyl-1*H*-imidazole-2-thiol; 1-methyl-1*H*-imidazole-2-thiol; 1-methyl-2-mercapto-1*H*-imidazole i 1-methyl-4-imidazoline-2-thione, pod dva generička metimazol i tapazol te pod skraćenicama MI, MMI, MET i TMZ.



1

Može se pronaći u raznim bazama podataka, a brojevi i poveznice su:

CAS: 60-56-0

ATC klasa: H03BB02

UNII: 554Z48XN5E

PubChem: CID 1349907

ChemSpider: 1131173

Beilstein Registry Number: 108646

ChEBI: 50673

Drug Product Database: 2258935

ChemIDplus Advanced: http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/

RxList: http://www.rxlist.com/cgi/generic3/methim.htm

Drugs.com: http://www.drugs.com/cdi/methimazole.html

Wikipedia: http://en.wikipedia.org/wiki/Methimazole

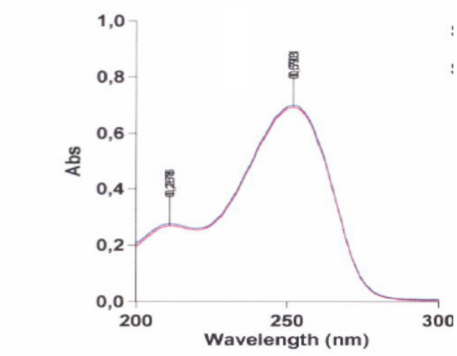
2.2.1 Opis

Metimazol, bruto formule $C_4H_6N_2S$ (114.17) i elementarnog sastava C 42,08%, H 5,30 %, N 24.54% i S 28,09% pojavljuje se kao bijeli ili svijetlo smeđi kristalni prašak, tališta 144 – 147 °C, vrlo topljiv u vodi (200 g/L) i metilen-kloridu, lako ili umjereno topljiv u 96%-tnom etanolu, topljiv u kloroformu i metanolu, a slabo topljiv u benzenu, ligroinu, etil-acetatu i dietil-eteru.

Dipolni momenti metimazola, određeni u benzenu i 1,4-dioksanu iznose 4,74 D i 5,53 D.[1]

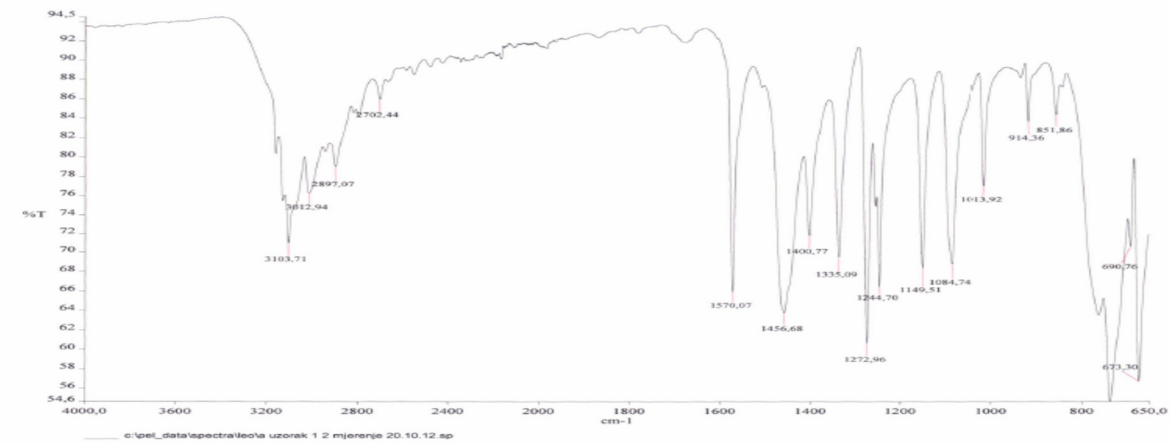
2.2.2 Spektroskopska svojstva

Ultraljubičasti spektar metimazola u razrijeđenoj sumpornoj kiselini (Slika 6) ima dva apsorpcijska maksimuma pri 211 i 251 nm, a odnos apsorbancije mjerene kod 251 nm prema onoj mjerenoj pri 211 nm treba biti 2,5 – 2,7.



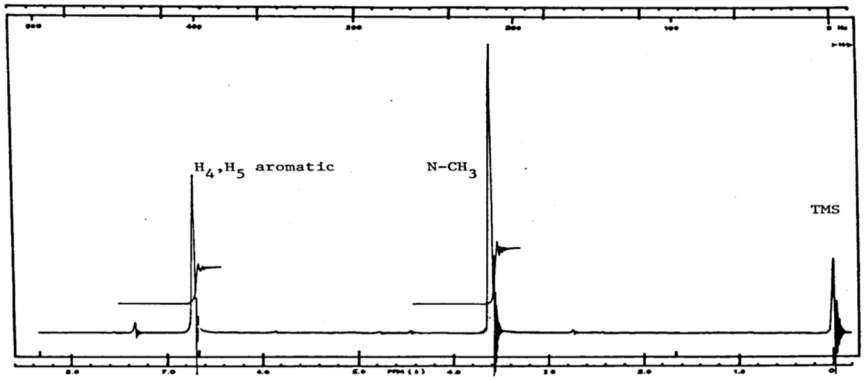
Slika 6. UV spektar metimazola u 0,1 N H_2SO_4.

Strukturne karakteristike metimazola korelirane su sa sljedećim vrpcama: C=N, N-H, C-H i C=S pri 1570, 3103, 1450 i 730-750 cm^{-1} (Slika 7).



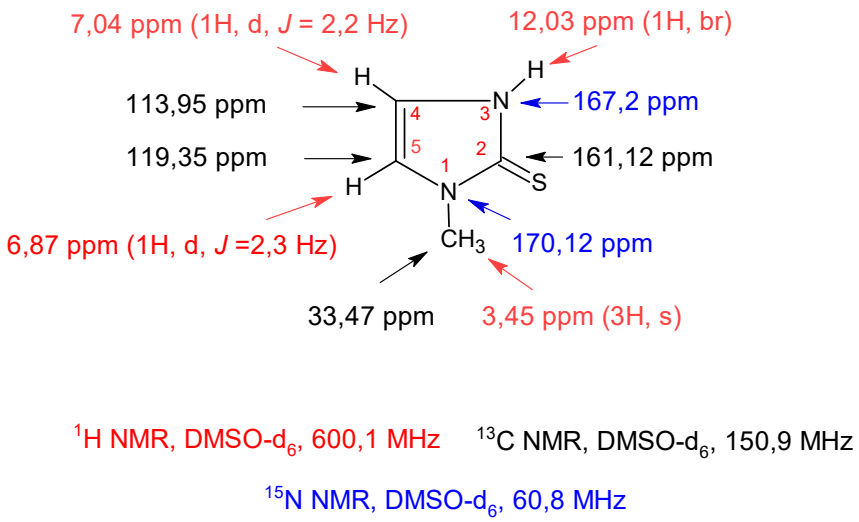
Slika 7. FT- IR Spektar metimazola.

^{1}H NMR spektar metimazola snimljen pri 60 MHz u $CDCl_3$ objavljen je još 1979. u preglednom radu autora H. Y. Aboul-Eneina i A. A. Al-Badra (Slika 8)[1] na kojem se vide samo singlet za tri protona pri 3,63 ppm pripisan *N*-metilnoj skupini, te singlet za dva protona pri 6,70 ppm pripisan protonima na C4 i C5 atomima imidazolskog prstena.



Slika 8. ^{1}H-NMR spektar metimazola u $CDCl_3$ (60 MHz).[1]

Prema navodima literature ^{1}H-NMR spektar metimazola visoke rezolucije snimljen u DMSO-d_6 pri 600,1 MHz pokazuje karakterističan singlet za tri protona *N*-metilne skupine pri 3,45 ppm (a), dublete za protone na C 5 atomu pri 6,87 ppm (J = 2,34 Hz) (b), odnosno na C 4 atomu pri 7,04 ppm (J = 2,23 Hz) (c) imidazolskog prstena te razvučeni singlet tioamidnog NH protona pri 12,03 ppm (d) (Slika 9).[20]

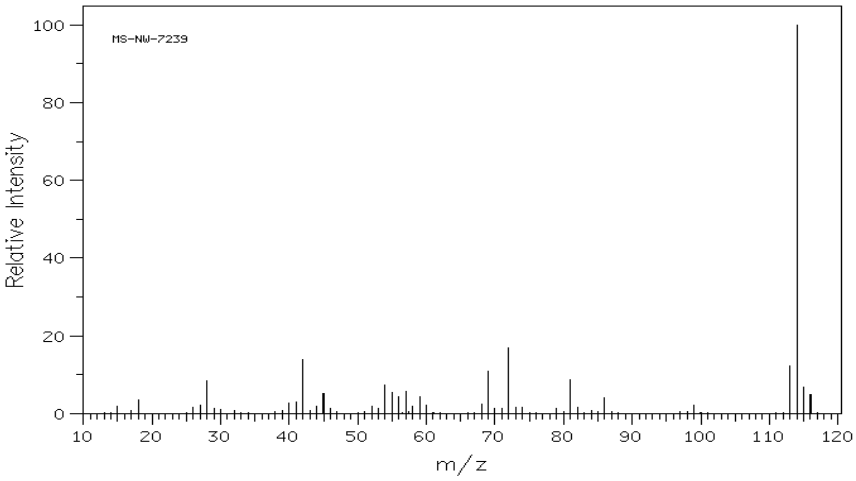


Slika 9. NMR podaci za metimazol (prilagođeno prema [20]).

Prema navodima literature ^{13}C-NMR spektar metimazola visoke rezolucije snimljen u DMSO-d_6 pri 150,1 MHz pokazuje karakteristične signale za *N*-metilnu skupinu pri 33,47 ppm (a), C 4 atom pri 113,95 ppm , C 5 atom pri 119,35 ppm te za C2 atom pri 161,12 ppm (Slika 9).[20]

U ^{15}N NMR spektru metimazola snimljenom u DMSO-d_6 pri 60 MHz oba dušikova atoma imaju isti signal pri 167,08 ppm, dok se u ^{1}H-^{15}N (HMBC) spektru snimljenom u DMSO-d_6 pri 600 MHz signali dušikovih atoma razlikuju te N-CH_3 pokazuje signal pri 170,12 ppm, a N3 pri 167,2 ppm (Slika 9).[20]

Spektar masa metimazola dobiven elektronskom ionizacijom pokazuje molekulski ion pri m/z 114 (Slika 10).[21]

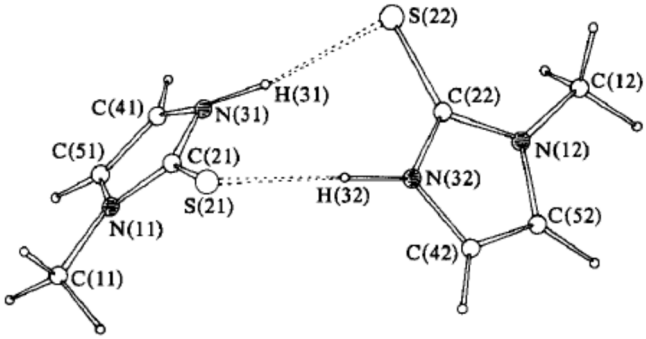


Slika 10. Maseni spektar metimazola.[21]

2.2.3 Čvrste forme metimazola

Metimazol (**1**), kao farmaceutska krutina, uglavnom kristalizira u formi bezbojnih do blijedo jantarno žutih kristala. Do nedavno, dvije su istraživačke grupe provodile kristalografske studije i utvrdile da se radi o kristalima $P\bar{1}$ prostorne grupe triklinskog kristalnog sustava.[22,23]

U radu Rapera i suradnika[22] na uzorku **1** kristaliziranog iz apsolutnog etanola određena je jedinična ćelija kristala te je nađeno da je građena od 4 molekule **1**, a asimetrična jedinica sadrži dvije planarne neovisne molekule **1** (Slika 11), koje su međusobno povezane vodikovim vezama preko atoma sumpora i vodikovog atoma imidne skupine.



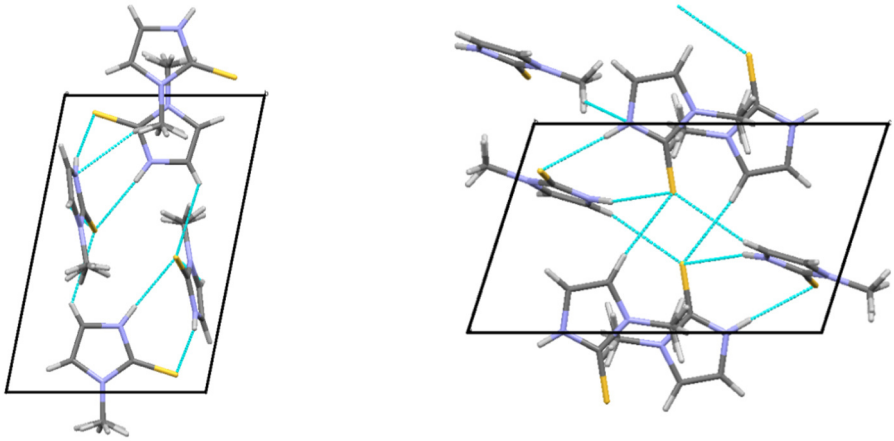
Slika 11. Prikaz vezivanja dviju neovisnih molekula **1** vezanih vodikovom vezom u triklinskoj strukturi.[22]

Udaljenosti između atoma N(3)···S(2) iznosi 3,315Å i 3,363Å i karakteristična je za tionske molekule.[24] U prilog postojanju tionskog tautomera **1** ide udaljenost između C(2)···S(2) koja iznosi 1,684(2)Å i 1,686(2)Å te prisustvo atoma vodika na N(3). Promatrajući kutove između veza, one su karakteristične za imidazol-2-tione, no valja napomenuti da upravo tionska veza

utječe na značajne promjene u kutovima susjednih atoma N(1)-C(2)-N(3) imidazolnog prstena.[22]

U obje molekule postoji isti tip statističkog poremećaja, uzrokovanog s dvije alternativne orijentacije metilnih skupina, koje se razlikuju za rotaciju oko N-C veze za oko 60°. Ravnine molekula tvore diedralni kut od 76.7°.[23]

Pakiranje molekula **1** u jediničnu kristalnu ćeliju triklinskog polimorfa prikazano je na Slici 12.

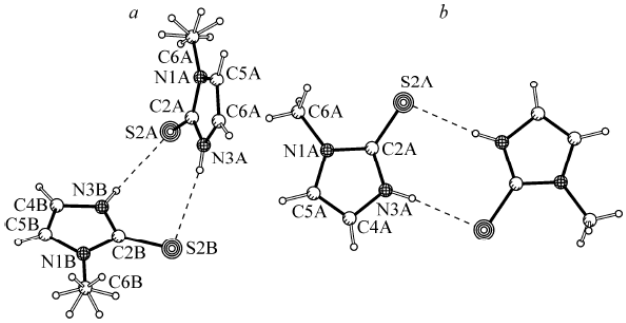


Slika 12. Prikaz pakiranja molekula **1** u triklinsku jediničnu kristalnu ćeliju.[25]

Važno je istaknuti da su jednaki podaci o triklinskoj kristalnoj strukturi objavljeni u radu Vampe i suradnika,[23] iako je uočena razlika u boji dobivenih kristala, tj. **1** dobiven kristalizacijom iz acetona i petroletera bio je bezbojan u odnosu na prije objavljeni rad gdje je **1** nađen u blijedo jantarnoj boji.[22]

U 2013. godini otkriven je novi, polimorf **1**, koji kristalizira u prostornoj grupi $P2_1/c$ monoklinskog kristalnog sustava. Polimorf je uočen kao onečišćenje tijekom oksidacije **1** u prisustvu kamfora, intenzivne je žute boje, a sačinjavaju ga 12 molekula **1** unutar jedinične ćelije, od čega su tri neovisne, što je zanimljivi primjer polimorfije gdje je razlika između kristalnih formi u broju neovisnih molekula. Poznato je da polimorf s većim brojem molekula neovisnih molekula nestabilniji, manje gustoće I često je produkt brzog rasta kristala ali i jačih vodikovih veza.[26] S tim u svezi nova se forma sukladno predviđanjima odlikuje većom gustoćom i jačim vodikovim vezama.

Dodatno utvrđene razlike između dva polimofa su u orijentacijama molekula dimera, kod monoklinskog dimeri su orijentirani planarno, dok su kod triklinskog polimorfa postavljene okomito (diedralni kut 76°), (Slika 13) a isto je u skladu s predviđanjima.[27]



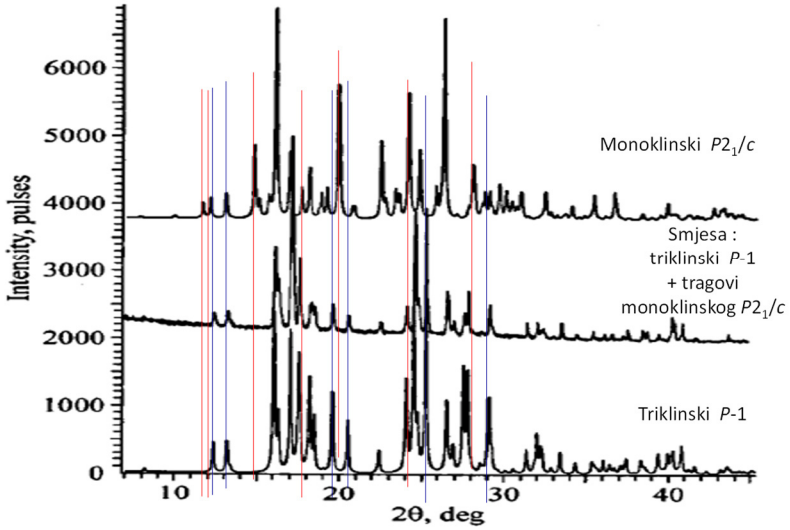
Slika 13. Dimeri molekula A i B u: a) triklinskom i b) monoklinskom polimorfu.[28]

U kontekstu istraživanja monoklinske modifikacije provedene su i daljnje kristalizacijske studije iz acetona i smjese diklormetan-dietileter no autori nisu bili uspješni u dobivanju čiste forme, već je utvrđeno da dominantno kristalizira triklinski polimof, a ova forma dolazi kao minorno polimorfno onečišćenje.[28] Pregled kristalografskih podataka za triklinsku i monoklinsku formi dan je u Tablici 1.

Tablica 1. Osnovni kristalografski podaci za triklinski i monoklinski polimorf metimazola snimljeni pri različitim temperaturama.[28]

Parametar	**Triklinski polimorf**		**Monoklinski polimorf**	
Boja	Bezbojna do jantarno žuta		Žuta	
Habitus	Pločice		Pločice	
M / (g/mol)	114,17		114,17	
Temperatura mjerenja / K	293	150	293	150
Kristalni sustav	Triklinski		Monoklinski	
Prostorna skupina	$P\text{-}\bar{1}$		$P21/c$	
Z	4		12	
Z´	2		3	
***a* / Å**	7,054(3)	6,929(4)	6,608(5)	6,566(3)
***b* / Å**	7,327(3)	7,361(4)	14,620(5)	14,542(6)
***c* / Å**	11,568(5)	11,355(6)	17,896(5)	17,741(7)
***α* / °**	99,678(4)	80,917(5)	-	-
***β* / °**	106,885(4)	73,122(5)	96,661(5)	96,463(5)
***γ* /°**	93,200(4)	86,673(5)	-	-
***V* / Å^3**	560,5(4)	547,2(5)	1717,2(15)	1683,4(12)
F(000)	240		720	
***d* / (g/cm^3)**	1,353	1,386	1,325	1,351
Broj refkeksija s $I > 2\sigma(I)$	1818	2408	2225	3324
R	0,0428	0,0270	0,0487	0,0330
***wR*$_2$**	0,1073	0,0721	0,1233	0,0892
CCDC	885733	885732	885731	885730

Usporedba difraktograma praha triklinskog ($P\bar{1}$) i monoklinskog ($P2_1/c$) polimorfa metimazola, pokazuje bitne razlike među njima (označene crvenim i plavim vertikalnim linijama) (Slika 14).[28]

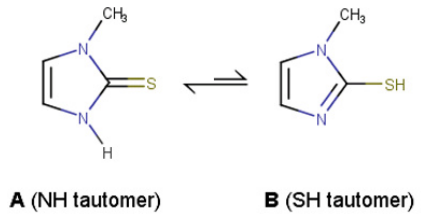


Slika 14. Difraktogrami praha triklinskog ($P\bar{1}$) i monoklinskog ($P2_1/c$) polimorfa metimazola prilagođeno prema [28]).

2.2.4 Kemijska svojstva

Kemija imidazol-2-tiona započinje sintezom Mackwarlda[29] pred više od 100 godina. Od tada zabilježen je neprestani rast kemije imidazol-2-tiona poglavito uzimajući u obzir važnost primjene ove klase spojeva u medicini i industriji. Zbog svoje građe imidazol-2-tioni predstavljaju zanimljive spojeve u smislu proučavanja keto-enolne tautomerije, intermolekulskih veza, kiselo baznih i spektralnih svojstava. S aspekta reaktivnosti sudjeluju u reakcijama nukleofilnih supstitucija i adicija, a oksidacijom se mogu dobiti spojevi s različitim oksidacijskim stanjima sumpora što ima daje važnost u praktičnoj upotrebi. Dodatno, prisustvo hetero atoma dušika i sumpora osigurava ovim spojevima koordinacijska svojstva.[30]

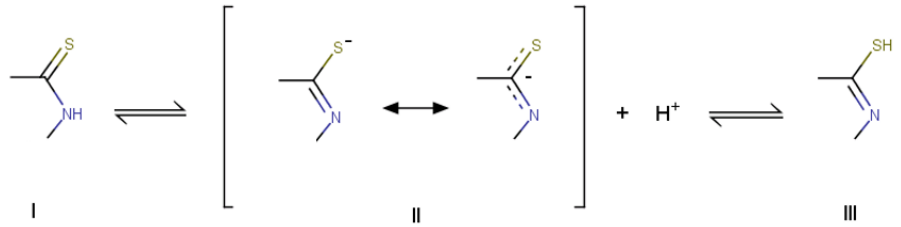
Imidazolni-2-tioni čiji je predstavnik metimazol (1-metil-2,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-tion, **1**) poznat i pod imenom tiamazol može postojati u dvije tautomerne forme, kao NH (**A**) i SH tautomer (**B**) (Shema 1). Protrotropni tautomerizam nastaje migracijom vodikovog atoma s imidazolnog dušika na egzociklički sumporov atom.[31]



Shema 1. Prikaz tautomernih struktura metimazola (**1**).

Tautomerija je studirana različitim metodama uključujući kvantno-kemijske,[32,33] i NMR[54] tehnike, a utvrđeno je da je NH-tautomer (**A**) pokazuje signifikantno veću stabilnost, što je vidljivo i iz kristalografskih podataka. Ipak, ovisno o supstratu i uvjetima, obje forme mogu sudjelovati u reakcijama.[35]

Nastavno na tautomeriju metimazol kao i svi spojevi u njegovom redu koji posjeduju tioamidnu skupinu (I, Shema 2) eliminacijom protona tvore ambidentni anion koji je prikazan rezonantnom strukturom (II, Shema 2) gdje je negativni naboj distribuiran preko tri atoma (III, Shema 2). Elektrofilni reagensi poput H^+ iona reagiraju sa sumporovim nukleofilnim atomom pri čemu tvore tiol (III, Shema 2). U reakciji sa polarnijim elektrofilima dolazi do stvaranja nove veze s dušikovim atomom.[36]

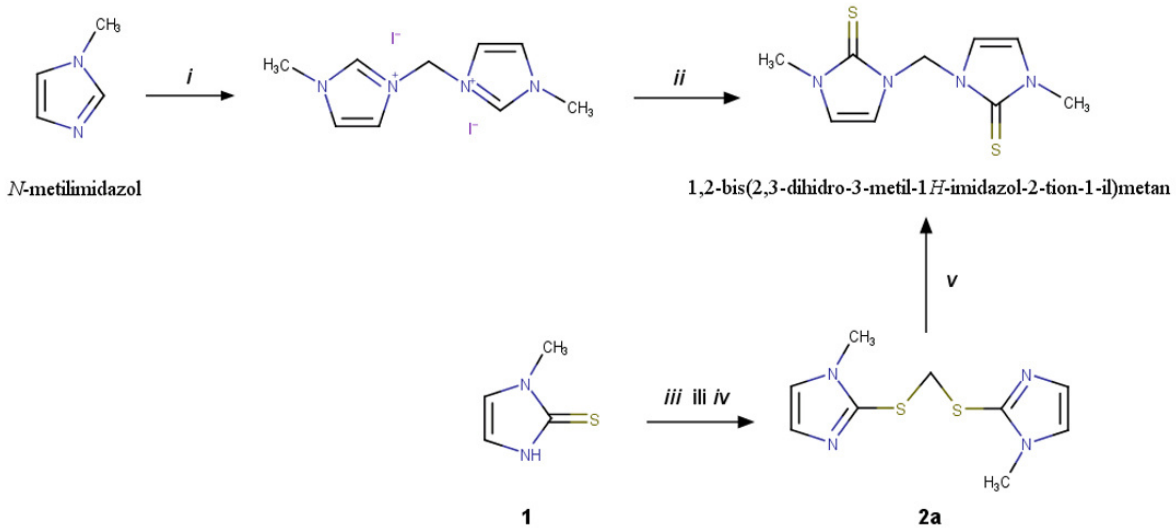


Shema 2. Prikaz ambifukcionalnih struktura metimazola i reakcije sa elektrofilima.[36]

U kontekstu elektrofilnih svojstava ambidentnog aniona, alkilacija i arilacija imidazol-2-tiona provodi se djelovanjem alkil- ili aril-halogenida, epoksida ili akohola. Alkilacija se provodi u alkoholnom, vodeno-alkoholnom ili pak vodenom mediju uz prisustvo alkalijskih hidroksida ili karbonata. Nukleofilni sumporov atom se prvi alkilira pri čemu se formiraju 2-(alkiltio)imidazoli (Shema 3). Daljnje sukcesivne reakcije alkilacije dovode do formiranja dialkil-substituiranih derivata ili čak tercijalnih soli.[37]

Shema 3. Prikaz alkilacijskih reakcija metimazola (prilagođeno prema [37]).

U kontekstu alkilacijskih reakcija imidazol-2-tiona, a poglavito **1** u literaturi je proučavana i reaktivnost u prisustvu sveprisutnog organskog otapala, diklormetana.



Shema 3. Alkilacije imidazolskih derivata dijodmetanom i diklormetanom; *i*) CH_2I_2, EtOAc, refluks; *ii*) K_2CO_3, S_8, MeOH, refluks; *iii*) CH_2Cl_2, refluks, 1 tjedan; *iv*) K_2CO_3, KOH, H_2O, CH_2Cl_2, $(NBu_4)Br$, 1 tjedan; *v*) 180°C, 14 sati.[38]

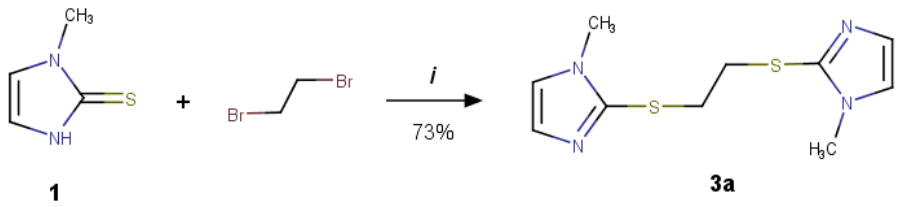
Reakcijom *N*-metilimidazola s dijodmetanom u etilacetatu dolazi do stvaranja bisimidazoilmetana u formi dijodidne soli, koja potom reakcijom s elementarnim sumporom u baznom mediju daje 1,1-bis(2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)metan. Isti spoj je dobiven i termičkom izomerizacijom 1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metana (**2a**), a potonji direktnim alkiliranjem metimazola u vrijućem diklormetanu: a) tijekom tjedan dana ili pak u b) dvofarnom sustavu uz transfer katalizu (Shema 3).

Za oba dimerna spoja su proučena njihova elektrokemijska i koordinacijska svojstva, a za 1,1-bis(2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)metan je utvrđeno da ima katalitička svojstva te je korišten u polimerizacijskim rekacijama s norboranom u smjesi s bis(triefenilfosfin)niklovim bromidom i Al/Ni pri čemu se dobivaju polinorbornani.[38]

U reakcijama s dibrometanom[40] ili s ostalim reagensima tipa $(-CH_2-)_nX_2$ te uz sulfurizaciju pripravljeni su analogni spojevi predhodno dobivenim s diklormetanom, koji također imaju koordinacijska svojstva.[41]

U tom kontekstu Quiangan i suradnici su sintetizirali i uspješno riješili kristalnu strukturu 1,2-bis(2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)etana.[42] Iako se u ovim reakcijama direktno ne koristi **1** kao polazni spoj, dobiveni spojevi daju uvid u reaktivnost i sintetske puteve u kojima su produkti spojevi metimazolne građe.

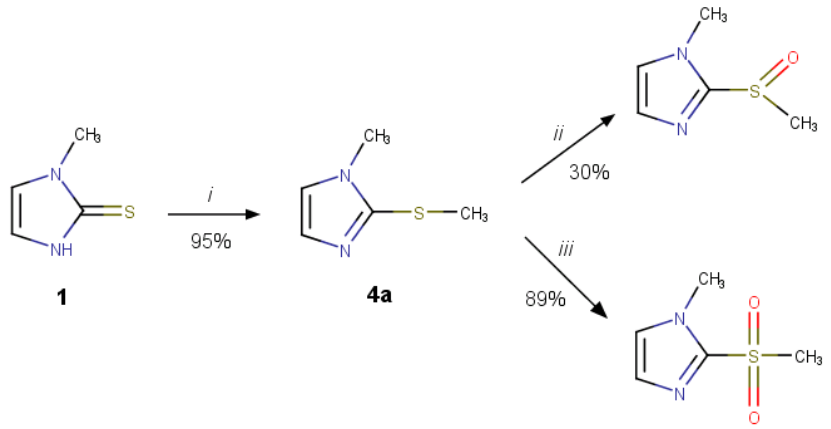
S druge strane, reakcijom metimazola s 1,2-dibrometanom u dvofaznom sustavu benzen - 40 % natrijeva lužina uz tetrabutilamonijev bromid kao katalizator pri 50 ºC tijekom 20 sati pripravljen je 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3**) s iskorištenjem od 73 % (Shema 4).[43]



Shema 4. Priprava bis derivata **3a;** *i*) benzen,40%NaOH, $(NBu)_4Br$, 50°C, 20 sati.[43]

Vampa i suradnici[23] proučavali su metilaciju **1** s metil jodidom uz natrijev karbonat pri sobnoj temperaturi, a nakon ekstrakcije s kloroformom i uparivanjem organskog ostatka pripravljen je 1-metil-(2-metiltio)imidazol (**4a** onečišćenje C metimazola) u 95% iskorištenju (Shema 5). Daljnjom oksidacijom **4a** s vodikovim peroksidom pri sobnoj temperaturi dobivaju se sulfenilni i sulfonilni derivati (Shema 5), a struktura sulfonilnog derivata potvrđena je rentgenskom strukturnom analizom.

U kontekstu onečišćenja C, Kister i suradnici proveli su studije metilacije **4a** s metil jodidom pri čemu je izdvojen 1,3-dimetil-2-metiltioimidazolijum-jodid, a dodatno je i proučena njegova katalitička uloga u intermolekularnoj migraciji metilne skupine koja je uvjetovana elektronskim i steričkim čimbenicima te primijenjenoj temperaturi.[44] Nedostatak jasnoće i preciznosti navedenog rada prepoznat je od strane drugih autora, pri čemu su prikazani rezultati i zaključci dovedeni u sumnju.[45]

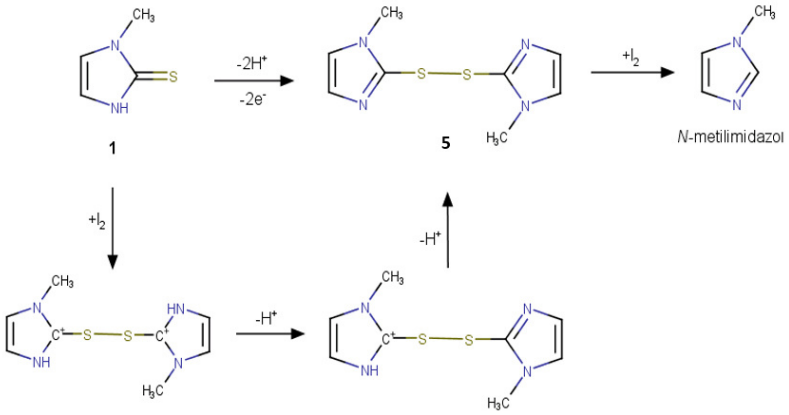


Shema 5. Sinteza onečišćenja C (**4a**) i njegova daljnja oksidacija. Uvjeti reakcija: *i*) CH_3I, Na_2CO_3(0,31M), sobna temp., 60 minuta; *ii*) H_2O_2 (w=30%), AcOH, sobna temp., 4 sata; *iii*) H_2O_2 (w=30%), AcOH, sobna temp., 20 minuta.

Od hidroliza posebno treba istaknuti bazno- i kiselo-katalizirane hidrolize, koje dovode do stvaranja karbonilnih spojeva. Ipak, hidroliza katalizirana metalnim ionima je najčešća, jer metalni ion djeluje na atom sumpora kao elektrofil, što uzrokuje slabljenje C-S veze.[46]

Do oksidacije tiokarbonilne skupine na karbo- i heterocikličkim, kao i acikličkim strukturama dolazi djelovanjem brojnih anorganskih i organskih oksidacijskih sredstava, što dovodi do stvaranja struktura sa disulfidnom vezom (>C-S-S-C<), karbonilnom skupinom (>C=O) ili u krajnjem slučaju s metilenskom skupinom (>CH_2).[46] Ovaj posljednji slučaj je posebno izvjestan kod tio-enolizirajućih heterocikličkih spojeva, gdje se reakcija oksidacije odvija preko sulfhidrilne (tiolne) skupine (>C-SH) sve do sulfonske kiseline (>C-SO_3H), koja gubi atom sumpora kao sumpornu kiselinu.[46] Općenito, to metimazol, ali i sve imidazol tione čini važnim sintonima za sintezu imidazola obzirom na njihovu laku desulfurizaciju.[47] Tako se metimazol vrlo lako oksidira do metimazol-disulfida (2,2'-disulfandillbis(1-metil-1*H*-imidazol, **5**), što slijedom daljnjih oksidacijskih i/ili hidrolitičkih reakcija može dovesti do stvaranja metimazol-sulfenske, metimazol-sulfinske i metimazol-sulfonske kiseline, te konačno 1-metilimidazola.[48] U okviru toga metimazol-disulfid **5** može se preparativno pripraviti oksidacijom metimazola s hipokloritom i bromom[49] te jodom.[50,52] Pritom je od posebne važnosti izbor otapala, jer intermedijerno najprije nastaje kompleks metimazola s jodom,[52] a potom metimazol složene soli metimazol-disulfida. Prva, struktura $[(C_4H_6N_2S\text{-})_2]I_8$, koja se sastoji od disulfidnog dikation i J_8^{2-}, kao protuaniona, te druga $[2(C_4H_6N_2S\text{-}\ S\ N_2\ C_4H_6)]I_3\ I_5$, koja sadrži dva neovisna disulfidna monokationa, koja kao protuanione imaju J_3^- i J_5^- anione. Daljnjom protonacijom

ovog posljednjeg nastaje metimazol disulfid (Shema 6). Struktura kompleksa i obje soli potvrđena je rentgenskom strukturnom analizom.[51]

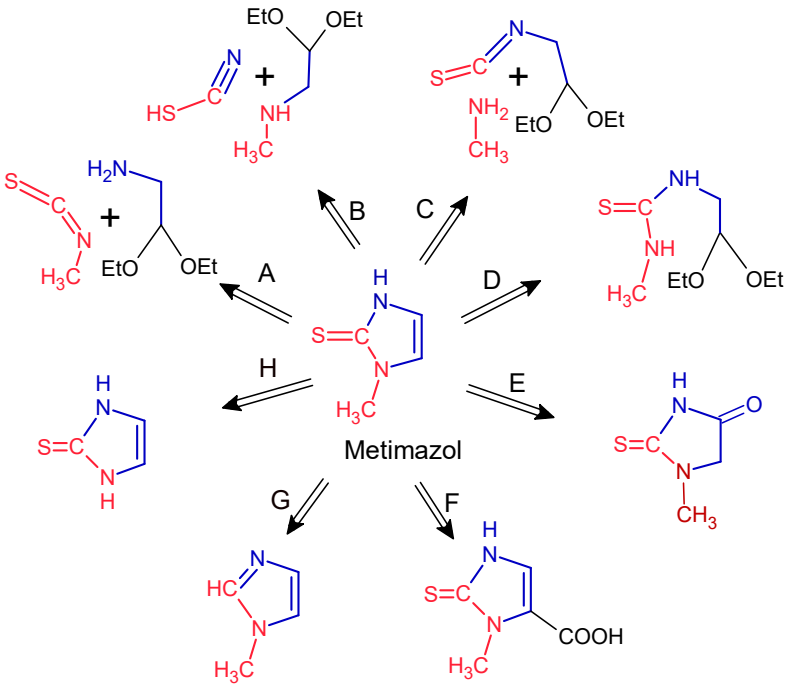


Shema 6. Kemizam oksidacije/degradacije metimazola jodom preko metimazol disulfidnih kationa i metimazol disulfida (**5**) do 1-metil-1*H*-metimazola (Prilagođeno prema literaturi[51,52]).

Pouzdano je utvrđeno da je **1**, već u vrlo malim koncentracijama, vrlo jaki „sakupljač“ (Scavenger) hidroksilnih ($OH^{\bullet}$) i jodnih ($I_2^{-\bullet}$) radikala, pri čemu dolazi do njegova raspada preko metimazol radikal-kationa.[53]

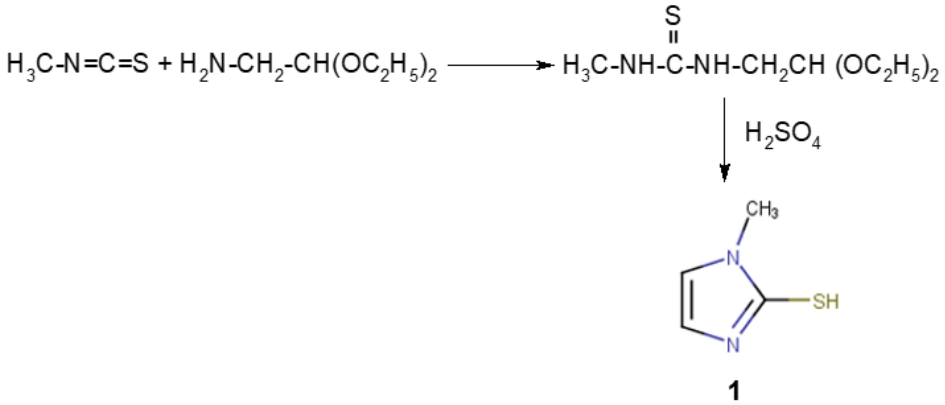
2.2.5 Sinteze metimazola

Retrosintetski gledano metode priprave metimazola (**1**) polaze od dva (A - C) ili od jednog (D - H) sintetskog elementa, a među njima metode E - H kreću od već izgrađenog imidazolskog prstena (Shema 7). Pritom pretežu metode A - C. Općenito, 2-merkaptoimidazoli mogu se sintetizirati iz acetala α-aminoaldehida (ili analognih ketala) i alkilizotiocijanata. Kao produkti dobivaju se 1-alkilimidazol-2-tioni. Mogu se sintetizirati i korištenjem metalnih tiocijanata u reakciji s *N*-alkil-α-aminoacetalima.



Shema 7. Retrosintetski prikaz metoda priprave metimazola.

Originalna sinteza **1** temeljena je na kondenzaciji metil-izotiocijanata s aminoacetaldehid dietil acetalom (put A), i nastavnom ciklizacijom intermedijerno nastale metilitiouree u prisutnosti kiseline (put D) (Shema. 7). Ova sinteza potječe iz još iz davne 1889., a proveli su je Wohl i Marckwald (Shema 8).[54,55] Do današnjih dana mnogi su autori proveli različite modifikacije izvorne sinteze.



Shema 8. Prva metoda priprave **1**.

Tako se **1** može dobiti i reakcijom *N*-metilaminoacetaldehid acetala sa kalijevim-tiocijanatom u prisustvu razrijeđene kloridne kiseline (put B, Shema 7). Razrijeđena kloridna kiselina se dodaje u smjesu *N*-metilaminoacetaldehid dietil acetala i kalijevog-tiocijanata. Smjesa se nakon

12 sati uparava do suha, te zatim refluksira kroz 1 sat uz dodatak bezvodnog acetona. Nakon toga slijedi filtracija produkta i ispiranje taloga sa 50 ml acetona. Acetonska otopina **1** se zatim uparava i dobiva se sirovi metimazol, koji se može pročistiti kristalizacijom. Iskorištenje reakcije je 84%.[56] Kasnije, je reprodukcijom ove metode pripravljen **1** u 75-85 % iskorištenju.[1] Analogno, pripravom *N*-substituiranih acetala, zagrijavanjem klor ili brom acetala s primarnim aminima, a potom njihovom kondenzacijom s kalijevim tiocijanatom pripravljeni su i drugi *N*-alkil analozi **1**.[56] Na isti se način priprema i radioaktivno označeni 2-^{14}C-metimazol samo što se koristi radioaktivno označeni ^{14}C-tiocijanat u kiselom mediju.[57]

Metimazol se može dobiti redukcijom 1-metilhidantoina u dioksanu (put E, Shema 7)[58] kao i dekarboksilacijom 1-metil-2-merkapto-5-imidazolkarboksilne kiseline u talini uz gotovo kvantitativno iskorištenje (put F, Shema 7).[56] Metimazol je pripravljen s 42 % iskorištenjem i direktnom *alfa*-metilacijom 1-metilimidazola u položaj 2 imidazolskog prstena s *n*-butillitijem u THF pri – 78 °C, a potom djelovanjem s elementarnim sumporom (put G, Shema 7).[58]

Naposljetku, **1** je moguće pripraviti i metilacijom imidazolin-2-tiona, pri čemu se odvija i konkurentska reakcija metiliranja na atomu sumpora (put H, Shema 7).

2.2.6 Stabilnost i onečišćenja metimazola

Metimazol je relativno stabilan spoj pri sobnoj temperaturi. Kao i većina organosumporovih spojeva podložan je oksidativnom raspadu sa zrakom, pogotovo u prisutnosti svjetla. Stoga ga je preporučljivo čuvati u dobro zatvorenim posudama, na suhom mjestu, zaštićenim od zraka i svjetla.

Proizvođač metimazola Ueticon, navodi retest period sirovine od 5 godina. Ueticon proizvodi metimazol od 1986. Godine. Stabilitetni program sastoji se od praćenja metimazola pri normalnim uvjetima (25±2°C/60%RV±5%) i ubrzanim uvjetima (40±2°C/75%RV±5%). Metimazol se pakira u polietilenske vreće smještene u polietilenske posude. Tijekom perioda praćenja sirovine u stabilitetu prate se sljedeći parametri: osobine, sadržaj, gubitak sušenjem, onečišćenja (metodom plinske kromatografije i metodom tankoslojne kromatografije) Analitičke metode koje se koriste za stabilitetno praćenje ujedno se koriste i za rutinska ispitivanja tijekom puštanja proizvoda na tržište. Metode plinske kromatografije i metoda tankoslojne kromatografije su stabilitetno indikativne za praćenje onečišćenja.[59]

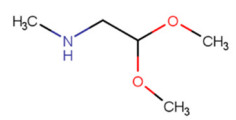
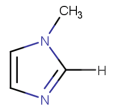
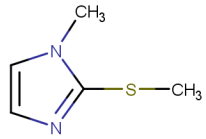
Kvalitetu djelatne tvari definiraju onečišćenja, a njihova identifikacija omogućava uvid u razumijevanje podrijetla, kemizam nastajanja i osiguravanje kakvoće. Poseban naglasak stavlja se na DNA reaktivna onečišćenja koja zbog svoje potencijalne genotoksičnosti zahtjeva provedbu toksikoloških istraživanja i kvalifikaciju onečišćenja.

Važeće smjernice klasificiraju onečišćenja na anorganska, organska i ostatna otapala. Prisustvo anorganskih onečišćenja u djelatnoj tvari potječe iz sintetskog procesa, a većinom su poznata i najčešće se odnose na reagense, ligande, teške metale, katalizatore ili soli. Organska onečišćenja mogu biti procesna onečišćenja, ili ona koja potječu od polazne sirovine, nusprodukata, ili mogu biti produkti razgradnje djelatne tvari. Onečišćenja mogu biti identificirana ili neidentificirana, a njihova razina definira se prema važećoj regulativi. Nepoznata onečišćenja nužno je identificirati još u fazi razvoja proizvoda, jer poznavanje strukture i reakcijskog mehanizma nastanka onečišćenja ili srodne tvari omogućava bolji uvid u proces njegovog nastanka te osigurava podlogu za optimizaciju procesa.[60]

Razina onečišćenja koju je potrebno prijaviti, identificirati ili ograničiti definira se prema maksimalnom dnevnom unosu primjerice, ukoliko je maksimalni dnevni unos manji od 2 g razina nepoznatog onečišćenja ne smije prelaziti 0,1 %, jer se tada onečišćenje mora identificirati, a ukoliko je riječ o poznatom onečišćenju ono ne smije biti više od 0,15 %. Ukoliko je maksimalni dnevni unos veći od 2 g tada se primjenjuju stroži pristup, primjerice onečišćenje se mora prijaviti ako ga je prisutno više od 0,03%, identificirati i ograničiti u razini iznad 0,05 %.[61] Za DNA reaktivna onečišćenja primjenjuju se recentne smjernice regulatornih tijela, a posebni se naglasak stavlja na genotoksična i mutagena onečišćenja.[62]

Onečišćenja metimazola (**1**) vuku svoje podrijetlo uz kemizam sintetske reakcije priprave i/ili uz stvarni ili potencijalni put njegove razgradnje, a mogu mu biti srodne po strukturi. U Europskoj farmakopeji 7.0 [63] definirana su tri onečišćenja (Tablica 2).

Tablica 2. Oznaka i struktura onečišćenja metimazola prema Ph.Eur 7.0.[63]

Onečišćenje		Struktura
A	2,2-Dimetoksi-*N*-metiletanamin	
B	1-Metil-1*H*-imidazol	
C	1-Metil-2-(metiltio)-1*H*-imidazol (**4**)	

Ueticon, proizvođač metimazola (**1**), uz već postojeća onečišćenja navodi i 1-metil-2-metilsulfanil-imidazonijum-rodanid koji se javlja zbog puta sinteze.[59]

Kako bi se odredila kvaliteta djelatne tvari i finalnih formulacije nužno je promatrati promjenu kritičnih atributa kvalitete kroz vrijeme kako bi se utvrdio utjecaj na sigurnost, učinkovitost i kakvoću te potvrdio rok valjanosti. Primarna uloga stabilitetnih studija je procjena utjecaja na zdravlje pacijenta. Najčešće se kroz stabilitetne studije može utvrditi pad i porast sadržaja što može dovesti do smanjenja učinkovitosti ili povećati sigurnosni rizik, zatim porast onečišćenja poglavito onih toksične prirode, gubitka integriteta pakiranja, mikrobioloških promjena itd. S druge strane u okviru stabilitetnih studija provode se i studije prisilne razgradnje kako bi se predvidjeli eventualni problemi, razvile analitičke metode, i identificiralo kemizam i mehanizam razgradnje. Razgradnja djelatne tvari na produkte koje možemo smatrati onečišćenjima i/ili srodnim tvarima može biti kemijska (solvoliza, oksidacija, kopulacija i sl), fizikalna (inducirana temperaturnim varijacija, vibracijama i sl.) i biološka (mikrobiološki inducirana).

2.2.7 Metalni kompleksi

Nekovalentne interakcije imaju važnu ulogu na mnogim znanstvenim poljima.[64] Metalni ioni su uvijek uključeni u biološke procese poput regulacije enzima, stabilizacije i modulacije aktivnosti nukleinskih kiselina.[65] Istraživanje interakcije metalnih kationa i bioloških molekula nužni su za bolje razumijevanje uloge metalnih iona u biološkim stanjima.

Metimazol (**1**) posjeduje tioureidni farmakofor, a sumporov atom ima elektron donorska svojstva i može stupati u interakciju sa elektron akceptorima poput npr. metalnim kationima. Svojstvo **1** da formira komplekse sa metalima može imati farmakološku primjenu u slučajevima gdje postoji kompeticija metala i ostalih bioliganada koji sadrže sumpor. Također i priprema ovih kompleksa i njihova strukturna karakterizacija može biti od važnosti u medicini i farmakologiji.[66]

Metimazol stvara metalne komplekse s teškim metalima, poput iona Cu^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}. Foye i Lo[67] istraživali su kelatizirajuća svojstva imidazola i ostalih sličnih heterocikličnih tiona i dokazali korelaciju između jačine vezivanja metala i njihove antimikrobne djelotvornosti.

Sintetizirani su i određena je kristalna struktura različitih kompleksa metimazola s Cu(I) solima.[68] Metimazol kompleksira s olovnim nitratom,[69] a s boratom i fosfinom zlata daje molekularni kompleks distorzirane trigonske strukture.[70]

Metimazol se može kompleksirati i s metalnim solima cinka i kadmija. Strukture kompleksa ispitane su vibracijskom spektroskopijom (koja uključuje IR, Raman i UV-VIS) kao i rendgenskom strukturnom analizom. Svi kompleksi pokazuju tetraedarsku geometriju.[71] Poznate su također i strukture metalnih kompleksa **1** sa niklom,[72] kobaltom i cinkom,[73] bakrom[74,75] te živom.[76]

Reakcijom **1** s akvapentacijanoferatom (II) u puferiranoj vodenoj otopini nastaje vrlo stabilni i inertni kompleks sa željezom, $[Fe(CN)_5(metimazol)]^{3-}$ u kojemu NH-tautomer **1** (Shema 1) koordinira na Fe (II).[20]

Pažnju u znanstvenoj literaturi ima i interakcija **1** s metalnim ionima poput platine (II) i paladija (II) te rodija (I) i (III). Navedeni kompleksi su istraženi primjenom IR i NMR tehnike. U kompleksu sa platinom metimazol je zastupljen u omjeru 1:1, a interakcija je ostvarena preko sumporovog atoma.[77] Pripravljeni su i različiti kompleksi **1** i platine (II), gdje je **1** koordiniran i u tionskoj i tiolatnoj formi.[78]
Također, Wagler i suradnici sintetizirali su novu klasu monodentatnih kompleksa dobivenih reakcijama **1** s organoklorsilanima.[79] Kompleks bakra (II) s **1**, pokazao je tijekom ispitivanja, značajnu sposobnost vezivanja superoksidnog iona, a planiraju se i provesti daljnje farmakološke studije.[80]

Poznavajući biocidna svojstva srebra pripravljeni su i strukturno karakterizirani kompleksi **1** sa srebrom i trifenilfosfinom, a njihova antimikrobna svojstva dokazana su na gram negativnim

bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli,* a u isto vrijeme nije utvrđen genotoksični potencijal pri čemu ispitivani kompleksi imaju potencijalnu farmaceutsku primjenu.[81]

2.2.8 Primjena

Humana medicina

Metimazol se nalazi na tržištu diljem svijeta pod zaštićenim imenima: Athyrazol, Basolan, Danantizol, Favistan, Frentirox, Mercazole, Metazole, Metibasol, Metothyrine, Strumazol, Tapazole, Thacapzol, Thiamethazole, Thycapzol, Thyrozol and Tirodril. Karbimazol se koristi kao tireostatik u Europi i Japanu.

Metimazol se brzo absorbira iz probavnog trakta, a u serumu se nalazi nakon 2 sata od ingestije lijeka. U serumu se nalazi u slobodnoj formi i ne veže se na proteine plazme.[1] Početna dnevna startna doza oralno apliciranog metimazola je 10-30 mg. Visoke doze od 120 mg/dnevno (20 mg svaka 4 sata) primjenjuju se kod tireotoksikoze.[82] Zbog dugog vremena djelovanja metimazola nepotrebno je kontinuirano doziranje kod većine pacijenata.[83] Terapija Metimazola može trajati od nekoliko mjeseci do nekoliko godina. Kada dođe do poboljšanja zdravstvenog stanja doza lijeka se može smanjiti na 2,5 do 5 mg dnevno.[82]

Metimazol se može aplicirati i rektalno kod pacijenata koji ne mogu oralno primati terapiju. Doza nije individualizirana kod djece, odraslih i starijih osoba.[82] Metimazol se smatra sigurnim pri niskim dozama za dojilje.[84]

Provedena su i završena klinička ispitivanja antitiroidne masti za lokalnu terapiju, koja sadrži metimazol i hidrokortizon. Studija je pokazala da je ova terapija bolje podnošljiva i efikasnija nego oralna terapija s metimazolom.[85]

Novija medicinska istraživanja proširuju primjenu metimazola na bolesti u kojima dolazi do adhezije stanica poput upala centralnog živčanog sustava (meningitis, astma, reumatoidni artritis, dijabetes itd.),[86] zatim u liječenju psorijaze,[87] u upalnim bolestima,[88] a pokazuje i protektivni efekt pri nefrotoksičnom djelovanju cisplatina i gentamicina.[89]

Veterinarska medicina

Metimazol se u veterinarskoj medicini koristi pod nazivom Felimazol™ firme Dechra Veterinary Products.[90] Felimazol je šećerom obložena tableta, a koristi u liječenju mačaka i pasa. Koristi se u kratkotrajnoj primjeni, u odgađanju terapije jodom, te pri smanjenju komplikacija nakon zahvata na tireodnoj žlijezdi.[91] Sigurnost i efikasnost metimazola ispitana je u studiji u kojoj je sudjelovalo 262 mačke sa hipertireozom tijekom 3 godine.[92]

U studiji Pignatao et al. ispitivana je stabilnost metimazola u polioksamernom lecitinskom organogelu sa ciljem pripreme formulacija za transdermalnu primjenu u mačaka. Stabilitetne studije provedene su tijekom tri mjeseca te je ispitano na koji način temperatura utječe na stabilnost formulacije. Utvrđeno je da je formulacija nestabilna ukoliko se pohranjuje na nižim temperaturama (5°C), dok je pri sobnoj temperaturi stabilna tijekom 60 dana.[93]

Eksperimenatni podaci pokazali su da velike primijenjene doze metimazola u mačaka mogu imati zaštitni učinak na jetru. Poglavito kod tretmana nefrotoksičnim lijekovima poput cisplatina. Protektivni učinak pripisuje se antioksidativnoj aktivnosti metimazola, međutim potrebne su daljnje studije u ovom smjeru. Kod mačaka i pasa nepoznati je put biotransformacije metimazola. Doziranje kod oralne primjene kod mačaka je 2,5 mg/mački svakih 12 sati za srednje izraženi hipertiroizam. Za složenije oblike hipertiroizma terapeutska doza je 5 mg/mački svakih 12 sati. Doziranje kod transdermalnih gelova iako studije efikasnosti i sigurnosti nisu provedene topikalna doza je 2,5 do 5 mg/mački svakih 12 sati U ovoj formi nije odobren od strane Američke agencije za lijekove i medicinske proizvode za upotrebu u veterinarskoj medicini.[92]

Nedavno je, tijekom 12 tjedana testirana, nova, jednodnevna transdermalna formulacija metimazola na mačkama u usporedbi s karbimazolom. Pokazalo se je da je ova formulacija djelotvorna i sigurna kao dvaput dnevna terapija hipertiroidizma karbamizolom u mačaka, što može imati praktične prednosti u veterinarskoj praksi.[94]

Transdermalni gelovi metimazola za veterinarsku primjenu prodaju se u brizgalicama od 3 ml s rokom upotrebe od 30 dana nakon priprave. Na veterinarskom tržištu postoji i suspenzija metimazola u 30 ml inkrementima s rokom upotrebe od 90 dana nakon priprave.[95]

Tehnika

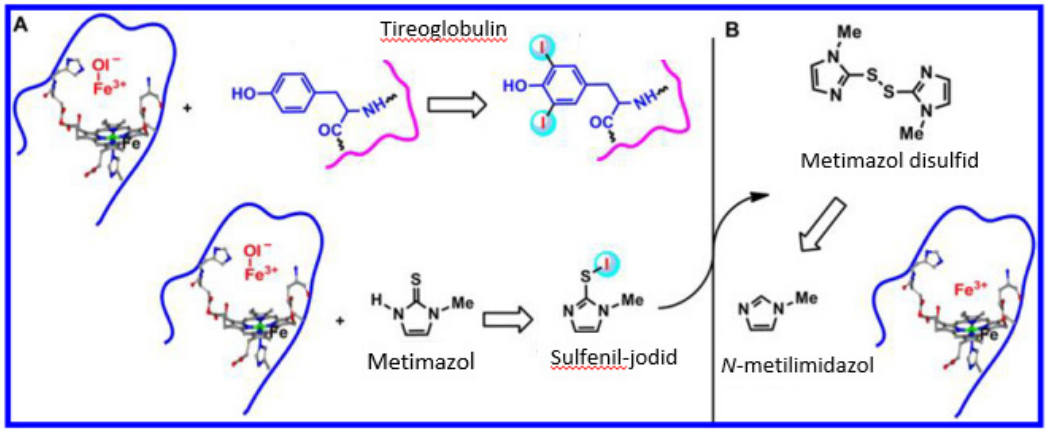
Studijama je pokazano da metimazol ima antikorozivno djelovanje, ako se u obliku monosloja nanese na bakrovoj [96] i srebrenoj površini.[97] Molekule metimazola u monosloju pokazuju svojstvo samorganizacije, a preko sumporovog i dušikovog atoma ostvaruju snažnu interakciju sa metalnom površinom.[98]

Svojstvo samoorganizacije metimazola na metalnim površinama može biti primijenjeno u tehnologiji stentova. Stentovi su metalne mrežice koje se ugrađuju u krvne žile, a njihova uloga je sprječavanje fibroze. Primjer tehnologije stentova sa ugrađenom aktivnom tvari su Taxus stentovi koji imaju ugrađeni paklitaksel, a Taxus je odobren od strane Američke Agencije za hranu i lijekove.[99]

Metimazol se koristi kao sirovina za sintezu ionskih kapljevina,[100, 45] koje u posljednjoj dekadi zbog vrlo raznolike mogućnosti primjene, izazivaju svekoliki interes.[101]

2.2.9 Mehanizam djelovanja i metabolizam

Iako se metimazol koristi u kliničkoj praksi više od osam desetljeća mehanizam njegovog djelovanja nije u potpunosti istražen.[102] Predloženi mehanizam djelovanja metimazola uključuje inhibiciju sintezu tireoidnih hormona na način da se veže na tiroidnu-peroksidazu te blokira proces jodiranja tirozinskih ostataka u tiroglobulinu, što je ključni korak za sintezu hormona T4. U prisustvu metimazola jodiranje se prvenstveno odvija na sumporu, a ne na tirozinskim ostacima tireoglobulina pri čemu dolazi do formiranja predloženog sulfenil jodida (Slika 15). U ovom slučaju metimazol djeluje kao alternativni supstrat pri čemu odvodi jodid od jodirajućeg međuprodukta i na taj način sprječava jodiranje tirozinskih ostataka u tireoglobulinu. [102]



Slika 15. Predloženi mehanizam inhibicije tireoidne peroksidaze (prilagođerno prema [102])

Nestabilni sulfenil jodid se zatim disproporcioniranjem pretvara u metimazol disulfid, a dalje biometabolizmom u *N*-metilimidazol.[102]

Metabolizam metimazola je primarno hepatički te se prema literaturnim podacima brzo metabolizira.[103] Studija na štakorima pokazala je da nakon intraperitonealne ili oralne administracije metimazola (20 mg/kg) dolazi do urinalnog izlučivanja u formi glukonorida u odnosu na 36-48% doze tijekom 24 sata. Ostali metaboliti, u količini od 10-20 % nisu karakterizirani. Dodatnih 14-20% produkata izluči se urinom nepromijenjeno tijekom 24 sata. Žuč sadrži metimazolne glukonoride i dva neidentificirana metabolita. Jedan je isti kao i neidentificirani urinarni metabolit. Metimazol ima viši $CHCl_3/H_2O$ koeficijent razdjeljenja i višu topljivost u vodi u odnosu na propiltiouracil. Između 77 i 95 % metimazola izlučuje se putem urina i oko 10 % putem žuči. Fekalna ekskrecija je upitna, osim ako je prisutna enterohepatična cirkulacija. Vrijeme poluživota metimazola iznosi 5-7 sati, neovisno o načinu primjene.[1]

3-Metil-2-tiohidantoin identificiran je kao metabolit u plazmi, urinu i tkivu štitne žlijezde kod pacijanata koji su uzimali metimazol i karbimazol.[104]

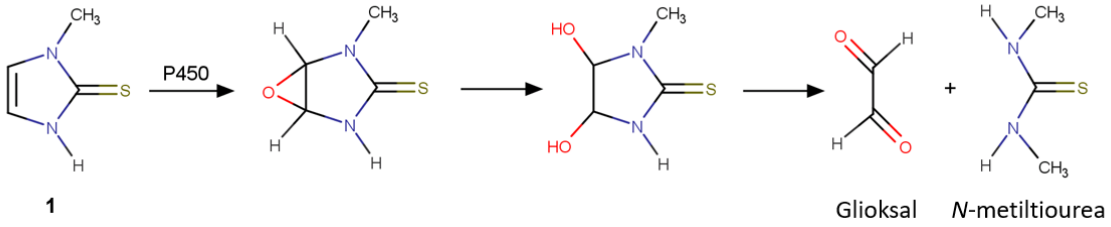
Metimazol se akumulira u tkivu štitne žijezde, a efekt inhibicije jodiranja može biti do 24 sata. Vrijeme poluraspada metimazola je kratko, dok 3-metil-2-tiohidantoin kao metabolit metimazola ima dokazano tri puta dulje vrijeme poluraspada. Produljeno vrijeme djelovanja metimazola također može biti posljedica djelovanja 3-metil-2-tiohidantiona čija je antitiroidna aktivnost dokazana kod štakora.[81] Također ne postoji statistička razlika (t-test $p>0.05$) između farmakokinetičkih parametara kod terapije metimazolom i karbimazolom.[103]

Radioizotopno označen metimazol sa sumporom ^{35}S i primijenjen intraperitonealno u štakorima pokazao je akumulaciju u tireoidnoj žlijezdi. Prvi detektirani metabolit je metimazol-disulfid, čija koncentracija nakon nekoliko minuta pada ispod nivoa detekcije. Kasnije se disulfidne forme transformiraju u sulfatni i sulfidni derivat metimazola, te se u formi metimazol-sulfata nalazi u tireoidnoj žlijezdi. Većina označenog spoja izlučena je u urinu. Isti rezultati nađeni su i kod čovjeka. Pokazano je da se metimazol kod ljudi sporije apsorbira i sporije izlučuje u usporedbi sa propiltiouracilom. Vrijeme poluraspada u plazmi za izotopno označeni metimazol je 2-5 puta više u odnosu na izotopno označeni propiltiouracil. Krivulja radioaktivnosti, nakon oralne primjene radioaktivno označenog karbimazola (^{35}S) vrlo je slična krivulji koju daje metimazol.[105]

Aleksandar i suradnici predložili su da veći utjecaj na biološko vrijeme poluraspada metimazola ima bubrežna funkcija nego tiroidni status.[106]

Pokusi na miševima pokazali su da se metimazol aktivira preko citokroma P450 i flavinskih monooksigenaza, pri čemu dolazi do stvaranja hepatotoksičnih produkata. Od metaboličnih produkata identificirana je *N*-metiltiourea i glioksal (Shema 9). Ova dva metabolita detektirana su u urinu. Zasićenje dvostruke veze između 4 i 5 ugljikovog atoma u imidazolnom prstenu metimazola dovodi do gubitka hepatotoksičnosti, a metilacijom tionske skupine dolazi do potpunog gubitka toksičnosti.[107]

U studijama molekulskog modeliranja primjenom molekulske mehanike, te semiempirijskim proračunima molekulskih površina metimazola, *N*-metiltiouree i glioksala utvrđeno je da postoje elektron deficitarne regije. Te regije mogu reagirati sa staničnim nukleofilima poput glutationa i nukleobaza u DNA molekuli. Reakcija sa glutationom u stanici rezultirala bi okidacijskim stresom, dok bi reakcijom sa nukleobazama došlo do oštećivanja DNA molekula. Veliki broj nuspojava koje se javljaju kod primjene metimazola mogu u velikoj mjeri biti rezultat djelovanja glioksala obzirom da je kinetički nestabilna molekula. Također i metimazol je toksičan, te se njegov učinak na glutation i nukleobaze može enzimatski pojačati tijekom staničnih procesa.[108]



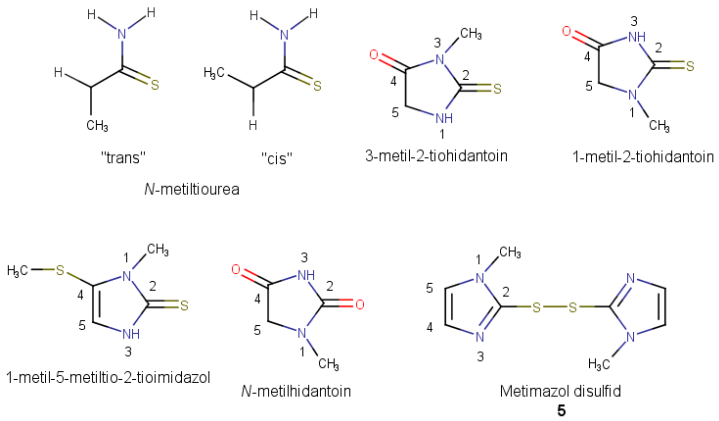
Shema 9. Prikaz strukturne razgradnje metimazola putem sustava monooksidaza i formiranje hepatotoksičnih produkata.[108]

N-metiltiourea može postojati u formi dva konformera, u literaturi netočno nazvani *cis* i *trans* forme. *„Cis,“* forma dominira u čvrstom stanju, što je utvrđeno s *„ab initio“* MO računom i potvrđeno rentgenskom strukturnom analizom. (Slika 16).[109]

U mokraći čovjeka i štakora nađen je kao metabolički produkt 1-metil-5-metiltio-2-tioimidazol.[110]

Okso spoj, *N*-metilhidantoin, pronađen je kao metabolit metimazola u homogenizatu cijelih zebrica riba,[111] [Zebrica (lat. *Danio rerio*) vrsta je tropske slatkovodne ribe iz roda *Danio*, porodice *Cyprinidae* (šarani)].[112]

Potvrđeno je da može nastati epoksidacijom na četvrtom i petom ugljikovom atomu tioimidazolnog prstena, a potom oksidacijom.[107]



Slika 16. Prikaz izabranih metabolita metimazola.

2.2.10 Toksicitet

Osnovni podaci o toksicitetu metimazola, ovisno o načinu aplikacije preuzeti su s mrežne stranice ChemIDplus baze podataka (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/ - datum pretrage 12.08.2016.) i prikazani su u Tablici 3.

Metimazol ima mnoge nuspojave, među kojima su najčešće oštećenje jetre, agranulocitoza i vaskulitis.[8] Nuspojave koje se javljaju kod liječenja metimazolom su ovisne o dozi.[113]

Mehanizam koji inducira hepatotoksičnost još nije poznat, kao ni protektivne tvari koje bi spriječile oštećenje jetre. Pozitivan korak u tom smjeru je istraživanje provedeno na organosumporovim spojevima poput *N*-acetilcisteina, prop-2-en-1-tiola i dialil-disulfida koji su pokazali protektivni učinak na toksičnost ispitanu na izoliranim staničnim hepatocitima.[114]

Tablica 3. Osnovni podaci o toksicitetu metimazola, preuzeto s mrežne stranice ChemIDplus (http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/60-56-0#toxicity-datum pretrage 12.08.2016.)

Organizam	Tip testa	Način aplikacije	Opisana doza (Normalizirana doza)	Djelovanje	Izvor
Miš	LD50	Ip	500 mg/kg		115
Miš	LD50	Orl	860 mg/kg	Peripheral nerve and sensation: spastic paralysis with or without sensory change behavioral: tremor somnolence (general depressed activity)	116
Miš	LD50	Sc	345 mg/kg	Behavioral: tremor somnolence (general depressed activity) peripheral nerve and sensation: spastic paralysis with or without sensory change	116
Štakor	LD50	Orl	2250 mg/kg	Behavioral: somnolence (general depressed activity) peripheral nerve and sensation: spastic paralysis with or without sensory change behavioral: tremor	116
Štakor	LD50	Sc	1050 mg/kg		117
Žene	TDLo	Orl	13 mg/kg/33D	Gastrointestinal: other changes behavioral: excitement sense organs and special senses: other: ear	118
Žene	TDLo	Orl	492 mg/kg/88W	Blood: agranulocytosis endocrine: change in gonadotropins	119

Ip = Intraperitonealno , Orl = oralno, Sc = subkutano.

Poznato je da metimazol utječe na osjetila okusa i mirisa kod ljudi. U studiji koju su proveli Berkman i Brittebo, promatran je utjecaj metimazola na olfaktorni sustav miševa. Nakon tromjesečnog tretmana metimazolom histopatološki nalazi pokazali su lezije na mukoznom tkivu olfaktornog sustava. Pred tretman miševa sa tiroksinom nije pokazao zaštitni učinak na

tkiva, dok je predtretman sa metiraponom, inhibitorom P450 monookigenaznog sustava u potpunosti spriječio kovalentno vezivanje i toksičnost metimazola u olfaktornoj mukozi. Rezultati upućuju da su toksični učinci posljedica stvaranja reaktivnih metabolita preko P450 citokroma, koja zatim djeluju na razna tkiva.[120] U pokusima je dokazano da glutation ima važnu ulogu u sprječavanju hepatotoksičnosti kod miševa uzrokovanu metimazolom.[121]

Upotreba metimazola tijekom prvog trimestra u trudnoći dovodi do stvaranja kongenitalnih malformacija.[122]

U studiji u kojoj je evaluiran toksični učinak metimazola na pacijente sa hipertireozom, pacijenti su primali visoke dnevne doze 40-120 mg. U 3 % liječenih pacijenata se javljala granulocitopenija, agranulocitoza i poremećaji u funkciji rada jetre. U 13 % pacijenata javljali su se osipi, želučani problemi, artralgija.[123]

2.2.11 Metode analize

Metode za analizu metimazola opisane su u literaturi, a koriste se različite analitičke tehnike. Također imajući na umu da je metimazol djelatna tvar koja ima važnu primjenu u farmaceutskoj industriji i da je farmakopejska sirovina većina testova koje se koriste za određivanje kakvoće opisane su u monografiji. Testovi uključuju ispitivanje osobina, identifikaciju, određivanje sadržaja metimazola, teških metala, sulfatnog ostatka, onečišćenja i itd.[63]

Pored navedenih farmakopejskih metoda postoji i značajan broj onih s različitom namjenom, no mogu se podijeliti na: titrimetrijske, spektrometrijske, spektroskopske, potenciometrijske i kulometrijske te u konačnici kromatografske metode.

Od titrimetrijskih metoda opisane su titracije u vodi kojima se određuje sadržaj metimazola primjerice a) otopinom srebrovog nitrata titracijom s natrijevim hidroksidom uz bromtimol kao indikator,[1] b) uz dodatak joda i natrijevog azida te titracijom s natrijevim arsenatom,[124] c) dodatkom otopina kalijevog bromata i kalijevog bromida uz zakiseljavanje te titracijom s natrijevim tiosulfatom uz kalijev jodid i škrob kao indikator ili pak d) titracijom otopine metimazola s otopinom cerijevog sulfata uz *p*-etoksikrizol-jod kao indikator.[1]

Uz titracije u vodenom mediju poznate su i titracije u nevodenom mediju, pri kojima se otopini metimazola dodaje živin acetat otopljen u octenoj kiselini, a zatim slijedi titracija s perklornom kiselinom uz kristal violet kao indikator.[1]

Od spektrometrijskih metoda opisane su metode primjenom tehnika infracrvene i ultraviolentne spektrometrije. Za metodu koju koristi infracrvenu spektrometriju nužna je izolacija

metimazola iz tabletnog matriksa pomoću kolonske kromatografije na stupcu Celita 545 uz klorofom kao eluens.[125] Metoda ultraviolentne spektrometrije može koristi kiseli ili lužnati medij. Važno je istaknuti da vodene otopine metimazola imaju maksimum apsorpcije pri 250 nm, u jako kiselim i jako lužnatim medijima primijećeni su hiperkromni i hipokromni efekti.[1] Nastavno, metimazol se može određivati spektrofotometrijski u reakciji stvaranja Prusijskog plavila. U reakciji metimazola i fericijanida pri pH od 4.0 dolazi do *in situ* redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} i sukcesivne reakcije Fe^{2+} sa fericijanidom pri čemu dolazi do stvaranja Prusijskog plavila. Prusijsko plavilo ima maksimum apsorpcije pri 735 nm, te se prema toj vrijednosti u reakciji određuje koncentracija metimazola.[126] Za određivanje metimazola u farmaceutskim uzorcima može se koristiti jednostavna, brza metoda „fosforomolibdatne plave“ spektrofotometrije, koja ne treba skupe uređaje, a daje pouzdane rezultate. Metoda se temelji na mjerenju intenziteta plave boje fosforomolibdata (λ_{max} = 710 nm) nastale reakcijom amonijeva molibdata s kalijevim dihidrogenfosfatom i metimazolom u 4,23 M otopini sumporne kiseline pri čemu se stvara plavi fosforomolibdat, a metimazol se oksidira do metimazol disulfida.[127]

Od spektroskopskih metoda opisano je određivanje primjenom tehnike nuklearne magnetske rezonancije za djelatnu tvar i tabletnu formulaciju. Metoda je brza, točna i precizna, a omogućuje i specifičnu identifikaciju metimazola. Snimanje spektra vrši se u 10%-tnom diklormetanu ili u tetrakloruglji ku. Kao interni standard koristi se benzojeva kiselina.[1]

U farmaceutskim pripravcima metimazol se može analizirati potenciometrijski s otopinom živinog acetata, uz referentnu elektrodu od živinog-sulfata i amalgamiranu zlatnu ili srebrnu indikatorsku elektrodu. Metoda je brza i rezultati su reproducibilni.[128] Određeni tioli, uključujući metimazol, mogu se određivati kulometrijski direktnom titracijom sa elektrogenerirajućim Hg^{2+} ionima.[129]

Od kromatografskih analiza mogu se koristiti tehnike poput papirne, tankoslojene, tekućinsko plinske i tekućinske kromatografije. Clarke[130] je opisao nekoliko sustava otapala za identifikaciju metimazola papirnom kromatografijom poput acetatnog i fosfatnog pufera ili pak limunske kiseline uz UV-jodoplatinat kao vizualizacijski reagens.

Tankoslojnom kromatografijom određen je metimazol iz urina štakora nakon ekstrakcije kloroformom. Kao stacionarna faza koristi se silikagel G, a kao mobilna faza koristi se smjesa kloroform/metanol/voda (32:8:5), uz 2,6-diklorkinonkloramid kao reagens za vizualizaciju. Koncentracija metimazola određuje se dezintometrijski.[1]

Plinsko-tekućinskom kromatografijom metimazol se može određivati uz 10% apiezon L + 5% KOH na Chromosorb W koloni pri temperaturi od 100°C uz dušik kao plin nosilac.[1] Dodatno

opisane su metode za određivanje metimazola u serumu plinskom kromatografijom uz detekciju spektrometrijom masa.[131,132]

Provedena je komparacija tankoslojne kromatografije i plinsko-tekućinske u određivanju metimazola u urinu štakora. Autori su pokazali da je primijenjena metoda plinsko-tekućinske kromatografije osjetljivija, međutim zbog nestabilnosti smjese analiza se mora provesti unutar istog dana. Metoda tanskoslojne kromatografije uz denzitometrijsku kvantifikaciju pokazuje manju osjetljivost zbog interakcija sa endogenim tvarima međutim vremenski je pogodnija za rutinske analize.[133]

Tablica 4. Pregled izabranih analitičkih metoda za određivanje tireostatika, metimazola i njegovih metabolita.

Metoda	Analit	Matriks	Priprava uzorka	Literaturni citat
HPLC-ED	MET	Serum	Deproteinizacija i razrjeđenje	134
HPLC-UV	MET, Derivati tiuracila	Serum	LLE	135
HPLC-UV	MET, propiltiuracil	Plazma	LLE	136
HPLC-UV	SHMET	Farmaceutski produkt	Razrjeđenje	137
HPLC-UV	MEH	Urin kunića	Razrjeđenje	138
HPLC-UV	MTU, druge tiouree	Plazma	LLE	139
HPLC-UV	MTU	Plazma štakora	LLE, SPE	140
RP HPLC-UV	MET	Urin	Derivatizacija centrifugiranjem	141
RP HPLC	MET	Urin	Direktno	142
HPLC-UV	MET, MTU	Organi i mišići svinja	SPE	143
RP HPLC-DAD	MET, MTU, SHMET, MEH	Riblji homogenizat	SPE	111
HPLC-MS	MET i drugi tireostati	Tiroidna žlijezda i meso	SPE i derivatizacija	144

(Legenda: (HPLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti; (LLE) ekstrakcija tekuće-tekuće; (SPE) ekstrakcija na čvrstoj fazi; (MET), metimazol; (MTU), metiltiouracil; (KARB), karbimazol; (MEH), metilhidantoin; (SHMET), 2-merkaptoimidazol;).

Razvijene su mnoge metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za analizu metimazola u različitim uzorcima. Biološki uzorci koji sadrže metimazol poput plazme, mlijeka, životinjske hrane podvrgavaju se prekoncentiranju pomoću mikroekstrakcije i zatim se analiziraju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz ultravioletnu detekciju.[145] U urinu i mišićnom tkivu metimazol je analiziran primjenom tekućinske kromatografije združenom s masenom spektrometrijom. Uz ostale je tireostatike ekstrahiran iz urina sa dimetil-eterom nakon derivatizacije sa 3-jodbenzil-bromidom u bazičnom mediju, a iz mišićnog tkiva dobiven je denaturacijom i potom ekstrakcijom sa metanolom. Analiza uzoraka provedena je gradijentom elucijom na Nukleosilnoj C18 koloni.[146] Opisane su metode za određivanje

metimazola tekućinskom kromatografijom uz elektrokemijsku detekciju u serumu[134] kao i primjenu tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti spregnute sa tandem masenom spektrometrijom.[147,148] Tehnika tekućinske kromatografije primijenjena je na velikom broju uzoraka i raznolikim matricama s ciljem određivanja metimazola i drugih tireostatika, a tome u prilog idu i publikacije koje su sumirane u Tablici 4.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Karakterizacija metimazola prema farmakopeji

Pet kontrolnih brojeva sirovine metimazol (**1**), dobavljača Ueticon (Švedska) analizirano je prema metodama opisanim u Ph. Eur.[63] Ispitani parametri su osobine, identifikacija: a) određivanjem tališta, b) primjenom ultraviolentne spektroskopije ili c) tankoslojna kromatografija, zatim izgled otopine, sadržaj **1**, prisutnost srodnih tvari primjenom plinske kromatografije, teški metali, pH otopine, gubitak sušenjem te sulfatni pepeo. Rezultati na tri kontrolna broja prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Kakvoća djelatne tvari **1** prema Ph. Eur.[63]

Kontrolni broj		**A-123**	**B-123**	**C-123**
Izgled otopine (bistra bezbojna otopina)		Odgovara	Odgovara	Odgovara
Gubitak sušenjem (≤0,5 %)		0,2 %	0,2 %	0,2 %
Talište (143°C-145°C)		144°C	144°C	145°C
Teški metali (≤10 ppm)		<10 ppm	<10 ppm	<10 ppm
IR spektar (jednak standardu metimazola)		Odgovara	Odgovara	Odgovara
Sulfatni pepeo (≤0,1 %)		0,04 %	0,04 %	0,01 %
Sadržaj metimazola (98,0 %-101,0 %)		100,1 %	100,1 %	100,0 %
Onečišćenja	**A** (≤0,1 %)	n.d*	n.d	n.d
	B (≤0,1 %)	n.d	n.d	n.d
	C (≤0,1 %)	n.d	n.d	n.d
	Pojedinačno nepoznato (≤0,1 %)	≤0,1 %	≤0,1 %	≤0,1 %
	Ukupna onečišćenja (≤0,1 %)	≤0,1 %	≤0,1 %	≤0,1 %

*nd = nije detektirano

3.2. Određivanje topljivosti metimazola

Pokus topljivosti metimazola (**1**) proveden je u pH područjima 1,2; 2,0; 3,0; 4,5; 6,0; 6,8 i 8,0, a korištene puferske otopine pripremljene su prema tablici 6. Kruti reagensi, NaCl, KCl, KH_2PO_4 bili su *pro analysi* kvalitete i prethodno su posušeni na temperaturi od 110°C - 120°C kroz 1 sat, a destilirana voda je zagrijavana kroz 10 minuta i ohlađena kako bi se uklonio CO_2.

Tablica 6. Korišteni puferski sustavi i priprema otopina.

pH	Puferski sustav	Priprema otopina
1,2	HCl 0,2 M/NaCl 0,2 M	Pripremljeno 200 mL otopine (85,0 mL NaCl i 50,0 mL HCl I nadopunjeno do oznake), pH=1,22± 0,05
2,0	HCl 0,2 M	Pripremljeno 200 mL otopine (10,0 mL HCl i nadopunjeno do oznake), pH=2,00 ± 0,05
3,0	HCl 0,2 M	Pripremljeno 200 mL otopine (1,0 mL HCl i nadopunjeno do oznake), 3,00 ± 0,05
4,5	AcOH 2 M, Na_2Ac	Pripremljeno 500 mL otopine (14,0 mL AcOH I 1,49 g Na_2Ac, otopljeno i nadopunjeno do oznake), pH=4,5 ± 0,05
6,0	KH_2PO_4 0,2 M/NaOH 0,2 M	Pripremljeno 200 mL otopine (50,0 mL KH_2PO_4 i 5,6 mL NaOH i nadopunjeno do oznake), pH=6,0 ± 0,05
6,8	KH_2PO_4 0,2 M/NaOH 0,2 M	Pripremljeno 200 mL otopine (50,0 mL KH_2PO_4 i 22,4 mL NaOH i nadopunjeno do oznake), pH=6,8 ± 0,05
8,0	KH_2PO_4 0,2 M/NaOH 0,2 M	Pripremljeno 200 mL otopine (50,0 mL KH_2PO_4 i 46,1 mL NaOH i nadopunjeno do oznake), pH=8,0 ± 0,05

Zasićene otopine **1** pripremljene su otapanjem metimazola u definiranim puferskim sustavima (Tablica 6) uz miješanje. Miješanje je nastavljeno kroz 24 sata na temperaturi od 37°C. Otopine su zatim profiltrirane kroz membranski RC filter, veličine pora 0,2 µm. Otopina uzorka pripremljena je na način da je 1,0 ml uzorka razrijeđen s 100,0 mL vode. Dodatno je 1,5 mL tako pripremljene otopine prebačeno u tikvicu od 100 mL i razrijeđeno s vodom.

Poredbena otopina **1** pripremljena je u koncentraciji od 0,005 mg/mL.

Pripremljena otopina **1** i otopina uzorka snimljene su na UV-VIS spektrofotometru (Cary Varian) u području od 200 nm do 400 nm u kiveti debljine sloja 1 cm, uz vodu kao slijepu probu. Sadržaj **1** određen je primjerom jednadžbe [1], a parametri su kako slijede: X - količina **1** (mg/mL), A_{uz} - apsorbancija otopine uzorka, 1,5 - volumen uzorka, A_p - apsorbancija

poredbene otopine, F_{st} - sadržaj poredbene supstancije, m_{st} – masa standarda, $(100-W_{st})$ – sadržaj vode u poredbenoj supstanciji.

$$X= m_{st} \times F_{st} \times (100-w) \times A_{uz} / 1,5 \times 50 \times A_p \times 10 \qquad [1]$$

Dobiveni rezultati topljivosti prikazani su u Tablici 7, a dozni broj u Tablici 8.

Tablica 7. Topljivost metimazola pri fiziološki relevantnim pH područjima.

	pH 1,2 (mg/mL)	**pH 2,0 (mg/mL)**	**pH 3,0 mg/mL)**	**pH 4,5 (mg/mL)**	**pH 6,0 (mg/mL)**	**pH 6,8 (mg/mL)**	**pH 8,0 (mg/mL)**
Srednja vrijednost	254,339	269,061	244,479	296,139	212,771	219,553	318,372
Standarna devijacija	2,930	27,924	16,972	14,659	6,787	13,424	34,259

Tablica 8. Određivanje doznog broja **1** pri fiziološki relevantnim pH područjima.

pH područje	**pH 1,2**	**pH 2,0**	**pH 3,0**	**pH 4,5**	**pH 6,0**	**pH 6,8**	**pH 8,0**
Dozni broj (D_0)	$9,4 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^{-4}$

3.3. Metode spektroskopske karakterizacije

3.3.1. Infracrvena spektrofotomerija (IR)

Infracrveni spektri snimljeni su pomoću IR spektrofotometra (Perkin Elmer, Spectrum 100 s ATR jedinicom) bez prethodne obrade uzorka, uz prethodno snimanje pozadine u području od 4000 do 350 cm^{-1} s rezolucijom od 4 cm^{-1}. Spektri su vizualizirani primjenom programskog paketa Spectrum v.10.5.2 (Perkin Elmer), s dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost transmitancije (T) o valnom broju ($\tilde{\nu}$) izraženom u cm^{-1}.

3.3.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Jednodimenzionalni ^1H i ^{13}C (DEPT) NMR i dvodimenzionalni HSQC, HMBC spektri snimani su pomoću Bruker Avance AV 600 spektrometra opremljenog s 5 mm direktnom širokopojasnom krio-sondom sa z-gradijentnom zavojnicom uz podršku TopSpin 3.5 programskog paketa. Spektri ^1H i ^{13}C snimljeni su pri frekvenciji od 600,130 MHz, odnosno 150,903 MHz. Za ^1H i ^{13}C kemijske pomake kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan

(TMS – $Si(CH_3)_4$). Korišteni su pulsni slijedovi dostupni unutar programskog paketa TopSpin 3.5. Svi su spektri snimljeni pomoću standardnih Brukerovih impulsnih sekvenci na spojevima otopljenim u DMSO-d_6, toluenu-d_8, $CDCl_3$ i D_2O. Rezidualne ^1H i ^{13}C rezonancije iz deuteriranog otapala koriste se za referencu NMR spektra s metilnom rezonancijom TMS-a na 0,0 ppm. Eksperimenti s promjenjivom temperaturom provedeni su u rasponu -20°C do 25°C u toluenu-d_8 i 25°C-80°C u DMSO-d_6.

3.3.3. MALDI TOF/TOF

Spektri masa snimljeni su tehnikom masene spektroskopije visoke rezolucije (HRMS) – matricom potpomognuta ionizacija uz lasersku desorpciju/ionizaciju (MALDI) s analizatorom vremena leta (TOF) na masenom spektrometru 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer proizvođača Applied Biosystems s NdYAG laserom uz računalni program 4.000 Series Explorer 4.0. Analiza je provedena pri pozitivnom načinu snimanja uz intenzitet lasera od 4000, a snimane su mase od 50-1000 Da uz 1600 snimaka po spektru. Uzorak je pripremljen na način da je 1 µL uzorka pomiješan s 10 µL 5 mg / mL α-cijano-4-hidroksicimetne kiseline od čega je 1 µL uzorka naneseno na MALDI ploču. Kao kontrolni uzorak korištena je prazna matrica α-cijano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA). Kalibracija uređaja provedena je s ionima azitromicina i CHCA.

3.3.4. MS-QQQ

Spektri masa snimljeni su tehnikom masene spektroskopije s trostrukim kvadripol detektorom na masenom sepktrometru 6460 proizvođača Agilent Technologies s trostrukim kvadrupol detektorom i elektrosprej ionizacijom u pozitivnom i negativnom načinu snimanja, Analiza je provedena pri sljedećim parametrima: kapilarni napon 3,5 kV u pozitivnom i negativnom načinu rada, napon mlaznice 0,5 kV, temperatura izvora iona 300 °C, protok plina 5 L/min, tlak 45 psi, temperatura plina za sušenje 250 °C, a protok plina 11 L/min. Dušik je korišten kao plin u kolizijskoj ćeliji. Kolizijske energije bile su podešene od 0 V do 60 V. Svaki uzorak je analiziran u MS scan i MSMS načinu. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 4 µL.

3.4. Termalne metode

3.4.1. Termogravimetrijska analiza (TGA)

TGA podaci prikupljeni su na Mettler Toledo TGA/SDTA 851e sustavu. Uzorak je stavljen na unaprijed pripremljeni lončić od glinice i zagrijavan brzinom zagrijavanja 10K/min u temperaturnom rasponu 25–300 ° C. Mjerenje je provedeno pod strujom dušika pri protoku od 50 mL/min. Instrument je temperaturno kalibriran pomoću certificiranog $NiMn_3Al$ i niklovog standarda.

3.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Termogrami su snimljeni primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) na uređaju Mettler Toledo DSC1. U aluminijsku posudicu izvagano je 2,0-3,0 mg uzorka, zatvoreno s perforiranim poklopcem i zagrijavano od 25°C do 320°C brzinom od 10K/min u struji dušika uz protok od 55 mL/min. Termogrami su dodatno analizirani i obrađeni primjenom DSC 5 programskog paketa verzije 2. Standard indija korišten je za kalibraciju uređaja, a sama kalibracija provodila se prije i nakon mjerenja.

3.4.3. Termalna mikroskopija (HSM)

Termalna mikroskopija (HSM) provedena je pomoću Olympus BX51 mikroskopa u kombinaciji s vrućim postoljem Linkam THMS 600 i digitalnom video QImaging kamerom za snimanje slike. Mala količina uzorka stavljena je na satno staklo i promatrana s uvećanjem od 100x i djelomično polariziranom svjetlošću, dok se zagrijavala od temperature okoline brzinom od 10°C/min.

3.5. Kromatografske metode

3.5.1. UHPLC

Za analizu uzoraka binarnih i ternarnih smjesa korišten je tekućinski kromatograf Agilent 1290 Infinity s apsorpcijskim detektorom koji čini niz fotodioda (engl. *DAD – Diode Array Detector*) upravljan *Empower 2* programskim paketom. Korištena je komercijalno dostupna analitička kolona Zorbax SB-C18, Rapid Resolution dimenzija 150 mm x 4,6 mm sa submikronskim

česticama od 3,5 nm. Temperatura kromatografske kolone bila je 25°C, a automatskog injektora 10°C. Korištene su pokretne faze jednostavnog sastava – amonijev-acetat (pokretna faza A) te čisti acetonitril (pokretna faza B). Odvajanje sastojaka nanesenih na kromatografsku kolonu ostvareno je gradijentnim ispiranjem uz protok pokretne faze 0,6 mL min^{-1}. Na kolonu je najčešće injektirano 10 µL otopine uzorka. Otopina amonijevog acetata pripremljena je otapanjem 2,5 g amonijevog acetata u 1000 mL vode, nakon čega je slijedila filtracija preko membranskog najlon filtera veličine pora 0,2 mm. Otopina standarda metimazola pripremljena je otapanjem 5,0 mg metimazola u 50 mL metanola, a otopina onečišćenja C (**4**) otapanjem 2,5 mg farmakopejskog standarda onečišćenja C (serija: 00ITC4) u 10 mL metanola. Uzorak je pripremljen na način da je 5 mg uzoraka izmiješano u 25 mL otopine metanol:voda=1:1 pomoću vortex miješalice u trajanju od 2 minute i nadopunjen s dodatnih 25 ml otopine metanol:voda=1:1 te filtriran kroz celulozni filter i analiziran prema uvjetima opisanim u Tablici 9.

Tablica 9. Gradijentni program ispiranja metode UHPLC.

Vrijeme / min	**Udio pokretne faze A / %**	**Udio pokretne faze B / %**
0,0	95	5
7,0	**95**	5
30,0	20	80

3.5.2. LC-MS

Za karakterizaciju onečišćenja **21** i **22** korišteni su uzorci Athyrazol tableta k.br.: D-123, i pripremljeni placebo smjese oznake P-123, zatim radni standard metimazola K.Br.: RST-123 i standard onečišćenja C metimazola Y0000373; serija: 00ITC4. Analiza pomoću tehnike LC-MS je provedena na UHPLC sustavu Agilent 1290 Waters Acquity UPLC s DAD detektorom spregnutim s Agilent 6540 QTOF spektrometrom masa, uz podršku *Mass Hunter* računalnog sustava. Korištena je analitička kolona Zorbax SB-C18 Rapid Resolution dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica i 3,5 µm. Temperatura kolone bila je 25°C. Kao polarna pokretna faza korištena je otopina amonijevog acetata, a acetonitril kao nepolarna pokretna faza. Tijekom analize pri protoku pokretne faze od 0,6 mL min^{-1} korišten je gradijentni program ispiranja (Tablica 10). Spektri masa onečišćenja **21** i **22** snimljeni su uz pozitivnu i negativnu ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *ESI*) i parametre navedene niže (Tablica 11). Otopina amonijevog acetata pripremljena je otapanjem 2,5 g amonijevog acetata u 1000 mL vode, nakon čega je

slijedila filtracija preko membranskog najlon filtera veličine pora 0.2 μm. Otopina standarda metimazola pripremljena je otapanjem 5,0 mg metimazola u 50 mL metanola, a otopina onečišćenja C otapanjem 2,5 mg onečišćenja u 10 mL metanola. Uzorak je pripremljen na način da je 5 tableta izmješano u 25 mL otopine metanol:voda=1:1 pomoću vortex miješalice u trajanju od 2 minuta. Pripremljena suspenzija je nadopunjena s dodatnih 25 mL otopine metanol:voda=1:1 i filtrirana kroz celulozni filter i analiziran prema uvjetima opisanim u Tablici 10.

Tablica 10. Gradijentni program LC-MS metode korišten za analizu onečišćenja **21** i **22**.

Vrijeme / min	Udio pokretne faze A / %	Udio pokretne faze B / %
0,0	95	5
7,0	**95**	5
30,0	20	80
31,0	2	98
35,0	2	98
36,0	95	5
40,0	95	5

Maseni spektri snimljeni su primjenom uređaja Agilent QTOF prema uvjetima opisanim u Tablici 11.

Tablica 11. MS parametri LC metode.

Parametar MS	Vrijednost
Protok dušika	10 L/min
Temperatura dušika	325°C
Protok pomoćnog plina	9 L/min
Temperatura pomoćnog plina	350°C
Napon kapilare	3500 V
Raspršivač	50 psi

3.5.3. Ionska kromatografija

Mjerenja ionske kromatografije provedena su na uređaju proizvođača Thermo (Waltham, MA, USA). Korištena je IonPac AS14A (3x150 mm) kolona uz 8 mM K_2CO_3 kao eluens uz protok od 0.5 mL/min, a ioni su detektirani upotrebom konduktometrijskog detektora. Volumen

injektiranog uzorka iznosio je 50 µL. Kao standardi korištene su komercijalno dostupne otopine proizvođača Sigma Aldrich u koncentraciji od 1000 µg/mL i to za određivanje natrija, klorida i jodida korištene su pripadajuće otopine natrijevih, kloridnih i jodidnih iona. Uzorci su pripremljeni na način da je finalna koncentracija iznosila 0,1 mg/mL.

3.5.4. Plinska kromatografija

Plinskom kromatografijom određen je postotak acetona na plinskom kromatografu Varian Star 1, uz podršku programa GC WorkStation verzija 6.41 uz FID detektor. Korištena je analitička kolona ZB-624 duljine 30 m x 0,23 i veličine čestica 1,8 µm. Temperatura kolone bila je 250°C. Kao plin nosioc korišten je dušik pri tlaku od 4,3 psi i protoku 30 mL/min. Kao pomoćni plin korišten je vodik protoka 23 mL/min. Kao otapalo za pripremu uzoraka korišten je DMSO, a volumen injektiranja bio je 1 µL. Sadržaj acetona određen je u odnosu na standard acetona pri RT 4,254 min,

3.6. Difrakcijske metode

3.6.1. Difrakcija rentgenskog zračenja na polikristaliničnom uzorku (PXRD)

Mjerenja difrakcijskih intenziteta istraživanih uzoraka izvedena su na rentgenskom difraktometru za praškaste (ili polikristalne) uzorke PANalytical X'Pert Pro opremljenom s detektorom X'celerator model PW3050/60 u Bragg-Brentano geometriji na sobnoj temperaturi pomoću bakrenog Kα zračenja Uzorak je pripremljen postavljanjem uzorka na ploču (bez pozadine) i skeniran od 3 do 40 2θ° koristeći sljedeće parametre akvizicije: napon generatora 45 kV, struja generatora 40 mA, veličina koraka 0,0167 °, brzina skeniranja 0,011°/ drugo, broj koraka 2214 i ukupno vrijeme prikupljanja 60 min, brzina skeniranja 0,05°/sekundu, broj koraka 2214 i ukupno vrijeme prikupljanja 13 min.

3.6.2. Rentgenska strukturna analiza

Odabrani su odgovarajući monokristali i montirani u zraku na tanka staklena vlakna. Intenziteti difrakcijskih maksimuma prikupljeni su pomoću četverokružnog difraktometra Oxford Diffraction Xcalibur kapa geometrije s CCD detektorom Xcalibur Sapphire 3 pri temperaturi od 150K do 296K uz korištenje molibdenskog zračenja MoKα (λ = 0,71073 Å). Mjerenja i

redukcija podataka izvedeni su pomoću programa CrysAlisPro (verzija 1.171.37.33).[149] Istim je programom, pomoću multi-scan metode, napravljena i korekcija podataka zbog Lorentz-polarizacijskog faktora i apsorpcije. Kristalne strukture riješene su pomoću direktnih metoda implementiranih u program SHELXS[150] te su u istom programu i utočnjene metodom najmanjih kvadrata na temelju F2 vrijednosti uzimajući u obzir sve reflekse. Računi vezani uz molekulsku geometriju, provjera izbora prostornih grupa i analiza intermolekulskih interakcija napravljeni su pomoću programa PLATON.[151] Prikazi molekulskih struktura načinjeni su pomoću programa ORTEP-3[152] i MERCURY (verzija 4.1.0).[153] Kristalografski podaci za snimljene strukture dani su u Poglavlju 4.3. i Tablici 34 (Poglavlje 8)

3.7. Sintetske studije

Metimazol (**1**) 99% [CASRN: 60-56-0], Ph Eur kvalitete, dobavljen od proizvođača Ueticon (sadržaj vode 0,4%), 1,2-dikloretan (Fisher) (sadržaj vode, 0,02 %), aceton (Sigma) (sadržaj vode, 0,2%), Trietilamin (Sigma Aldrich), Srebro tetrafluor borat, 99 % (Alfa Aesar), aceton (Carlo Erba) dok su mravlja kiselina, natrijev sulfat, bezvodni, acetonitril, dimetilformamid, natrijev klorid, natrijev hidroksid, natrijev hidrogenkarbonat, kalijev hidroksid i suhi metanol kupljeni od Mercka (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) a voda je dobivena vlastitim procesom proizvodnje (Thornton 2000 CRS) i bila je HPLC kvalitete. Diklormetan i acetonitril su posušeni iznad bezvodnog natrijevog sulfata i destilirani prije upotrebe. Sva ostala otapala su destilirana prije upotrebe. Sve ostale korištene kemikalije bile su analitičke kvalitete. Mjerenja pH provedena su pomoću Mettler Seven Multi pH metra, a prije mjerenja kalibracija je provedena u šest točaka. Vaganja su provedena na Mettlerovoj vagi i kalibrirane dnevno prema internom programu. Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (NH_3, aq 25%: izopropanol: toluen = 0,5:2,5:7) ili (diklormetan: aceton = 8: 2) ili (diklormetan: metanol: mravlja kiselina = 8:1:0,5) ili (1,2-dikloretan:metanol=9:1) na pločama od silika gela (Kieselgel G60 sa (F_{254}) ili bez fotoindikatora, Merck KGaA).

3.7.1. 1,1-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2b**)

Metoda A) Metimazol (**1**, 500 mg, 4,38 mmol) otopljen je u 50 mL diklormetana. Otopina je ostavljena bez miješanja 90 dana u mraku pri sobnoj temperaturi u vlagom nekontroliranoj atmosferi. Istaloženi produkt je odsisan u vakumu i ispran nekoliko puta hladnim

diklormetanom te posušen na zraku pri čemu se dobiva bijeli 1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2b**, 282 mg, 41,0%), t_t DSC_{onset} 130°C, *Rf*=0,77 (diklormetan:aceton=8:2); *Rf*=0,71 (NH_3(aq):2-propanol:toluen=0,5:2,5:7). MS-QTOF: $[M+H-2HCl]^+$ 240,900, $C_9H_{12}N_4S_2$. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H), 3,82, N-CH= (d, 2H) 7,73, *J* = 1,8 Hz, N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 2H) 7,86, *J* = 1,8 Hz, S-CH_2 (s, 2H) 5,10. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): N-CH_3 35,1, N-CH= 121,9, N(CH_3)-<u>C</u>H= 125,9, C(S) 137,1, S-CH_2 34,59. Ionska kromatografija: eksperimentalno određen postotak Cl-iona (18 %) odgovarao je teoretskoj vrijednosti (18 %).

Metoda B) Metimazol (**1**, 500 mg, 4,38 mmol) otopljen je u 50 mL diklormetana. Otopina je ostavljena bez miješanja 90 dana na svjetlu pri sobnoj temperaturi u vlagom nekontroliranoj atmosferi. Istaloženi produkt je odsisan u vakumu i ispran nekoliko puta hladnim diklormetanom te posušen na zraku pri čemu se dobiva bijeli 1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2b**, 303 mg, 44,0%), t_t DSC_{onset} 130°C. NMR spektri i difraktogrami praha tako pripravljenog uzorka bili su identični spektrima i difraktogramu uzorka **2b** dobivenog po Metodi A.

Metoda C) Diklormetanski solvat **2c** (100 mg, 0,25 mmol) sušen je pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Dobiven je dihidroklorid **2b** (78 mg, 99,0 %) t_t DSC_{onset} 130 °C) u formi amorfnog praha.

3.7.2. Diklormetanski solvat 1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorida (**2c**)

Metimazol (**1**, 500 mg, 4,38 mmol) otopljen je u 50 mL diklormetana. Otopina je ostavljena bez miješanja 90 dana u mraku pri sobnoj temperaturi u vlagom nekontroliranoj atmosferi. Istaloženi produkt je odsisan u vakumu i ispran nekoliko puta hladnim diklormetanom i osušen među listovima filter papira dajući bezbojne kristale 1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorida u formi diklormetanskog solvata (**2c**, 359 mg, 41,0 %) koji na zraku brzo prelaze u bijelu boju. *Rf*=0,77 (diklormetan:aceton=8:2); *Rf*=0,71 (NH_3(aq):2-propanol:toluen=0,5:2,5:7). Zbog brzog raspada u bijeli **2b** spektroskopska mjerenja nisu provedena ali je struktura potvrđena rentgenskom strukturnom analizom. Monokristali za analizu izdvojeni su direktno iz diklormetana.

3.7.3. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid tetrahidrat (**3b**)

Metoda A) Metimazol (**1**, 100 mg, 0,87 mmol) otopljen je u 10 mL 1,2-dikloretana. Otopina je ostavljena 15 dana bez miješanja u mraku na sobnoj temperaturi u vlagom nekontroliranoj atmosferi. Istaloženi produkt je odsisan u vakumu i ispran nekoliko puta s hladnim 1,2-dikloretanom, dajući 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio] etan dihidroklorid tetrahidrat (**3b**, 53 mg, 31,0 %) u obliku bezbojnih pločastih kristala, t_t DSC_{onset} 208°C, *Rf* = 0,60 (NH_3(aq):2-propanol:toluen=0,5:2,5:7), MS-QTOF: $[M+H-2HCl]^+$ 255,0743, $[M-2HCl]^+$ 254,066, $C_{10}H_{14}N_4S_2$. 'H NMR (D_2O, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H), 3,822, N-CH= (d, 2H) 7,460, *J* = 2,1 Hz, N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 2H) 7,503, *J* = 2,1 Hz, S-CH_2 (s, 4H) 3,260. ^{13}C NMR (D_20, 151 MHz/ppm): N-CH_3 35,223, N-CH= 120,980, N(CH_3)-<u>C</u>H= 125,695, C(S) 138,521, S-CH_2 34,588, Čistoća (HPLC): 98%, RRT: 20,518. Ionska kromatografija: eksperimentalno određen postotak iona Cl (19%) odgovarao je teoretskoj vrijednosti (18 %) unutar eksperimentalne pogreške. Struktura **3b** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

Metoda B) U 10 mL 1,2-dikloretna otopljen je **1** (100 mg, 0,87 mmol). Otopina je ostavljena 15 dana bez miješanja na dnevnom svjetlu i sobnoj temperaturi u vlažnom okruženju bez kontrole. Istaloženi produkt je odsisan u vakumu i ispran nekoliko puta hladnim 1,2-dikloretanom, dajući dihidroklorid tetrahidrat **3b** (52 mg, 30,0%) u obliku bezbojnih pločastih kristala, t_t DSC_{onset} 208°C. NMR spektri i XRPD difraktogram tako pripremljenog uzorka bili su identični spektrima i difraktogramu uzorka **3b** dobivenom metodom A). Monokristali su izdvojeni direkno iz dikloretana.

3.7.4. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3a**)

Metoda A) Dihidroklorid tetrahidrat **3b** (300 mg) otopljen je u 30 mL vode i neutraliziran s 1 M otopinom Na_2CO_3 do pH 7,0, nakon čega je slijedila ekstrakcija diklormetanom (3 x 10 mL), ispranje zasićenom otopinom NaCl i sušenje s bezvodnim Na_2SO_4. Uparivanjem otapala u vakuumu dobiven je sirovi 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio] etan (**3a**, 160 mg, 84,0 %) u obliku bijelog praha. Rekristalizacijom suhog sirovog **3a** iz suhog diklormetana u uvjetima niske vlažnosti dobiven je čisti bezvodni **3a**, t_t DSC_{onset} 89°C (Literatura: 88-90°C)[43]; ^1H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H) 3,569, N-CH= (d, 2H) 7,240 *J* = 1,2 Hz, N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 2H) 6,940 *J* = 1,2Hz, S-CH_2 (s, 4H) 3,208; ^{13}C NMR (DMSO-*d6*, 151 MHz/ppm): N-CH_3 32,791, N-CH= 123,291, N(CH_3)-<u>C</u>H= 128,534, C(S) 139,232, S-CH_2 33,297. Struktura **3a** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

Metoda B) Dihidrat **3c** (100 mg) osušen je pod sniženim tlakom od 200 mbar pri 55°C kroz 60 minuta i dobiven je bezvodni oblik **3a** (71 mg, 81,0 %). DSC termogram i XRPD difraktogram tako dobivenog uzorka bili su identični termogramu i difraktogramu uzorka **3a** dobivenom metodom A.

Metoda C) 2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 50 mg, 0,28 mmol) i metimazol (**1**,33 mg, 0,283 mmol) otopljeni su u acetonitrilu (7 mL) i mravljoj kiselini (w = 37 %, 0,0287 mL, 0,28 mmol) i uz miješanje kuhano u povrat kroz 43 sata. Smjesa je uparena u vakuumu, razrijeđena vodom (7 mL), neutralizirana s 1 M NaOH i ekstrahirana tri puta s diklormetanom. Organski sloj je posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata, uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silika gela (veličina pora 0.063-0.2 mm) uz diklormetan: aceton 8:2 kao eluens, dajući pritom 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan u obliku bijele kristalne krutine (**3a**, 18 mg, 84,0 %). Izdvojena je frakcija neproreagiranog 2-[(2-kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazola (**6**, 35,1 mg,). Podaci o *Rf* vrijednosti i talištu odgovaraju prije u tekstu prikazanim podacima.

3.7.5. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidrat (**3c**)

Metoda A) Spoj **3a** dobiven neutralizacijom dihidroklorid tetrahidrata **3b** (160 mg) otopljen je u smjesi aceton/voda (1:1). Nakon duljeg stajanja otopine bez miješanja pri sobnoj temperaturi, dobiveni su čisti kristali dihidrata **3c** (133 mg, 73,0 %), t_t DSC_{onset} 65°C. Struktura **3c** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

Metoda B) 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3a**, 300 mg) otopljen je u smjesi aceton/voda (1:1). Nakon duljeg stajanja otopine bez miješanja na sobnoj temperaturi, dobiveni su čisti kristali dihidrata oblika **3c** (238 mg, 70,0 %). DSC termogram i XRPD difraktogram tako dobivenog uzorka bili su identični termogramu i difraktogramu **3c** uzorka dobivenom metodom A.

3.7.6. 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid (**3d**)

Metimazol (**1**, 1000 mg, 8,76 mmol) otopljen je u suhom DCE (10 mL) i uz miješanje kuhan u tijekom 11 sati. Filtracijom u vakuumu odijeljen je sirovi kristalni produkt, koji je trituriran s hladnim DCE, filtriran u vakuumu, ispran nekoliko puta s hladnim DCE i posušen pri 102°C uz vakuum (350 mbar) tijekom 2 sata. Dobiveni bijeli produkt (600 mg) analiziran je NMR-om

i utvrđeno je da prema NMR analizi, uz 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid (**3d**, 80% u smjesi, 33,5%) sadrži i 7-metil-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**, 20% u smjesi, 7,8%), koji ovdje nije izoliran, nego tek tijekom izomerizacije 2-[(2-kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazola (**6**). Suhi ostatak je pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silika gela (veličina pora 0,063-0,2mm) uz diklormetan:aceton:metanol 7:2:1 kao eluens, pri čemu se dobiva čista bezbojna krutina 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid (**3d**, 480 mg, 33,5%), t_t DSC_{onset} 217°C. TLC: *Rf* = 0,60 (NH_3(aq):2-propanol:toluen = 0,5:2,5:7), MS-QTOF: $[M+H-2HCl]^+$ 255,0743, $[M-2HCl]^+$ 254.066, $C_{10}H_{14}N_4S_2$. ^{1}H NMR (D_2O, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H) 3,82, S-CH_2- (s, 4H) 3,26, N-CH= (d, 2H) 7,46, *J* = 1,8 Hz, -N(CH_3)-CH= (d, 2H) 7,50, *J* = 2,2 Hz. ^{13}C NMR (D_2O, 151 MHz/ppm): N-CH_3 34,6, S-CH_2- 34,0, N-CH= 120,5, -N(CH_3)-CH= 125,1, (S) 138,0. Čistoća (HPLC): 98%, RRT: 20,518.

3.7.7. 2-[(Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**)

Metoda A) Metimazol (**1**,100 mg, 0,87 mmol) otopljen je u 10 mL DCE. Otopina je ostavljena bez miješanja 15 dana u mraku pri sobnoj temperaturi u okolini gdje vlaga nije kontrolirana. Istaloženi produkt **3b** izdvojen je vakum filtracijom, a matična otopina je uparena pri sniženim tlakom i pročišćena kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan:aceton 8:2 kao eluens pri čemu je izoliran čisti 2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 12 mg, 12,1 % izračunato na proreagirani **1**) u obliku bezbojnog ulja. TLC: *Rf* = 0,76 (dikloretan:aceton = 8: 2), *Rf* = 0,66 (NH_3(aq):2-propanol:toluen=0,5:2,5:7), MS-QTOF: m/z: $[M+H]^+$ 177,0266, $C_6H_9N_2SCl$. 'H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H) 3,58, S-CH_2- (d, 2H) 3,33, *J* = 7,2 Hz, -CH_2-Cl (d, 2H) 3,81, *J* = 7,3 Hz, =N-CH= (d, 1H) 7,26, *J* = 1,1 Hz, -N (CH_3)-CH= (d, 1H) 6,95, *J* = 1,3 Hz. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 33,3, S-CH_2-35,7, -CH_2-Cl 43,7, =N-CH= 129,1, -N(CH_3)-CH= 123,9, C(S) 139,6. Dodatno kolonskom kromatografijom izdvojen je neproreagirani i TLC čist, **1** (36 mg, 36,0 %). Talište (DSC, početak) 145°C (lit. 144-147°C[1]).

Metoda B) Metimazol (**1**, 100 mg, 0,87 mmol) i mravlja kiselina (0,12 mL, 3,18 mmol) otopljeni su u DCE (10 mL) i kuhani u povrat tijekom 17 sati. Smjesa je uparena u vakuumu, razrijeđena vodom (10 mL), neutralizirana s 1M NaOH i ekstrahirana tri puta s diklormetanom. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata, uparen pri sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom na koloni silika gela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz

diklormetan:aceton 8:2 kao eluens pri čemu je dobiven 2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 113 mg, 73,5%) u obliku bezbojnog ulja i 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3a**, 27 mg, 24,2%) u obliku bijelog kristalnog produkta. NMR i MS podaci odgovaraju već prije navedenim u tekstu za **3a** i **6**.

Metoda C) Metimazol (**1**, 1000 mg, 8,76 mmol) otopljen u suhom DCE (10 mL) i uz miješanje kuhan je u povrat tijekom 11 sati. Filtracijom u vakuumu odijeljen je sirovi ostatak, a matičnica je dalje uparena u vakuumu i pročišćena kolonskom kromatografijom na stupcu silika gela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan:aceton 8:2 kao eluens. Tako je dobiven, 2-[(2-kloretil)sulfanil]-1-metil-1*H*-imidazola (**6**, 800 mg, 51,7%) u obliku bezbojnog ulja. Dobiveni podaci NMR -a bili su u skladu s prethodno navedenim u tekstu.

3.7.8. 7-Metil-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**)

Metoda A) 2-[(Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 100 mg, 0,56 mmol) čuvan je tijekom 21 dan pri 25°C/60%RV. Dobiveni kristalni produkt trituriran je hladnim diklormetanom, izdvojen vakum filtracijom, ispran nekoliko puta s hladnim diklormetanom pri čemu je dobiven 7-metil-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**) u obliku igličastih kristala (98 mg, 98,0%), t_t DSC_{onset} 241°C,. TLC: *Rf* = 0,49 (diklormetan:metanol: mravlja kiselina = 8:1:0,5), ESI MS-QTOF: $[M-Cl]^+$ 141,0485 , $C_6H_9N_2SCl$. ^1H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H) 3,72, S-CH_2- (m, 2H) 4,16-4,26, N-CH_2 (t, 2H) 4,50, *J* = 7,7 Hz , N-CH= (d, 1H) 7,73, *J* = 2,2 Hz, -N(CH_3) -CH= (d, 1H) 7,62, *J* = 2,0 Hz. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): N-CH_3 36,3, S-CH_2- 39,0, N-CH_2 49,5, N-CH= 120,2, -N(CH_3)-CH= 127,6 C(S) 150,2. Ionska kromatografija: eksperimentalno određen postotak iona Cl (19%) odgovarao je teoretskoj vrijednosti (20 %) unutar eksperimentalne pogreške. Struktura **7a** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

Metoda B) 2,3-Dihidro-1-kloretil-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion (**9**, 50 mg, 0,28 mmol) svježe pročišćen prije pokusa kolonskom kromatografijsom na stupcu silika gela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan:aceton 8:2 kao eluens. Čisti uzorak je zatim otopljen u DMSO-d_6 (600 µL) pri sobnoj temperaturi i sniman ^1H NMR-om. Nakon 8 sati uzorak sadrži 49% **9** i 51% **7a** što upućuje na brzu izomerizaciju. Nakon 18 sati u protonskom spektru prisutni su samo signali **7a** čime se potvrđuje potpuna izomerizaciju od **9** u **7a**.

Metoda C) Metimazol (**1**, 1000 mg, 8,76 mmol) otopljen je u suhom DCE (10 mL) i uz miješanje kuhan u povrat tijekom 11 sati. Filtracijom u vakumu odjeljen je sirovi ostatak koji je trituriran s hladnim dikloroetanom, filtriran u vakumu, ispran nekoliko puta s hladnim 1,2-dikloroetanom i posušen pri 102°C tijekom 2 sata (pri 350 mbar). Sirovi bijeli ostatak (600 mg) analiziran je NMR-om i utvrđeno je da prema NMR analizi, uz 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**, 20 % u smjesi, 7,8 %) sadrži i **3d**, (80% u smjesi, 33,5%), no **7a** nije izoliran. NMR spektri za **7a** snimljeni u D_2O bili su u skladu s prethodno opisanim, u DMSO-d_6 (vidi pod metoda A). ^{1}H NMR (D_2O, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H) 3,62, S-CH_2- (t, 2H) 4,13, J = 7,7 Hz, N-CH_2 (t, 2H) 4,43, J = 7,7 Hz, N-CH= (d, 1H) 7,31, J = 2,2 Hz, -N(CH_3)-CH= (d, 1H) 7,2, J = 2,2 Hz. ^{13}C NMR (D_2O, 151 MHz/ppm): N-CH_3 35,2, S-CH_2- 48,6, N-CH_2 37,1, N-CH= 118,6, -N(CH_3)-CH= 126,2 C(S) 150,4.

3.7.9. 7-Metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum tetrafluoroborat (**7b**)

7-Metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**, 115 mg, 0,65 mmol) otopljen je u metanolu (10 mL) i u otopinu dodan je u obrocima uz miješanje srebro tetrafluoroborat (126 mg, 0,65 mmol), a miješanje je nastavljeno tijekom narednih 60 minuta. Koloidni precipitat filtriran je preko 0,2 µm PTFE filtera, a filtrat je uparen do suhog u vakuumu pri čemu je dobiven 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum tetrafluoroborat (**7b** 145 mg, 97,7%) u obliku bezbojnih igličastih kristala, t_t DSC_{onset} 135°C, TLC: *Rf* = 0,55 (diklormetan:metanol:mravlja kiselina = 8:1:0,5) EI-MS-QQQ: $[M]^+$140,9. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H) 3,70, S-CH_2- (t, 2H) 4,20, N-CH_2 (t, 2H) 4,47, N-CH= (d , 1H) 7,68 J = 2,2 Hz, -N(CH_3)-CH= (d, 1H) 7,56, J = 1,8 Hz. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): N-CH_3 35,8, S-CH_2- 38,4, N-CH_2 49,0, N-CH= 119,7, -N (CH_3)-CH = 127,1, C(S) 150,4. Struktura **7b** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

3.7.10. Bis-{2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebro(I)tetrafluoroborat (**10**)

2-[(Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 40 mg, 0,23 mmol) otopljen je u metanolu (7 mL) i uz miješanje u dijelovima dodan je srebrni tetrafluoroborat (44 mg, 0,23 mmol) pod dušikom pri sobnoj temperaturi. Sutradan je istaloženi produkt izdvojen vakum fitracijom i ispran nekoliko puta hladnim 1,2-dikloretanom (15 mL) dajući bezbojne kristale bis-{2-[(kloroetil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebro(I)tetrafluoroborata (**10**, 61 mg, 96,8%), t_t DSC_{onset} 133°C. ^{1}H NMR

(DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H) 3,79, S-CH_2- (t, 4H) 3,35, CH_2-Cl (t, 4H) 3,75, N-CH = (d, 2H) 7,57, -N(CH_3) -CH= (d, 2H) 7,19. Struktura **10** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

3.7.11. 2,3-Dihidro-1-kloretil-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion (**9**)

7-Metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**, 100 mg, 0,56 mmol) otopljen je u acetonitrilu (10 mL) i kuhan u povratu tijekom 5 sati. Tada je praćenjem reakcije TLC-om uočena djelomična konverzija **7a** u 1-kloretil-2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion (**9**). Zagrijavanjem smjese tijekom dodatnih 5 sati nisu uočene promjene na kormatogramu. Smjesa je tada razrijeđena vodom (10 mL) i zasićenom otopinom natrijevog klorida te ekstrahirana diklormetanom. Organski sloj je osušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pod sniženim tlakom pri čemu se dobivaju TLC čisti bezbojni kristali 2,3-dihidro-1-kloroetil-3-metil-1*H*-imidazol-2-tiona (**9**, 25 mg, 25,0 %), t_t DSC_{onset} 65°C. TLC: *Rf* = 0,97 (diklormetan:aceton = 8:2). EI-MS-QQQ: $[M+H]^+$ 177,6. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6/ppm): N-CH_3 (s, 3H) 3,47, CH_2-Cl (t, 2H) 3,96, *J* = 6,1, N-CH_2 (t, 2H) 4,27, *J* = 5,9 Hz, =CH-N-CH_3 (d, 1H) 7,16, *J* = 2,6 Hz, CH_2-N-CH= (d, 1H) 7,20, *J* = 2,2 Hz, ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6/ppm): N-CH_3 34,3, CH_2-Cl 41,7, N-CH_2 48,4, =CH-N-CH_3 118,2, CH_2-N-CH= 118,0, C(S) 161,9.

3.7.12. 2,3-Dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tioetil]-1*H*-imidazol-2-tion (**11**)

Otopina 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-b]tiazol-4-ijum klorida (**7a**, 100 mg, 0,56 mmol) i metimazola (**1**, 64 mg, 0,56 mmol) u acetonitrilu (10 mL) kuhana je u povrat tijekom 10 sati. Smjesa je zatim uparena pod sniženim tlakom, kruti ostatak je otopljen u vodi (10 mL), neutraliziran s 1M NaOH te ekstrahiran s diklorometanom. Organski sloj je posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata, uparen u vakuumu i pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silika gela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan/aceton 8:2 kao eluens. Nakon uparavanja izdvojene frakcije pod sniženim tlakom dobivaju se bijeli kristali TLC čistog 2,3-dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tioetil]-1*H*-imidazol-2-tion (**11**, 28 mg, 19,4%) Razlog niskog prinosa je stvaranje ravnoteže između **7a** i **9**, pri čemu samo cca. 20-25% **9** može stupiti u reakciju s **1**, t_t DSC_{onset} 101,7°C. TLC: *Rf* = 0,23 (diklormetan: aceton = 8:2), *Rf* = 0,61 (diklormetan:metanol:mravlja kiselina = 8:1:0,5). EI-MS-QQQ: $[M+ H]^+$ 255,0, ^{1}H NMR (600

MHz, DMSO-d_6/ppm): N-(CH_3)-CS- (s, 3H) 3,58, S-CH_2- (t, 2H) 3,31, J = 6,6 Hz, C(S)-N-CH_3 (s, 3H) 3,46, N-CH_2 (t, 2H) 4,15, J = 6,6 Hz, N-(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,12,, J = 2,2 Hz, CH-N-CH_2 (d, 1H,) 6,97, J = 2,2 Hz, CH-N = (d, 1H) 6,97, J = 1,1 Hz, C<u>H</u>-N-CH_3 (d, 1H) 7,27, J = 1,5 Hz. ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6/ppm): C(S)-N-CH_3 34,3, S-CH_2 31,7, N-(CH_3)-CS- 32,9, N-CH_2 41,6, N-(CH_3)-CH= 118,1, CH-N-<u>C</u>H_2 117,7, CH-N = 128,6, CH-N-(<u>C</u>H_3)-CS- 123,5, S-CH_2- 138,1, C(S) 161,4. Struktura **11** potvrđena je rentgenskom difrakcijom na monokristalu.

3.7.13. 1,2-Bis(2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)etan (**12**)

Metoda A) 2,3-Dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tioetil]-1*H*-imidazol-2-tion (**11**, 50 mg, 0,20 mmol) zagrijavan je u pješčanoj kupelji pri temperaturi od 170°C tijekom 10 sati. Smjesa je otopljena u smjesi diklormetan:aceton = 8:2 i pročišćena kolonskom kromatografijom na stupcu silika gela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan:aceton = 8:2 kao eluens. Uparavanjem izabranih frakcija u vakuumu dobivaju se crveni kristali TLC čistog 1,2-bis(2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)etana (**12**, 44 mg, 88,0 %), t_t DSC_{onset} 195°C (Literatura 194-195°C[42]). TLC: *Rf* = 0,59 (diklormetan:aceton = 8:2), *Rf* = 0,76 (diklormetan:metanol:mravlja kiselina = 8:1:0,5). EI-MS-QTOF: $[M+H]^+$ 254,37. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H), 3,45, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,08, J = 2,2 Hz, CH_2-N-C<u>H</u>= (d, 1H) 6,83, J = 2,2 Hz, N-CH_2 (s, 4H) 4,31. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): N-CH_3 34,4, -N(CH_3)-<u>C</u>H= 118,4, CH_2-N-<u>C</u>H= 117,2, N-CH_2 45,1, C(S) 161,7.

Metoda B) 1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3a**, 50 mg, 0,20 mmol) zagrijavan je u pješčanoj kupelji pri temperaturi od 170°C tijekom 17 sati. Smjesa je otopljena u smjesi diklormetan:aceton=8:2 i pročišćena kolonskom kromatografijom na stupcu silika gela (veličina pora 0,063-0,2mm) uz diklormetan:aceton=8:2 kao eluens. Uparavanjem izabranih frakcija u vakuumu dobivaju se crveni kristali TLC čistog 1,2-bis (2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)etana (**10**, 38 mg, 76,0%). Dobivena tališta, Rf vrijednosti i NMR podaci u skladu su s podacima prethodno navedenim pod metodom A.

3.7.14. Kinetika izomerizacije **6** u **7a** praćena ^{1}H NMR-om

2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 30 mg, 0,2 mmol) otopljen je u DMSO-*d6* (600 µL) i sniman povremeno ^{1}H NMR spektroskopijom u razdoblju od tri mjeseca pri 25°C. Usporedba

prvog protonskog spektra odmah nakon pripreme otopine i onog uzetog nakon 3 dana nije pokazala razlike. Spektri su povremeno uzimani do gotovo potpune (99,1%) konverzije **6** u **7a**. Manja količina **9** također je uočena u otopini od cca. 0,94%. Dobiveni kemijski pomaci za **7a** i **9** bili su u skladu s podacima iznesenim ranije u tekstu. Svi su spektri snimljeni prema uvjetima opisanom u poglavlju 3.2.2.

3.7.15. Pokušaj detekcije tiiranijevog međuprodukta **8** u reakciji **6** sa srebrnim tetrafluoroboratom u toluen-d_8 ^{1}H NMR-om

2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 6,0 mg, 0,04 mmol) otopljen je u toluenu-d_8 (600 µl) i otopina je ohlađena na -20°C nakon čega je snimljen ^{1}H NMR spektar koji je sadržavao signale karakteristične za **6** uz signale otapala. Zatim je dodan srebrni tetrafluoroborat (8 mg, 0,04 mmol) i snimljeni su nizovi uzastopnih protonskih NMR spektra tijekom 3 sata, dok se temperatura postupno povećavala s -20°C na 25°C. Neposredno nakon dodavanja soli pojavio se bijeli talog i u svim protonskim spektrima osim signala otapala nisu primijećeni signali koji pripadaju početnom **6**, što je ukazivalo da nastali talog nije topljiv u toluenu-d_8. Nakon što se u roku od 3 sata nisu pojavili novi signali i temperatura dosegla 25°C, dodan je DMSO-d_6 (600 µl), pri čemu se talog otopio uz pojavu novih signala, koji su pripisani Ag-kompleksu **10**. Svi su spektri snimljeni prema uvjetima opisanim u poglavlju 3.3.2.

3.7.16. Pokušaj detekcije tiiranijevog međuprodukta **8** u reakciji **6** s srebrnim tetrafluoroboratom u DMSO-d_6 ^{1}H NMR-om

2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 6,0 mg, 0,04 mmol) otopljen je u DMSO-d_6 (600 µl) pri 25°C, nakon čega je snimljen protonski NMR spektar koji odgovara signalima polaznog **6** uz dodatak signala otapala. Zatim je u otopinu dodan srebrni tetrafluoroborat (6,0 mg, 0,04 mmol) pri istoj temperaturi, a na snimljeniom spektaru se pored signala otapala uočavaju i signali Ag-kompleksa **10** te nisu primijećeni drugi signali. Zatim je temperatura povišena na 80°C i snimljeni su nizovi uzastopnih protonskih NMR spektara tijekom narednih 7 sati. Nakon jednog sata pri 80°C na snimljenom spektru su se pored signala **7**, pojavili i signali tetrafluoroboratne soli **7b** no slabog intenziteta. Nakon narednih četiri sata pri 80°C nestali su signali **10**, dok dominiraju signali **7b**. Izvedeni pokus jasno je potvrdio transformaciju **6** preko **10** do **7b** . Svi su spektri snimljeni prema uvjetima opisanom u poglavlju 3.3.2.

3.7.17. 2-[(2-Hidroksietil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**13**)

2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 49,3 mg 2,8 mmol) otopljen je u 60 mL $NaHCO_3$ (10 %) i pripremljena otopina je miješana pri 55°C tijekom 30 minuta. Zatim je temperatura podignuta na 80°C i reakcija je uz miješanje nastavljena pri toj temperaturi tijekom narednih 90 minuta. Smjesa je ohlađena i ekstrahirana s 20 mL diklormetana, a organski ekstrakt je posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata. Nakon uparavanja pri sniženim tlakom uparni je ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan/aceton 8:2 kao eluens. Uparavanjem izabranih frakcija dobiven je kromatografski čisti 2-[(2-hidroksietil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**13**, 40,1 mg 93,0%) u formi bezbojnog viskoznog ulja. *Rf*=0.54 (diklormetan:aceton=8:2). EI MS-QTOF: m/z: $[M+H]^+$ 159,000, $C_6H_{10}N_2OS$. ^1H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H), 3,57, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,21 *J* = 1,3 Hz, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 6,91 *J* = 1,3 Hz, S-CH_2 (t, 2H) 3,05 *J* =6,5 Hz, CH_2-O (t, 2H) 3,57 *J* = 6,5 Hz, ^{13}C NMR (DMSO-d_6,150 MHz/ppm) N-CH_3 33,3, -N(CH_3)-C<u>H</u>= 123,5, =N-CH= 128,7, S-CH_2 36,5, CH_2-O 60,9, C(S) 140,9.

3.7.18 1-Metil-2-(viniltio)-1*H*-imidazol (**14**)

2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 17,6 mg, 0,1 mmol) otopljen je u 8 mL KOH (1 M) i kuhan je povratu tijekom 1,5 sati. Smjesa je ohlađena i ekstrahirana s diklormetanom. Ekstrakt je osušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pri sniženim tlakom. Uparni je ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan/aceton 8:2 kao eluens. Uparavanjem izabranih frakcija dobiven je kromatografski čisti 1-metil-2-(viniltio)-1*H*-imidazol (**14**, 7,9 mg, 57,0 %) u formi bezbojnog viskoznog ulja. *Rf*=0,57 (diklormetan/aceton=8:2), EI-MS-QQQ: $[M+H]^+$ 140,1. ^1H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H), 3.62, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,39 *J* = 1.3 Hz, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,03 *J* = 1.3 Hz, =CH_2 (d, 1Ha) 4.96 *J* =16.7 Hz, =CH_2 (d, 1Hb) 5.32 *J* = 9.7 Hz, -CH= (dd, 1H) 6.57 *J* = 16.7, 9.7 Hz, ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 150 MHz): N-CH_3 33.6, -N(CH_3)-<u>C</u>H= 125,0, =N-CH= 129,7, =CH_2 114,1, -CH= 130,6, C(S) 136,4.

3.7.19. Reakcija **6** s kalijevim cijanidom u DMSO-d_6

2-[(2-Kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 100,0 mg, 0,56 mmol) otopljen je uz miješanje u 10 mL DMSO-d_6, nakon čega je dodan kalijev cijanid (40 mg, 0,6 mmol) i otopina zagrijana na

70 °C. Nakon 6 sati reakcijska je smjesa je ohlađena i analizirana 1-D (^{1}H, ^{13}C) i 2-D (HSQC i HMBC) te MS-QTOF tehnikama. Uz potpuni nestanak signala za početni **6**, u u smjesi su uočeni signali za već poznati **1** (2% molarni sadržaj), **3a** (31%), **14** (5%) te sukcinonitril (1,2-dicijanoetan, **15**, 44%) i 2-cijano-1-metil-1*H*-imidazol (**16**, 14%). Dok su radi usporedbe za spojeve **1**, **3a** i **14** postojali spektri iz ovog rada, spektri za sukcionitril (**15**) nađeni su u Brukerovoj bazi podataka**,** a za 2-cijano-1-metil-1*H*-imidazol (**16**) podaci o kemijskim pomacima dobiveni su koristeći prediktivni alat Bruker Advance.

Nakon spektralne analize, reakcijska smjesa je razrijeđena s 100 mL vode i 20 mL zasićene otopine natrijevog klorida, te ekstrahirana s etilnim acetatom (3 x 70 mL), ekstrakt posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pri sniženim tlakom. Uparni je ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan/aceton 8:2 kao eluens. Uparavanjem izabranih frakcija dobiven je kromatografski čisti sukcinonitril, **15** (17,9 mg, 40,0 %) u obliku bezbojnog viskoznog ulja. *Rf*=0.85 (diklormetan/aceton =8:2), HRMS $[M+H]^{+}$ 81,045, $C_4H_4N_2$. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): -CH_2- (s, 4 H) 2,92, ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): -CH_2-, 13,7, CN 118,6.

Dodatno su izdvojena frakcije, čijim je uparavanjem dobiven kromatografski 2-cijano -1-metil-1*H*-imidazol (**16**, 6,0 mg, 10,0 %), u obliku bezbojnog viskoznog ulja. *Rf*=0.79 (diklormetan/aceton =8:2), HRMS: $[M+H]^{+}$ 108,056, $C_5H_5N_3$. ^{1}NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H), 3,84, -N(CH_3)-CH= (d, 1H) 7,60, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,18. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): N-CH_3 33,8, -N(CH_3)-CH= 126,3, =N-C<u>H</u>= 131,0, <u>C</u>-CN 121,5, CN 111,6.

3.7.20. 1-Metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol (**4a**)

Metoda A) Metimazol (**1**, 4900,0 mg, 43 mmol) je otopljen u 1,5 M otopini natrijevog karbonata (50 mL) i postepeno je dodavan jodometan (9500,0 mg, 67 mmol) te je miješanje nastavljeno tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi pod dušikom i zaštićeno od svjetla. Reakcijska smjesa je ekstrahirana diklormetanom (3 x 25 mL), organski ekstrakt posušen je iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pod sniženim tlakom pri čemu se dobiva, sirovi, 1-metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol kao bezbojna tekućina (**4a,** 5200,0 mg, 95,0 %). Čistoća; HPLC, 100%. *Rf* = 0,59 (1,2-dikloretan:metanol=9:1), MS-QQQ: $[M+H]^{+}$ 129,0489, Molarna masa $C_8H_{10}N_4S_2$. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H), 3,819, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,850, *J* = 1,8Hz, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,812 *J* = 1,8 Hz), S-CH_3 (s, 3H) 2,742. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 150

MHz/ppm: N-CH_3 35,615, -N(CH_3)-CH= 125,339, =N-C<u>H</u>= 121,074, S-CH_3 17,399, C(S) 142,672.

Metoda B) Otopini 2,2'-disulfandilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5**, 50,0 mg, 0,22 mmol) u 1M NaOH (5 mL) dodan je jodometan (91,2 mg, 0,64 mmol) u atmosferi dušika i miješanje je nastavljeno tijekom 3 sata pri sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je ekstrahirana diklormetanom (3 x 2 mL), ekstrakt posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pod sniženim tlakom, pri čemu se dobiva **4a** (49,0 mg, 87,0%). *Rf* i spektroskopski podaci identični su podacima dobivenim za autentičan uzorak dobiven metodom A.

3.7.21. 1-Metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol hidrojodid (**4b**)

Metimazol (**1**, 1000,0 mg, 8,8 mmol) je otopljen je u acetonu (10 mL) i uz miješanje postepeno je dodavan jodmetan (1300 mg, 8,8 mmol) tijekom 5 minuta u ledenoj kupelji, pod dušikom i zaštićeno od svjetla. Nakon 2 sata dobiveni produkt je profiltriran i ispran hladnim acetonom pri čemu se dobivaju bijeli kristali 1-metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol hidrojodid (**4b**, 2000 mg, 91,0%), t_t $DSC_{početak}$ 147°C (lit. 150°C[44]). Čistoća; HPLC 99,9%. ESI-MS-QTOF $[M+H]^+$ 227,0423. Molarna masa $C_8H_{10}N_4S_2$. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H) 3,819, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d,1H) 7,850 J = 1.8Hz =N-CH= (d, 1H) 7,812 J = 1,8 Hz, S-CH_3 (s, 3H) 2,742. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 150 MHz/ppm): N-CH_3 35,615, -N(CH_3)-<u>C</u>H= 125,339, =N-CH= 121,074, S-CH_3 17,399, C(S) 142,672. Ionska kromatografija: 48%, u odnosu na teoretsku vrijednost jodida 49%. Struktura mu je potvrđena rentgenskom strukturnom analizom, a monokristali **4b** su dobiveni su sporom kristalizacijom iz acetona.

3.7.22. 1,3-Dimetil-2-metiltio-1*H*-imidazolijev jodid (**18**)

Otopini **15b** (100 mg, 0,39 mmol) u suhom acetonitrilu (10 mL) dodan je bezvodni $NaHCO_3$ (500 mg, 5,95 mmol) te je uz miješanje dodavan jodmetan (227,1 mg, 1,6 mmol). Reakcijska smjesa je kuhana u povrat kroz 5 sati, razrijeđena vodom, ekstrahirana s diklormetanom i uparena pri sniženom tlaku pri čemu se dobiva bezbojni kristalinični produkt 1,3-dimetil-2-metiltioimidazolijevog jodida (**16**, 79,0 mg, 75,0 %), HPLC čistoća, 99%, t_t $DSC_{onset-endset}$ 168°C-182°C (literatura 187°C[154]), *Rf* = 0,30 (1,2-dikloretan:metanol=9:1), MS-QQQ: $[M-I]^+$ 143,000. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H) 3,916, -N(CH_3)-C<u>H</u>= ,=N-CH=

(s, 2H) 7,938, S-CH_3 (s, 3H) 2.543. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 150 MHz/ppm): N-CH_3 36,314, -N(CH_3)-CH=, =N-CH= 124,684, S-CH_3 17,356.

3.7.23 1,3-Dimetilimidazol-2-tion (**17**)

1,3-Dimetil-2-metiltioimidazolijev jodid (**16**, 100,0 mg 0,37 mmol) otopljen je u suhom acetonitrilu (10 mL) uz dodatak bezvodnog $NaHCO_3$ (500 mg, 5,95 mmol) i otopina je kuhana u povrat 13 sati, razrijeđena s vodom (10 mL), ekstrahirana tri puta s diklormetanom (3 x 13 mL), a organski ostatak posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata. Uparavanjem sirovog ostatka i prečišćavanjem kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela (veličina pora 0,063-0,2 mm) uz diklormetan:aceton=9:1 kao eluens dobiva se bijela krutina (**17**, 32 mg, 67,4%), t_t $DSC_{početak}$ 183° C (literatura 183°C[155,156]). *Rf* =0,81 (1,2-dikloretan:metanol= 9:1), MS-QQQ: $[M-H]^+$ 129,000. ^1H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H) 3,461, -N(CH_3)-CH= ,=N-CH= (s, 2H) 7,111 ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 150 MHz/ppm): N-CH_3 34,439, -N(CH_3)-CH=, =N-CH= 118,003, C(S) 162,000.

3.7.24. 2,2'-Disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**)

Sinteza provedena prema modificiranoj metodi: J S. Figueroa et al.[157]

Metimazol (**1**, 2100,0 mg, 18,0 mmol) otopljen je u 1,2-dikloretanu (130 mL) i Et_3N (2,8 mL, 20,1 mmol) i pod dušikom, dodan je jod (2300,0 mg, 9,0 mmol) uz miješanje pri sobnoj temperaturi. Nakon 3 sata smjesi je dodano 100 mL vode i miješano tijekom 15 minuta. Organski sloj je odijeljen, profiltriran, posušen iznad bezvodnog natrijevog sulfata i uparen pri sniženom tlaku pri čemu je dobiven sirovi, TLC čist 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) u formi žutih kristala (**5a**, 1200 mg, 57,6%), t_t $DSC_{početak}$ 129°C (lit. 127-128°C[158], lit. 138°C[50]). TLC, *Rf*= 0,35 (1,2-dikloretan:metanol=9:1), EI-MS-QTOF $[M+H]^+$ 227,0423. ^1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H), 3,741, -N(CH_3)-CH= (d, 1H) 7,24, *J* = 1,2Hz, =N-CH= (d, 1H) 7,310 *J* = 1,2 Hz), ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz/ppm): N-CH_3 34,08, -N(CH_3)-CH= 124,79, =N-CH= 130,57.

Struktura mu je potvrđena rentgenskom strukturnom analizom, a monokristali **5a** pripravljeni su kristalizacijom isparavanjem iz suhog etilnog acetata.

3.7.25. 2,2'-Disulfandiilbis (1-metil-1*H*-imidazol) (**5b**)

2,2'-Disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) **5a** (500 mg, 0,4 mmol) otopljen je u acetonu (10 mL), otopina zagrijana do 50°C profiltrirana i ostavljena kroz 12 sati u mraku. Dobiveni kristali su odijeljeni filtracijom posušeni između slojeva filter papira pri čemu se dobiva 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5b**, 350 mg, 70,0 %), t_t $DSC_{početak}$ 90°C. GLC sadržaj acetona 3,02 %. TLC: *Rf*= 0,35 (1,2-dikloretan:metanol=9:1), ^{1}H NMR ($CDCI_3$, 500 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H), 3,801, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,270, *J* = 1,2Hz, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,351 *J* = 1,2 Hz), ^{13}C NMR ($CDCI_3$, 150 MHz/ppm): N-CH_3 34,228, -N(CH_3)-CH= 124,627, =N-C<u>H</u>= 130,000.

3.7.26. Kristalizacija 2,2'-disulfandiilbis (1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**) iz drugih otapala.

2,2'-Disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) **5a** (100 mg, 0,4 mmol) otopljen je u diklormetanu, dikloretanu, acetonu, etilnom acetatu, metanolu, etanolu i izopropanolu (5-20 mL) s ili bez zagrijavanja pri temperaturama 30-60°C, uz stajanje tijekom 12 sati do 5 dana te su dobiveni kristali odijeljeni i posušeni. U slučaju diklormetana, etilnog acetata i dikloretana dobivena je žuta forma **5a**, dok u ostalim otapalima nisu dobiveni kristali, već je se nakon spontanog i potpunog isparavanja otapala dobiva viskozna masa koja ne kristalizira dulje vrijeme (praćeno 5 mjeseci).

3.7.27. pH Profil razgradnje **5a**

Pripremljene su slijedeće otopine: kloridna kiselina 0,2 M, kalijev klorid 0,2 M, natrijev hidroksid 0,1 M, kalijev dihidrogenfosfata 0,1 M, borna kiselina, 0,1 M, natrijev citrat 0,03 M, citratna kiselina 0,06 M.

Puferi su pripremljeni miješanjem sljedećih otopina.

Pufer pH 1,2. Pripremljeno je 100 mL otopine pufera miješanjem 32,3 mL 0,2 M otopine HCl i 25,0 mL 0,2 M kalijevog klorida.

Pufer pH 7,0. Pripremljeno je 100 mL otopine pufera miješanjem 29,63 mL 0,1 M natrijevog hidroksida i 50,0 mL 0,1M kalijevog dihidrogenfosfata.

Pufer pH 9,0. Pripremljeno je 100 mL otopine pufera miješanjem 21,30 mL 0,1 M natrijevog hidroksida, 25 mL 0,1 M borne kiseline i 25 mL 0,1 M kalijevog citrata.

pH otopina provjeren je prije studije koristeći Mettler Toledo SevenMulti pH metar kalibiran u 6 točaka.

Pripremljene su standardne otopine metimazola (**1**) i 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**) u koncentraciji od 0,2 mg/mL u smjesi acetonitril:voda =1:1. Za kinetička mjerenja pripremljene su otopine **5a** u koncentraciji od 0,024 mg/mL. Mjerenja su provedena u triplikatu pri tri temperature 25°C, 35°C, 50°C u vremenskim intervalima od 10 minuta pri mjereći apsorbanciju UV-VIS spektrofotometrijom pri 251 nm (odgovara maksimumu apsorbancije **1** i 315 nm, odgovara maksimumu apsorbancije **5a**. Dobiveni kinetički i termodinamički podaci prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Kinetički parametri **5a** pri pH 1,0, 7,0 i 9,0.

pH	T (°C)	K (s-1)	R^2	$t_{1/2}$ (s)	Ea(kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS(J/mol)
1.2	25	0,0065	0,9585	106,64	55,28	52,8	-505,44
	33	0,0137	0,952	50,59		52,74	-510,50
	50	0,0377	0,9827	18,39		52,594	-520,45
7.0	25	0,0883	0,9865	7,85	54,26	54,26	-500,54
	30	0,307	0,9952	2,26		51,74	-512,00
	50	0,638	0,9807	1,09		51,57	-523,61
9.0	25	0,2978	0,9949	2,33	n.p	12,8	-253,02
	33	1,1486	0,9731	0,60		125,52	-272,77

n.p. nije provedeno

3.7.28. Oksidacija metimazola s vodikovim peroksidom

Metimazol (**1**, 100 mg, 0,88 mmol) otopljen u je 15 mL etilnog acetata te je uz miješanje dodavan 30% vodikov peroksid (0,1 mL – 0,31 mL; 0,5 mmol – 3,0 mmol) u inertnoj atmosferi dušika. Tijek reakcije je praćen tankoslojnom kromatografijom na Kiseselgel ploči uz 1,2-diklormetan/metanol = 9:1 i vizualizaciju parama joda. U reakciji nastaje 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**) *Rf* = 0,35 (1,2-dikloretan:metanol=9:1) (10-30% prema TLC-u) i *N*-metilimidazolijum hidrogensulfat (**20**) kao mrlja na startu.

3.7.29. *N*-Metilimidazolijum hidrogensulfat (**20**)

Metimazol (**1**, 100 mg, 0,88 mmol) otopljen u je 15 mL etilnog acetata te je uz miješanje dodavan 30% vodikov peroksid (0,31 mL, 3,0 mmol) u inertnoj atmosferi dušika. Nakon 5 sati organski sloj je dekantiran, a uljni produkt s dna otopljen u 5 mL vode i istaložen acetonom. Uljni produkt je odijeljen i sušen u vakumu do konstantne mase pri čemu se dobiva *N*-metilimidazolijum hidrogensulfat (**20**, 136,5 mg, 85,0 %) u obliku žućkastog ulja koji zagrijavanjem tamni. IR(cm^{-1}): 3145,72 (C-N), 1452,72 (C=C), 2966,27, 2864,03 (C-H) , 1087,86 (C-H), 1167,41 (HSO_4^-) MS-QTOF: $[HSO_4]^-$ 96,9607. ^1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H), 3,74, -N(CH_3)-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,39, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,27, N-CH=N (s, 1H) 8,33, ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz/ppm: N-CH_3 34,09, -N(CH_3)-CH= 123,77, =N-C<u>H</u>= 121,84, N-CH=N 136,75.

3.8. Računalne studije

Sve molekularne geometrije optimizirane su modelom M06-2X/6-31+G (d), koji je dizajniran za pružanje visoko točnih termodinamičkih i kinetičkih parametara za različite organske sustave. Kako bi se uzeli u obzir učinci otapala, tijekom optimizacije geometrije uključen je implicitni model solvacije SMD-a koji odgovara aprotičnim otapalima. Toplinske korekcije izvučene su iz odgovarajućih proračuna frekvencija, tako da svi prikazani rezultati odgovaraju razlikama u Gibbsovoj slobodnoj energiji pri sobnoj temperaturi i normalnom tlaku.

Odabir računalnih postavki potaknut je njezinim uspjehom u ponovnoj reprodukciji različitih značajki različitih organskih,[159] organometalnih,[160] i enzimatsko-matičnih sustava,[161] što je osobito važno za relativne trendove među sličnim reaktantima. Sve strukture prijelaznog stanja locirane su postupkom skeniranja, koristeći 1D i 2D skeniranje. Osim vizualizacije dobivenih negativnih frekvencija, valjanost svih struktura prijelaznog stanja potvrđena je i IRC proračunom u oba smjera te identifikacijom odgovarajućih reaktanata i struktura produkata povezanih s ispitivanim prijelaznim stanjem. Svi izračuni izvedeni su pomoću softvera Gaussian 16.[162]

3.9. Probir polimorfa metimazola (1)

3.9.1. Kristalizacijske probe pri sobnoj temperaturi

Metimazol (**1**, 500 mg, 4,4 mmol) otopljen je u vodi, butanolu, etilnom acetatu, metanolu, kloroformu, izobutanolu, izopropanolu, etanolu, acetonitrilu, dimetilformamidu, acetonu (2,0 mL do 8,5 mL, bez zagrijavanja uz lagano miješanje i ostavljeljen po strani pri sobnoj temperaturi (temperatura sobe 21±2°C). Nakon 12 sati dobiveni bezbojni kristali **1** su odijeljeni gravitacijskom filtracijom i posušeni između slojeva filter papira. Iskoristivost kristalizacije kretala se u rasponu od 300 do 410 mg (60,0 do 82,0%). Dobiven kristali snimljeni su primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (prema poglavlju 3.4.2), infracrvene spektroskopije (prema poglavlju 3.3.1) i rendgenske difrakcijske analize na polikristaliničnom uzorku (prema poglavlju 3.6.1). Dobivene razlike u odnosu na standard metimazola prikazane su u Tablici 13.

Tablica 13. Prikaz kristalizacijskog probira **1** pri sobnoj temperaturi.

Oznaka uzorka	Masa **1**/mg	Kristalizacijsko otapalo	Volumen kristalizacijskog otapala/ml	t_t $DSC_{početak}$ /°C	Razlika u odnosu na **1**	Razlika u pikovima pikova/2θ° u odnosu na **1**
A1	500	Voda	2,5	142,3	DA	16,0, 18,0, 21,0, 24,0, 25,5, 28,0, 29,0, 31,5, 32,0, 33,0, 36,5.
A2		Butanol	3,5	142,7	DA	18,0, 19,5, 21,0, 22,5, 24,0, 27,0, 28,0, 32,0, 32,5, 33,0, 36,5. 39,5.
A3		Etilni - acetat	8,5	143,4	DA	16,0, 17,0, 18,0 19,5, 21,0, 22,5, 24,0, 27,5, 29,0, 32,0, 33,0, 34,5, 39,5.
A4		Metanol	4,0	142,7	DA	19,5, 31,0, 33,0, 39,5.
A5		Kloroform	2,0	142,9	DA	12,5, 19,5, 21,0, 22,5, 24,5, 26,0, 28,0, 31,5, 32,0, 33,0.
A6		Izobutanol	4,0	143,6	DA	22,5, 32,0, 33,0, 34,5, 39,5.
A7		Izopropanol	2,0	143,1	DA	17,5, 18,0, 19,5, 21,0, 22,5, 24,0, 25,5, 27,5, 31,0, 32,0, 33,0, 34,5, 35,5, 36,5, 39,5.
A8		Etanol	2,0	143,0	DA	12,5, 13,0, 19,0, 21,0, 22,5, 24,0, 27,5, 29,0, 32,0, 32,5, 33,0, 37,0, 39,5.
A9		Acetonitril	2,5	142,7	DA	
A10		Dimetilformamid	2,5	142,8	DA	28,5, 33,0, 34,5, 35,5, 39,5.
A11		Aceton	2,5	142,9	DA	19,5, 21,0, 22,5, 29,0, 31,0, 33,0, 34,5, 39,5.

3.9.2. Kristalizacijske probe pri povišenoj temperaturi

Metimazol (**1**, 500 mg – 4000 mg, 4,4 mmol - 35,2 mmol) otopljen je u vodi, butanolu, etilnom acetatu, metanolu, kloroformu, izobutanolu, izopropanolu, etanolu, acetonu (2 mL do 12 mL, uz zagrijavanje (50°C-70°C) uz lagano miješanje i ostavljen po strani pri sobnoj temperaturi (temperatura sobe 21±2°C). Nakon 12 sati dobiveni bezbojni kristali **1** su odijeljeni gravitacijskom filtracijom i posušeni između slojeva filter papira. Iskoristivost kristalizacije kretala se u rasponu od 250 do 410 mg (50,0 % do 82,0 %). Dobiven kristali analizirani su primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije, i rendgenske difrakcijske analize na polikristaliničnom uzorku. Dobivene razlike u odnosu na standard metimazola prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Prikaz kristalizacijskog probira **1** pri povišenoj temperaturi.

Oznaka uzorka	Masa **1**/mg	Kristalizacijsko otapalo	Volumen kristalizacijskog otapala/mL	Temperatura kristalizacijskog otapala /°C	t_t $DSC_{početak}$ /°C	Razlika u odnosu na **1**	Razlika u pikovima pikova/2θ° u odnosu na **1**
B1	4000	Voda	8,0	50	142,7	DA	Odsustvo pri 21,0, 25,5, 32,0, 3,0, 34,5, 37,5, 39,5.
B2	4000	Aceton	8,5	50	143,2	DA	Odsustvo pri 21,0, 25,5, 32,33, 34,5, 37,5, 39,5.
B3	500	Butanol	3,5	70	144,1	NE	
B4	500	Etanol	2,0	70	143,8	NE	
B5	500	Izopropanol	2,0	70	144,1	NE	
B6	500	Izobutanol	4,0	70	143,8	NE	
B7	5000	Etilni acetat	10	72	143,7	NE	
B8		Metanol	12	35	142,2	NE	

3.9.3. Kristalizacijske probe taloženjem i difuzijom kontraotapala

Metimazol (**1**, 500 mg 1000 mg 4,4 mmol – 8,8 mmol) otopljen je diklormetanu ili acetonu (5,0 mL do 10 mL), bez zagrijavanja uz lagano miješanje, nakon čega je dodano kontraotapalo cikloheksan ili heksan (1 mL-10 mL) lagano uz stjenku posudice kao u pokusu C1-C3 (temperatura sobe 21±2°C) ili je pohranjeno u posudicu zasićenu parama cikloheksana kao u pokusu D1. Nakon 12 sati dobiveni bezbojni kristali **1** odijeljeni su gravitacijskom filtracijom i posušeni između slojeva filter papira. Iskoristivost kristalizacije kretala se u rasponu od 300

do 725 mg (60,0 % do 72,5 %). Dobiven kristali snimljeni su primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije, i rendgenske difrakcijske analize na polikristaliničnom uzorku. Dobivene razlike u odnosu na standard metimazola prikazani su u Tablicama 15 i 16.

Tablica 15. Prikaz kristalizacijskog probira **1** kristalizacijom taloženjem.

Uzorak	Masa **1**/mg	Kristalizacijsko otapalo A	Volumen kristalizacijskog otapala A/mL	Kristalizacijsko otapalo B	Volumen kristalizacijskog otapala B/mL	Temperatura kristalizacijskog otapala /°C	t_t DSC $_{početak}$ /°C	Razlika u odnosu na 1	Razlika u pikovima pikova/2θ° u odnosu na **1**
C1	500	Diklormetan	5	Cikloheksan	1	31	143,7	DA	Prisustvo dodatnih pikova pri 8,0, 32,0, 40,0.
C2	500	Aceton	7	Heksan	10	s.t.	142,2	NE	
C3	500	Aceton	10	Heksan	10	s.t	142,4	NE	

s.t. sobna temperatura

Tablica 16. Kristalizacija **1** spontanom difuzijom kontraotapala.

Uzorak	Masa 1/mg	Kristalizacijsko otapalo A	Volumen kristalizacijskog otapala A/mL	Kontra otapalo B	Temperatura kristalizacijskog otapala /°C	t_t DSC$_{početak}$ /°C	Razlika u u odnos na **1**	Razlika u pikovima pikova/2θ° u odnosu na **1**
D1	1000	Diklormetan	5	Cikloheksan	s.t	134,8	NE	

s.t. sobna temperatura

Uzorcima B2, B3, C1, određena je kristalna struktura rentgenskom difrakcijom na monokristalu, prema poglavlju 3.6.2, a dobiveni kristalografski podaci prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Usporedni prikaz kristalnih podataka za uzorke B2, B3, C1.

Parametar	Standard 1		B2	B3	C1
Boja	bezbojna	bezbojna	bezbojna	bezbojna	bezbojna
Temperaturni uvjeti tijekom mjerenja/K	293	150	298	150	295(2)
Kristalni sustav	triklinski	triklinski	triklinski	triklinski	triklinski
Prostorna skupina	*P-1*	*P-1*	*P-1*	*P*-1	*P*-1
Broj strukturnih jedinica u jediničnoj ćeliji	4	4	4	4	4
a/A	7,054(3)	6,929(4)	7,0639(5)	6,9250(4)	7,0677(3)
b/A	7,327(3)	7,361(4)	7,3411(5)	7,3457(6)	7,3435(4)
c/A	11,568(5)	11,355(6)	11,5940(10)	11,3604(8)	11,5888(6)
α/°	99,678(4)	80,917(5)	99,653(6)	80,765(6)	99,709(5)
β/°	106,885(4)	73,122(5)	106,872(7)	73,044(5)	106,874(5)
γ/°	93,200(4)	86,673(5)	93,245(6)	86,506(6)	93,233(4)
V/A³	560,5(4)	547,2(5)	563,66(8)	563,66	563,79(5)
F(000)	240	240	240	240	240
d/gcm⁻³	1,353	1,386	1,345	1,345	1,345
S	1,031	1,025	1,029	1,027	1,026
R	0,0428	0,0270	0,0615	0,0392	0,0559
wR(F2)	0,1073	0,0721	0,1189	0,1914	0,0890
Broj refleksa	0,0428	0,0270	2609	2467	2979

3.10. Karakterizacija nepoznatih onečišćenja primjenom HPLC-MS-QTOF

Primjenom združenog sustava HPLC-MS-QTOF tehnike provedeno je odjeljivanje i utvrđivanje strukture prisutnih onečišćenja u proizvodu Athyrazol (šarža F-123) analizom masenih spektara i određivanjem molekulske mase. Uvjeti analize opisani su u poglavlju 3.5.2. Rezultati utvrđenih struktura onečišćenja slijede u tekstu i Tablici 18.

1-[metil-(2,3-dihidro-1*H*-imidazol)-2-metilsulfanil]-1*H*-imidazol-2-tiol (**21**), HPLC: RRT 2,8, ESI MS-QTOF: $[M+H]^+$ 227,0415, $C_8H_{10}N_4S_2$.

1-{2-[2-metil-(2,3-dihidro-1*H*-imidazol)-1-metilsulfanil)-1*H*-imidazol-1-metilsufanil]-1*H*-imidazol-2-tiol (**22**), HPLC: RRT 3,2, ESI MS-QTOF: $[M+H]^+$ 339,0506, $C_{12}H_{14}N_6S_3$

Tablica 18. Rezultati točnih masa za onečišćenja **21** i **22**.

Onečišćenje	Molekulska formula	Masa	m/z	Izračunati m/z	Razlika mDa
20	$C_8H_{10}N_4S_2$	226,0347	227,0415	227,0420	0,46
21	$C_{12}H_{14}N_6S_3$	338,0442	339,0506	339,0515	0,88

3.11. Priprava farmaceutskih smjesa

Binarne i ternarne smjese pripravljene su na način da je izvagano 12,5 g metimazola i količina pomoćnih tvari u omjeru 1:1 (Tablica 19), a dobivene smjese u homogenizirane u turbuli kroz 30 minuta i razdijeljene u posudice od smeđeg stakla.

Tablica 19. Ispitivane smjese i uvjeti testiranja.

Smjesa	Sastavnice*	Uvjeti	Parametri ispitivanja
Binarna smjesa A	Metimazol:mikokristalinična celuloza	25°C / 60 % RV 40°C / 75 % RV 40°C / 25 % RV u otvorenim i zatvorenim posudama, intervali T0M, T6M, T12M**	DSC u T0 Sadržaj metimazola i srodne tvari T0, T6, T12
Binarna smjesa B	Metimazol:magnezijev stearat		
Binarna smjesa C	Metimazol:Ludipres®		
Binarna smjesa D	Metimazol:laktoza monohidrat		
Ternarna smjesa E	Metimazol:mikrokristalinična celuloza:magnezijev stearat		
Ternarna smjesa F	Metimazol:Ludipres®:Magnezijev stearat		
Kontrolni uzorak	Metimazol		

* Odvagano je po 12,5 g svake sastavnice, **T0M – vremenski interval odmah nakon priprave, T6M – nakon 6 mjeseci, T12M - nakon 12 mjeseci

Pripremljene smjese izložene su uvjetima stabilnosti prema tablici 16. Za odvagu sastavnica korištena je vaga Mettler Toledo, dnevno kalibrirana prema internom programu kalibracije. Kompatibilnost sastavnica ispitana je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC), opisanoj u poglavlju 3.4.3, a sadržaj i srodne tvari ispitane su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti prema metodi opisanoj u poglavlju 3.5.1.

Rezultati stres studije prikazani su u Tablicama 20, 21, 22, 23, 24 i 25.

Tablica 20. Stres studija smjesa metimazol:Ludipres® tijekom 12 mjeseci.

Smjesa C	T0M			T6M			T12M		
Uvjet	Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %	
		21	**22**		**21**	**22**		**21**	**22**
25°C/60% RV zrak	100,0	n.p*	n.p	99,9	0,02	0,01	99,9	n.p.	0,01
25°C/60% RV dušik				100,0	n.p		99,9	n.p	
40°C/25% RV zrak				100,0	n.p		99,9	0,01	n.p
40°C/25% RV dušik				100,0	n.p.		100,0	n.p.	
40°C/75% RV zrak				99,9	0,01	n.p	99,9	0,03	n.p
40°C/75% RV dušik				99,9	n.p		99,7	0,02	n.p

*nije prisutno

Tablica 21. Stres studija smjesa metimazol:magnezijev stearat tijekom 12 mjeseci.

Smjesa B	T0M			T6M			T12M		
Uvjet	Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %	
		21	**22**		**21**	**22**		**21**	**22**
25°C/60% RV zrak	100,0	n.p*	n.p	100,0	n.p		99,9	n.p.	
25°C/60% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p.	
40°C/25% RV zrak				100,0	n.p		100,0	n.p.	
40°C/25% RV dušik				100,0	n.p.		100,0	n.p.	
40°C/75% RV zrak				100,0	n.p		99,9	n.p	
40°C/75% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p.	

Tablica 22. Stres studija smjesa metimazol:laktoza monohidrat tijekom 12 mjeseci.

Smjesa D	T0M			T6M			T12M		
Uvjet	Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %	
		21	**22**		**21**	**22**		**21**	**22**
25°C/60% RV zrak	100,0	n.p*	n.p	100,0	n.p		100,0	n.p.	
25°C/60% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p	
40°C/25% RV zrak				100,0	n.p		100,0	n.p.	
40°C/25% RV dušik				100,0	n.p		99,9	n.p.	
40°C/75% RV zrak				100,0	n.p		99,9	n.p	
40°C/75% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p.	

Tablica 23. Stres studija smjesa metimazol:Ludipres®:magnezijev stearat tijekom 12 mjeseci.

Smjesa F	T0M			T6M			T12M		
Uvjet	Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %	
		21	**22**		**21**	**22**		**21**	**22**
25°C/60% RV zrak	100,0	n.p*	n.p	100,0	n.p		100,0	n.p	
25°C/60% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p	
40°C/25% RV zrak				99,9	0,01	0,01	99,97	n.p.	0,01
40°C/25% RV dušik				99,9	n.p.	0,01	100,0	n.p.	
40°C/75% RV zrak				99,9	n.p		100,0	n.p	
40°C/75% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p.	

*nije prisutno

Tablica 24. Stres studija smjesa metimazol:mikrokristalinična celuloza tijekom 12 mjeseci.

Smjesa A	T0M			T6M			T12M		
Uvjet	Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %	
		21	**22**		**21**	**22**		**21**	**22**
25°C/60% RV zrak	100,0	n.p*	n.p	99,9	0,02	0,03	99,8	n.p.	0,14
25°C/60% RV dušik				100,0	n.p		100,0	n.p.	
40°C/25% RV zrak				99,9	n.p	0,03	99,9	n.p.	0,04
40°C/25% RV dušik				99,9	n.p.	0,02	99,9	n.p.	0,01
40°C/75% RV zrak				99,9	0,03	0,07	99,5	0,13	0,2
40°C/75% RV dušik				99,9	0,01	0,04	99,7	n.p.	0,21

*nije prisutno

Tablica 25. Stres studija smjesa metimazol:mikrokristalinična celuloza:magnezijev stearat tijekom 12 mjeseci.

Smjesa E	T0M			T6M			T12M		
Uvjet	Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %		Sadržaj metimazola / %	Onečišćenje / %	
		21	**22**		**21**	**22**		**21**	**22**
25°C/60% RV zrak	100,0	n.p*	n.p	99,9	n.p	0,02	99,9	n.p.	0,06
25°C/60% RV dušik				100,0	n.p	0,01	100,0	n.p	n.p.
40°C/25% RV zrak				99,9	n.p	0,05	99,9	n.p.	0,07
40°C/25% RV dušik				99,9	n.p.	0,02	99,9	n.p.	0,01
40°C/75% RV zrak				99,9	n.p	0,01	98,9	0,13	0,04
40°C/75% RV dušik				99,9	n.p	0,01	99,9	n.p.	0,01

Kvarterna smjesa pripremljena je u triplikatu (šarže kbr F-123, G-123 i H-123) na način da su sastavnice metimazol Ludipres®, magnezijev stearat i mikrokristalinična celuloza zamiješane u V-mješaču (Bizjak Mehanika) i oblikovane u formu tableta koristeći automatsku tabletirku (Fette). Oblikovane tablete opremljene su u blistere uz pomoć blistirke Uhlman i zatim izložene

uvjetu 25°C/60%RV kroz 12 mjeseci i 40°C/75%RV kroz 6 mjeseci. Sadržaj metimazola i onečišćenja **21** i **22** određeni su primjenom tekućinske kromatografije opisane pod 3.5.1.

3.12. Studija prisilne razgradnje

Za studiju prisilne razgradnje korištena je kvarterna smjesa kbr E-123. Analiza uzoraka provedena je koristeći metodu opisanu u poglavlju 3.5.1. Za studiju kisele i bazne hidrolize pripremljena je otopina na način da je smjesa (240 mg) otopljena u 5 mL metanola uz miješanje i dodatno nadopunjena s 5 mL 1M otopine HCl ili 0,1 M NaOH. Pripremljene otopine pohranjena su u mrak, a nakon 2 dana uzorak kisele hidrolize je neutraliziran s 1M otopinom NaOH i filtriran dok je uzorak bazne hidrolize samo filtriran bez dodatne obrade. Za studiju oksidacije pripremljena metanolna otopina smjese razrijeđena je s 5 mL 0,3% natrijevog hidroksida i 30 minuta nakon primjene analizirana, dok je utjecaj zračenja proveden na uzorku smjese otopljenom u 10 mL metanola i izloženo uvjetu prema Tablici 26. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 27. Sadržaj onečišćenja **21** i **22** određeni su primjenom tekućinske kromatografije opisane pod 3.5.1.

Tablica 26 Uvjeti prisilne razgradnje primjenjeni na kvartnernu smjesu (kbr E123).

Stres uvjet	**Čimbenik stresa**	**Vrijeme izlaganja**
Toplina	80°C	2 dana
UV-VIS zračenje	UV-VIS lampa ISO 10977 (320-400nm) uvjet (25°C/ 60%RV)	24 sata
Kisela hidroliza	1 mol/L HCl	24 sata
Bazna hidroliza	0,5 mol/L NaOH	7 sati
Oksidacija	0,3% vodikov peroksid	30 min nakon pripreme

Tablica 27. Rezultati studije provedene na kontrolnom broju E-123.

Onečišćenje /%	Kontrolni uzorak	Toplina	UV-VIS zračenje	Kisela hidroliza	Bazna hidroliza	Oksidacija
20	0,08	0,22	2,17	0,07	0,09	0,19
21	0,11	0,19	1,86	0,09	0,13	0,10

3.13. Stabilnost metimazola u otopini fotoinicijatora

U Pyrex bočici pripremljena je otopina metimazola (19,3 mg, 0,17 mmol) u 5 mL otopine voda/acetonitril (20:80) u koju je dodan 1 mol ekvivalent fotoinicijatora 2,2´azobis-2-metilpropanonitril (AIBN) te je bočica dobro začepljena. Kontrolni uzorci su također pripremljeni, po jednakom postupku, a nakon pripreme otopine su izložene uvjetima prema Tablici 28. Sadržaj onečišćenja **21** i **22** određeni su primjenom tekućinske kromatografije opisane pod 3.5.1. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 28.

Tablica 28. Radikalima inducirana razgradnja s AIBN-om pri različitim uvjetima kroz 48 sati.

Pokus	**Metimazol**	**AIBN**	**Dušik**	**Zrak**	**UV-A**	**25°C/60% RV**	**50°C/75% RV**	**Onečišćenje/%**	
								21	**22**
1	+	+	+	-	-	-	+	n.d	0,02
2	+	-	+	-	-	-	+	n.d	n.d
3	+	+	-	+	-	-	+	n.d	0,01
4	+	-	-	+	-	-	+	n.d	n.d
5	+	+	-	+	+	+	-	0,02	0,03
6	+	+	-	+	+	-	+	0,04	0,05
7	+	-	-	+	+	+	-	n.d	0,001
8	+	-	-	+	+	-	+	n.d	0,002

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pored primjene u medicine i veterini, metimazol kao tioamidni spoj, pripada bifunkcionalnim nukleofilnim spojevima koje eliminacijom protona tvore ambidentni heterociklički anion tipa [N-C-S], gdje je negativni naboj distribuiran preko tri atoma. Zbog toga obično sudjeluju u reakcijama s elektrofilnim spojevima.[36] Lako stvara komplekse s teškim metalima,[75,80] primjenjuje se u sintezi ionskih tekućina[45] i kao terminalna skupina u sintezi necikličkih krunastih etera, koji nalaze primjenu kao ligandi u raznim područjima koordinacijske kemije.[40,163] Na tom području sintetiziran je velik broj metimazolu srodnih supstancija, koje bi u određenim okolnostima istraživanja, analitike, proizvodnje aktivne tvari i finalnih formi te njihova skladištenja mogle postati njegova potencijalna onečišćenja.

Upravo ta spoznaja s jedne strane, te proširenja primjene metimazola na neka druga terapeutska područja, poput upala centralnog živčanog sustava (meningitis, astma, reumatoidni artritis, dijabetes itd.[86], zatim u liječenju psorijaze,[87] u upalnim bolestima,[88] a pokazuje i protektivni efekt pri nefrotoksičnom djelovanju cisplatina i gentamicina,[89] s druge strane, daju u kontekstu novih usmjerenja u farmaceutici (npr. Kvaliteta dizajnom, Quality by Design, QbD s naglaskom na detaljno poznavanje onečišćenja, te studije čvrstog stanja) te novih, moćnih analitičkih tehnika, snažan poticaj boljem poznavanju kemije metimazola i njegovih srodnih tvari, ali isto tako i poznavanju i karakterizaciji njihovih čvrstih formi, koje mogu utjecati na njegovu, ali i stabilnost njegovih formulacija.

4.1. Karakterizacija metimazola

U provedenim istraživanjima korišten je metimazol proizvođača Uetikon, Švicarska, farmakopejske kvalitete. Analizirane su tri kontrolna broja sirovine s ciljem potvrde kakvoće, a jedan od njih, korišten je za sve daljnje studije.

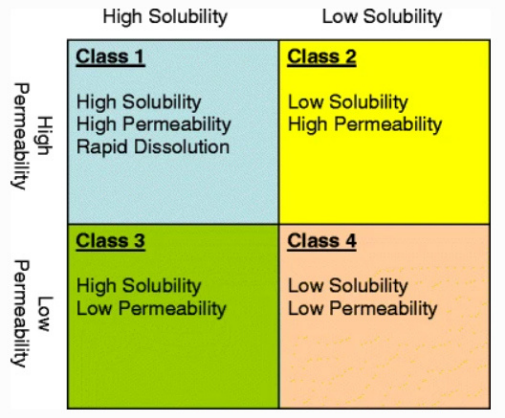
4.1.1. Karakterizacija metimazola prema EU farmakopeji

S ciljem potvrde kakvoće, tri kontrolna broja metimazola (A 123, B 123 i C 123), farmakopejske kvalitete, proizvođača Uetikon analizirane su prema Europskoj farmakopeji.[63] Monografija propisuje određivanje parametara poput: osobina, identifikacije: a) određivanjem tališta, b) primjenom ultraviolentne spektroskopije ili c) primjenom tankoslojne kromatografije na silikagel F_{254} stacionarnoj fazi uz amonijak/izopropanol/toluen (1:24:75) kao mobilnu fazu

te nadalje izgleda otopine, srodnih tvari primjenom plinske kromatografije, teških metala, pH otopine, gubitka sušenjem te sulfatnog pepela**.** Metimazol je bijeli ili svijetlo smeđi kristalni prašak, vrlo dobro topljiv u vodi (200 g/L) i metilen-kloridu, lako ili umjereno topljiv u 96%-tnom etanolu, topljiv u kloroformu i metanolu, a slabo topljiv u benzenu, ligroinu, etil-acetatu i dietil-eteru. Tri kontrolna broja sirovine proizvođača Uetikon farmakopejske kvalitete analizirane su s ciljem potvrde kakvoće kao polazna točka za daljnje studije (Tablica 5, poglavlje 3.1.). Talište metimazola kretalo se u rasponu od 144°C do 145°C što je u skladu s referentnim intervalom od 143° do 145°C, sadržaj **1** iznosio je oko 100%, tj. unutar referentnog intervala 98,0%-101,0% dok su onečišćenja A, B i C bila ispod limita detekcije. Ostali parametri poput gubitka sušenjem, identifikacije, teških metala i sl. bili su unutar zahtjeva. Provedena analiza potvrdila je kakvoću sva tri testirana uzorka metimazola, poglavito u kontekstu sadržaja i onečišćenja. Za sva daljnja istraživanja u ovom radu korišten je metimazol kontrolnog broja A 123.

4.1.2. Topljivost metimazola i definiranje BCS klase

Biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. Biopharmaceutical Classification System, BCS) je smjernica prema kojoj se obzirom na topljivost u vodi i permeabilnost djelatna ljekovita tvar klasificira u 4 klase.[164] Kada se kombinira sa disolucijskim studijama, BCS sustav uzima u obzir tri glavna čimbenika koji utječu na brzinu i količinu adsorpcije lijeka, a to su: otpuštanje, topljivost i permeabilnost, a od značajne je pomoći proizvođačima tijekom razvoja i registracije lijeka. Sukladno BCS klasifikaciji topljivost djelatne tvari se klasificiraju kao visoko ili nisko topljive (Slika 17).



Slika 17. Biofarmaceutski sustav klasifikacije ljekovitih tvari (prilagođeno prema[165]).

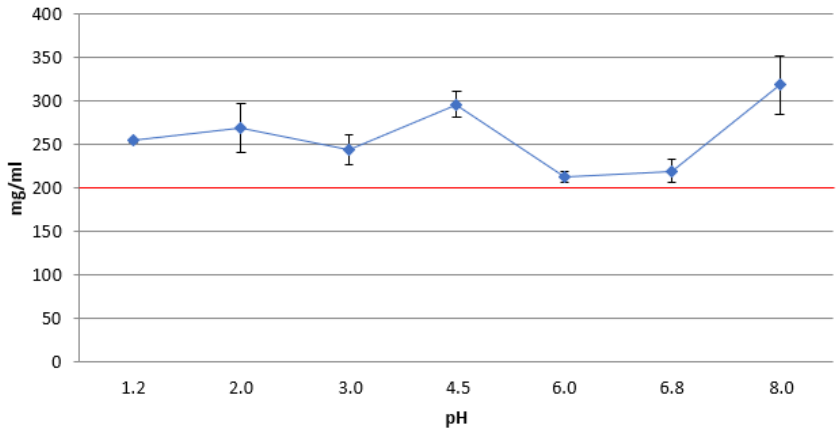
Djelatna tvar se smatra visoko topljivom, ukoliko je najveće doza lijeka topljiva u 250 mL ili manje u vodenom mediju pri pH vrijednostima 1,2-8,0. Dozni broj predstavlja poveznicu

između topljivosti tvari i maksimalne doze. Ukoliko je D0 manji ili jednak nuli, supstancija se klasificira kao visoko topljiva, a ako je D0 veći od 1 tada je supstancija slabo topljiva. Pregledom literature nije nađen podatak o BCS klasi metimazola. Obzirom na podatak o dobroj topljivosti metimazola (200 mg/mL)[1] metimazol se smatra dobrim kandidatom za klasu I, no nužno je utvrditi topljivost kroz interstinalno relevantno pH područje. Stoga su pripravljene zasićene otopina standarda metimazola kontrolnog broja A 123 u otopinama pufera pH 1,5; 2,0; 3,0; 4,5; 6,0; 6,8; 8,0 (Tablica 6, Poglavlje 3.2.) i analizirani primjenom UV-VIS metode, uz mjerenje apsorbancije otopine uzorka pri 252 nm. Dobiveni podaci topljivosti metimazola kreću se u rasponu od 220 do 318 mg/ml kroz pH fiziološki relevantno područje (Slika 18) te su u skladu s literaturnim navodom topljivosti od 200 mg/ml (Tablica 7, Poglavlje 3.2.).

Na temelju topljivosti metimazola određen je dozni broj D_0 koji je za sva relevantna pH područja manji od 1 čime podržava klasifikaciju metimazola kao dobro topljive tvari (Tablica 8, Poglavlje 3.2.).

Dodatno, kako bi definirala BSC klasa uz topljivost nužni su podaci o otpuštanju i permeabilnosti. U tom se kontekstu permeabilnost djelatne tvari može opisati pomoću *in vivo* bioraspoloživosti. U radu Jannsona i suradnika[166] ispitivana su farmakokinetska svojstva metimazola kod zdravih osoba i pacijenata s dijagnosticiranom hiper i hipotireozom, a sadržaj metimazola praćen je plinskom kromatografijom združenom s spektrometrijom masa.

Nakon intravenozne aplikacije metimazola u dozi od 10 mg, vrijeme poluživota ($t_{1/2}$) kretao se od 0,10 do 0,23 sati, dok se vrijeme polueliminacije kretalo od 4,9 do 5,7 sati.



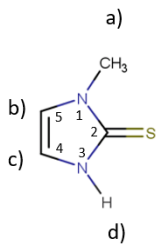
Slika 18. Profil topljivosti metimazola.

Oralna aplikacija metimazola u jednakoj dozi nije utjecala značajno na razliku u odnosu na intravenoznu aplikaciju. Podaci apsolutne bioraspoloživosti (F) nakon oralne primjene 10 mg metimazola u stanju gladovanja iznosila je 93%, a dobiveni podaci su u skladu s prijašnjom studijom u kojoj je korišten radioaktivno označen ^{35}S-metmazol.[167] Zaključno, prema dobivenim rezultatima, metimazol se može klasificirati kao BCS klasu I, a to snažno podržavaju podaci o dobroj topljivosti metimazola kroz pH relevantna fiziološka područja (>200 mg/mL) kao i dobre bioraspoloživost nakon oralne primjene (>90 %).

4.1.3. Karakterizacija NMR metodama

Dodatno, kako bi se dobio širi uvid u strukturna svojstva metimazola i nadopunili zastarjeli spektroskopski podaci provedena je analiza protonskom (^{1}H NMR) i ugljikovom nuklearnom magnetskom rezonancijom (^{13}C NMR) kao i korelacijskim spektroskopskim tehnikama (HSQC, HMBC). ^{1}H NMR spektar metimazola snimljen pri 60 MHz u $CDCl_3$ objavljen je još 1979. u preglednom radu autora H. Y. Aboul-Eneina i A. A. Al-Badra[1] na kojem se vide samo singlet za tri protona pri 3,63 ppm pripisan *N*-metilnoj skupini, te singlet za dva protona pri 6,70 ppm pripisan protonima na C4 i C5 atomima imidazolskog prstena. Kako bi se upotpunili podaci, ^{1}H-NMR spektar standarda metimazola kontrolnog broja A 123 visoke rezolucije snimljen je u $CDCl_3$ pri 500 MHz te pokazuje karakterističan singlet za tri protona pri 3,60 ppm te je pripisan *N*-metilnoj skupini (a), dublet za dva protona pri 6,70 ppm pripisan protonima na C4 i C5 atomima imidazolskog prstena (b) i (c) te singlet pri 12,1 ppm koji odgovara tioamidnom NH protonu (d) (Tablica 29). ^{13}C NMR spektar metimazola snimljen u $CDCl_3$ pri 151 MHz daje četiri karakteristična pika koja odgovaraju svim ugljikovim atomima u strukturi metimazola (Tablica 29).

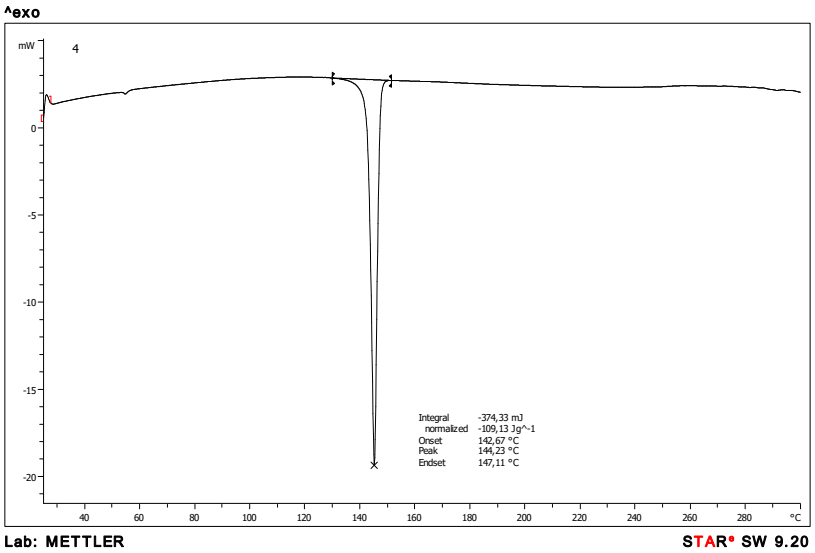
Tablica 29. Kemijski pomaci H- i C-atoma u ^{1}H NMR (500 MHz) i ^{13}C-NMR (151 MHz) spektrima metimazola snimljenim u $CDCl_3$.

Kemijski pomak(δ)	Atom	
3.63 (s)	N-CH_3 (a)	
6.70 (d)	H-C4 (c) i H-C5 (b)	
12.1(s)	N-H (d)	
160.2 (s)	C-2	
119.1 (d)	C-5	
114.2 (d)	C-4	
34.2 (q)	C-N1	

Primjenom dvodimenzionalnog HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation experiment) pokusa ^{1}H-^{13}C NMR spektru ($CDCl_3$ pri 500,1 MHz) na ugljikovom atomu metilne skupine, koji u ^{13}C NMR spektru odgovara kvartetu nalaze se tri vodikova atoma prikazani singletom. Ugljikovi atomi na položajima C4 i C5 odgovaraju dubletima u ^{13}C-NMR te su na njih vezani vodikovi atomi označeni kao c), odnosno b) prikazani dubletima u ^{1}H-NMR spektru. Na ^{1}H NMR i dvodimenzionalnom HSQC ^{1}H-^{13}C NMR spektrima nije vidljiva tiolna skupina, što upućuje da metimazol u navedenom otapalu $CDCl_3$ postoji u tionskoj, a ne u tiolnoj formi. Postojanje metimazola u tionskoj formi u sukladnosti je s literaturnim NMR kemijskim pomacima u DMSO-d_6, gdje se također metimazol nalazi isključivo u tionskoj formi[20,168,34] s orbitalnim proračunima i predviđanjima o većoj stabilnosti tionske forme u vodenim otopinama i lipidima.[33]

4.1.4. Karakterizacija termalnim metodama

Talište standarda metimazola kontrolnog broja A 123 od 144 °C određeno je na uređaju Büchi 510 bez korekcije (Tablica 5, Poglavlje 3.1), ali i primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) (Slika 19). Termogram prikazuje jedan endotermni pik pri onset pri 143°C, a temperatura je u skladu s literaturnim podacima.[63]



Slika 19. Termogram metimazola snimljen u rasponu od 25°C do 300°C pri brzini od 10 K/min u internoj atmosferi dušika.

4.1.5. Karakterizacija difrakcijskim metodama

Difraktogram praha radnog standarda metimazola kontrolnog broja A 123 identičan je po intenzitetu i poziciji pikova 2θ° teorijskom prahu metimazola triklinskog (prostorna grupa $P\bar{1}$) polimorfa metimazola pohranjenog u Cambridge kristalografskoj bazi pod oznakom CSD-BULCUG03[169] tj. radni standard **1** predstavlja triklinsku (prostorna grupa $P\bar{1}$) formu metimazola.

Time je uzorak standardiziran u kontekstu daljnje primjene u sintetskim i kristalizacijskim studijama.

4.2. Reaktivnost metimazola i njegovih srodnih tvari

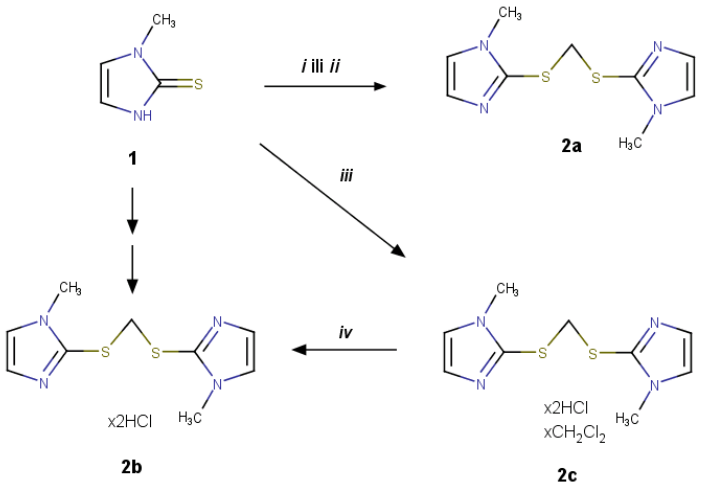
Među premoštenim bis derivatima metimazola (**1**), poznati su 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il) tio] metan (**2a**) i analogni derivat etana 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il) tio] etana (**3**) sintetizirani iz **1** i diklormetana (DCM) ili 1,2-dibromoetana. Sinteza je provedena u prisutnosti jake baze, s ili bez katalizatora faznog prijelaza i pri povišenoj temperaturi.[38,43] U kontekstu profila farmaceutske čistoće, navedeni spojevi se smatraju potencijalnim srodnim tvarima **1**, [170] osobito ako su uobičajena otapala, npr. DCM i 1,2-dikloretan (DCE) primjenjuju u sintetskim transformacijama, izolaciji, pročišćavanju i analitici **1**. Stoga je važno razumjeti njihova kemijska svojstva i utjecaj koji imaju na kemiju **1**. S tim je ciljem ispitivana je stabilnost **1** u DCM i DCE.

4.2.1. Reakcija s diklormetanom (DCM) i 1,2-dikloretanom (DCE)

Reakcija s diklormetanom (DCM)

Prema navodima literature reakcijom **1** s vrijućim diklormetanom u prisutnosti jakih baza, bez ili u prisutnosti transfer katalizatora tijekom tjedan dana pripravljen je u 76 % iskorištenju 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan (t_t 51-52°C/Et_2O) (Shema 10).[38]

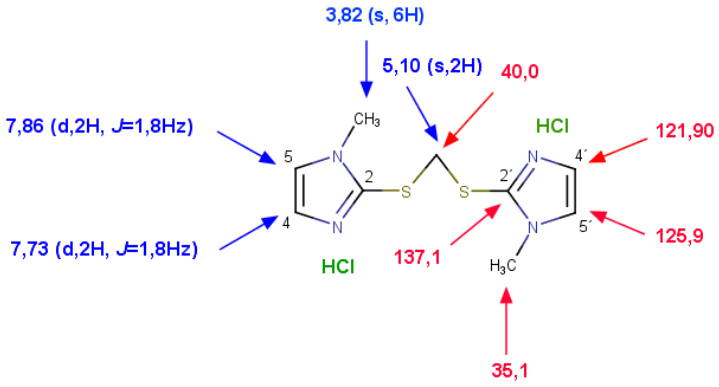
Tijekom predmetnog studija stabilnosti, metimazol (**1**) je otopljen u diklormetanu pri sobnoj temperaturi i ostavljen stajati pri toj temperatuti i mraku ili danjem svjetlu i vlagom nekontroliranim uvjetima. Nakon 3 mjeseca nastali bezbojni pločasti kristali su odsisani i osušeni na zraku. Dobiven je 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2b**) (t_t DSC_{onset} 131°C) HPLC čistoće 99% (Shema 10).



Shema 10. Sinteza dimernih derivata **2b** i **2c**. *i*) CH_2Cl_2, refluks, 1 tjedan; *ii*) K_2CO_3, KOH, H_2O, CH_2Cl_2, $(NBu_4)Br$, 1 tjedan; *iii*) CH_2Cl_2, svjetlo ili mrak, sobna temperatura, 3 mjeseca; *iv*) sobna temperatura, 60 minuta.[38]

Snimanjem NMR spektra promatranog spoja **2b** u DMSO-d_6 uočena su dva dubleta pri 7,86 ppm i 7,77 ppm (Slika 19), a analizom 2-D korelacijske spektroskopije (COSY, HSQC i HMBC) utvrđeno je da isti odgovaraju imidazolnim protonima (Slika 19). Prema literaturnom navodu za 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metana u formi baze imidazolni protoni imaju signale dubleta pri 6,99 ppm i 6,86 ppm. Iako su otapala u kojima su snimani spektri različiti tj. DMSO-*d6* u odnosu na $CDCl_3$ protoniranje imidazolnog prstena u spoju **2b** mijenja elektronsku gustoću imidazolnog prstena i utječe na pomak signala prema višim vrijednostima kemijskog pomaka. Jednaka situacija je uočena i kod ^{13}C signala za imidazolne protone. Pored toga u spektru spoja **2b**, signal protona u premoštenju tj. $-CH_2-$ skupini iznosi 5,10 ppm dok signal za $N-CH_3$ skupinu odgovara singletu pri 3,82 ppm. U usporedbi s literaturnim podatkom za bazu nisu uočene značajne razlike u signalu $-CH_2-$ od 4,64 ppm i signalu $N-CH_3$ od 3,61 ppm.

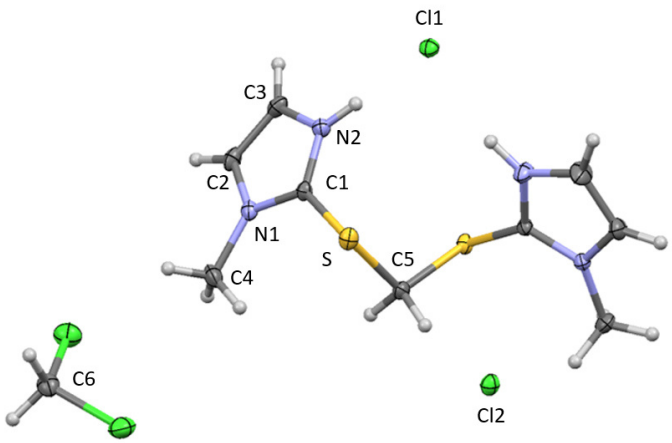
Vrijeme reakcije od 3 mjeseca za reakciju **1** s diklormetanom nije neuobičajeno imajući na umu rad Silve i suradnika[38] gdje je 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dobiven refluksiranjem **1** kroz tjedan dana u diklormetanu i uz prisustvo baze, što ukazuje na slabu reaktivnost diklormetana kao alkilacijskog sredstva.



Slika 19. NMR kemijski pomaci za spoj **2b**, ^{1}H (600 MHz) (plavo) i ^{13}C (151 MHz) (crveno) NMR u DMSO-*d6*.

Masenom analizom spoja **2b** pri pozitivnoj ionizaciji uočen je najzastupljeniji ion pri 240,900 m/z, koji strukturno odgovara $[M+H-2HCl]^{+}$ vrsti. S tim u svezi uočeni signal koji odgovara molekulskoj speciji s odijeljenim klorovodikom je uobičajen za ovu vrstu soli zbog utjecaja ionizacije i procesa isparavanja.[171] Finalno NMR i MS podaci potvrđuju predloženu strukturu spoja **2b.**

Međutim, promjena boje i izgleda kristala **2b** prije i nakon sušenja, usprkos jednake *Rf* vrijednosti ispitane u dva TLC kromatografska sustava, navelo je na ponavljanje pokusa i izolaciju primarnih, pločastih kristala bez sušenja, tj. direktno iz otopine. Rentgenskom strukturnom analizom monokristala izuzetog izravno iz diklormetanske otopine utvrđeno je da se radi o diklormetanskom solvatu 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorida (**2c**, t_t DSC_{onset} 130 °C) (Slika 20).



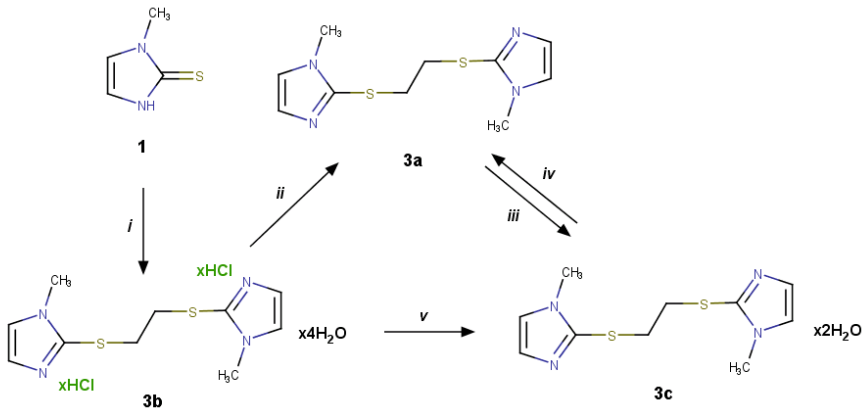
Slika 20. Molekulska struktura **2d** sa shemom označavanja atoma. Elipsoidi su prikazani na razini vjerojatnosti od 50 %.

Detalji kristalne strukture i transformacija iz **2c** u **2b** opisana je u poglavlju 4.3.

Zbog vrlo brze transformacije u **2c** u **2b** njegova sveobuhvatna karakterizacija, uključujući primjenu termalnih, spektrometrijskih, spektroskopskih i difrakcijskih tehnika nije provedena.

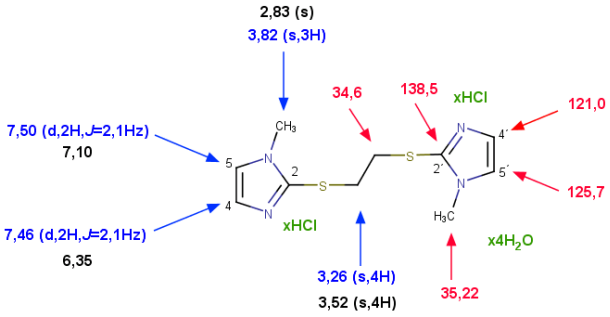
Reakcija s 1,2-dikloretanom (DCE)

U cilju ispitivanja stabilnosti pripremljene su otopine **1** u DCE i ostavljene tijekom 15 dana bez miješanja na dnevnom svjetlu ili u mraku pri sobnoj temperaturi. Nakon 15 dana u obje DCE otopine (tj. na svjetlu i u mraku) uočeni su bezbojni pločasti kristali, koji su nakon izolacije identificirani kao 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid tetrahidrata (**3b**, 30 %) (t_t DSC_{onset} 208°C) HPLC čistoće od 98%. Nakon neutralizacije **3b**, ekstrakcije, isparavanja otapala i kristalizacije sirovog ostatka iz suhog diklormetana u uvjetima niske vlažnosti, dobiven je bezvodni 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan **3a** u 84,0% iskorištenju, t_t $DSC_{početak}$ 89°C (Literatura: 88-90°C,[43]), pri čemu je vidljivo da dobiveni podatak o temperaturi tališta odgovara literaturno objavljenom (Shema 11).



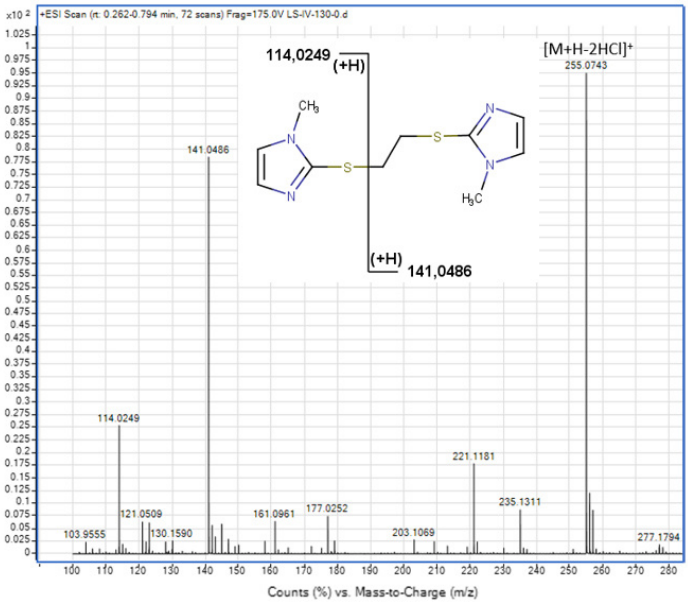
Shema 11. Sinteza derivata 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana (**3a-3c**); *i*) DCE, svjetlo ili mrak, sobna temperature, 15 dana; *ii*) Na_2CO_3, CH_2Cl_2(suhi); *iii*) Aceton/voda (1:1); *iv*) 55°C, 200mbar; *v*) Na_2CO_3 (aq), aceton/voda (1:1).

U cilju karakterizacije i potvrde strukture provedena je analiza **3a** primjenom NMR i MS tehnike. Signali imidazolnih protona u ^{1}H NMR spektru za dihidroklorid tetrahidrat **3b**, snimljeni u D_2O, bili su različiti u usporedbi s prethodno objavljenim podacima[43] za **3a** u $CHCl_3$-C_6H_6 (Slika 21). Dodatno uočeni pomak signala imidazolnih protona i N-CH_3 skupine uz odgovarajuće relativne integrale kao i u slučaju **2b** ukazuju na protoniranje imidazolskog prstena i potvrđuju predloženu strukturu (Slika 21).



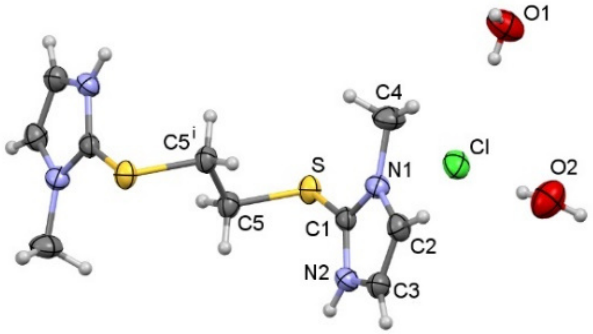
Slika 21. NMR spektri za **3b**; ^{1}H (600 MHz) (plavo), ^{13}C (151 MHz) (crveno) NMR u D_2O i za **3a** ^{1}H u $CDCl_3$-C_6D_6[43] (crno).

Analizom masenom spektrometrijom snimljeni su maseni spektri spoja **3b** u pozitivnom modu uz ionizaciju od 175V pri čemu je uočen najzastupljeniji ion pri 255,0743 m/z, a isti odgovara $[M+H-2HCl]^+$ (Slika 22). Za nestanak HCl u masenim spektrima vrijedi jednako objašnjenje kao za **2a**. Dodatno, dva formirana fragmenta na 141,0486 m/z i 114,0249 m/z ukazuju na simetrično cijepanje tioetilne skupine, čime se dodatno potvrđuje predložena struktura **3b**.



Slika 22. Maseni spektar **3b** snimljen u pozitivnom modu (175,0V) na LC-QTOF MS-MS uređaju.

Primjenom DSC-a uočava se endotermni razvučeni pik između 35°C i 70°C, koji odgovara gubitku vode, a dodatno tome u prilog idu rezultati dobiveni termogravimetrijskom analizom, gdje je uočen gubitak od 3,8 % koji odgovara teorijskoj vrijednosti sadržaja vode u **3b**. Sadržaj klorida određen je ionskom kromatografijom uz otopinu klorida kao standard, a njegov udio u **3b** iznosi 18 % te odgovara teorijskoj vrijednosti unutar eksperimentalne pogreške mjerenja. Konačna potvrda strukture spoja **3b** dobivena primjenom difrakcije rentgenskog zračenja na monokristalu (Slika 23), a detalji su opisani u poglavlju 4.3.



Slika 4. Molekularna struktura **3b** sa shemom atomskog numeriranja.

U daljnjim pokusima nakon neutralizacije **3b**, ekstrakcije, isparavanja otapala i kristalizacije sirovog ostatka iz smjese aceton/voda u omjeru 1:1 (Shema 11) dobiven je 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan u formi dihidrata (**3c**, 78,0 % , t_t $DSC_{početak}$ 65°C. Dihidrat **3c** dodatno je

dobiven i kristalizacijom čistog **3a** iz smjese aceton/voda u omjeru 1:1. TLC analizom **3c** na sloju silikagela s UV indikatorom uz mobilnu fazu amonijak, w=25%:2-propanol:toluen= 0,5:2,5:7 dobivena je *Rf* vrijednost od 0,60, što je u skladu s *Rf* vrijednosti za **3b.** Termogravimetrijskom (TGA) analizom utvrđeno je da uzorak sadrži 11,31% vode što upućuje na solvatizirani oblik, a što odgovara teorijskoj vrijednosti za dihidrat **3c**.

Kad je dihidrat **3c** osušen pri sniženom tlaku od 200 mbar i temperaturi od 55°C dobivena je bezvodna forma **3a** (Shema 11), čija *Rf* vrijednost (otopina amonijaka,w=25%:2-propanol:toluen=0,5:2,5:7) odgovara *Rf* vrijednostima za **3b** i **3c**. Promatrajući kemijske pomake protona i ugljika u NMR spektru za **3a** u DMSO-*d6* (Poglavlje 3.7.4) može se zaključiti da su slični vrijednostima za prije prikazani **3b**. Dodatna potvrda predloženih struktura dihidrata **3c** i bezvodne forme **3a** dobivena je rendgenskom difrakcijom na monokristalu (Poglavlje 4.3).

Temeljem provedenih dobiveni **2b** i **3b** ukazuju da metimazol (**1**) može biti spontano alkiliran u otopini DCM ili DCE pri sobnoj temperaturi, što je pak od svekolike važnosti poglavito ukoliko se ova klorirana otapala koriste u nekoj od faza proizvodnje, izolacije, analitičke karakterizacije ili pak tijekom istraživačkog rada s **1**. U tom kontekstu primjeni ovih otapala pri radu s **1** treba posvetiti posebna pažnja.

4.2.2. Kemizam stvaranja 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana (**3a)**

Temeljem dobivenih rezultata sve čvrste forme dimernih spojeva **2** i **3**, dobivene spontanom reakcijom metimazola s diklormetanom ili pak 1,2-dikloretanom (DCE) u blagim uvjetima mogu se smatrati potencijalnim onečišćenjima metimazola. U provedenim se pokusima DCE pokazao znatno reaktivniji te se nastojalo rasvijetliti uvjete pri kojima dolazi do stvaranja dimera **3**, kao i sveobuhvatno karakterizirati među- i finalne produkte. U tom su kontekstu provedena su ciljana sintetska, spektroskopska i računska istraživanja. Odabrani produkti strukturno su karakterizirani, a strukture su finalno potvrđene rentgenskom strukturnom analizom na monokristalu. Kristalografski su podaci dani su u poglavlju 4.3.

Iz ponovljene reakcije **1** (100 mg, 0,87 mmol) u DCE-u u mraku pri sobnoj temperaturi i vlagom nekontroliranim uvjetima tijekom 15 dana izoliran je dihidroklorid tetrahidrat **3b** (51 mg, 45,6% na proreagirani **1**) u obliku bezbojnih pločastih kristala. Dodatno, uparavanjem matične otopine do suha i pročišćavanjem kolonskom kromatografijom dobiven je uz početni **1** (36 mg, 36,0%), t_t DSC_{onset} 145 °C; (lit. t_t 144-147°C[1]) i 2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol (**6**, 12 mg, 12,1%

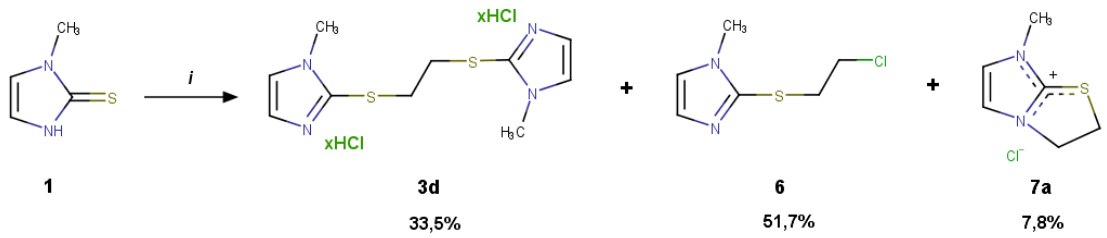
na proreagirani **1**) u formi bezbojne viskozne tekućine. *Rf*=0,76 (dikloroetan: aceton = 8:2), *Rf*= 0,66 (amonijak, w= 25%: 2-propanol: toluen= 0.5:2.5:7), MS-QTOF: m/z: $[M+H]^+$ 177.0266, $C_6H_9N_2SCl$). Njegovo je stvaranje bilo predvidljivo, jer je u reakciji **1** s DCM izoliran analogan klormetil derivat.[38]

Provođenjem iste reakcije u vrijućem DCE s mravljom kiselinom kao kootapalom tijekom 17 sati dobiven je **3a** u manjem iskorištenju (24,2 % u odnosu na 45,6%), ali je iskorištenje **6** povećano s početnih 12,1 % na 73,5 %. Drugi produkti pri ovim uvjetima reakcije nisu uočeni.

Kada je reakcija metimazola (mjerilo 0,88 mmol) provedena u suhom, vrijućem DCE tijekom 11 sati (Shema 12) izolirani, oprani i osušeni sirovi produkt (600 mg) prema NMR analizi (D_2O) smjesu 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol [2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorida (**7a**, 20 % u smjesi, tj. 7,8 % isk.) (Slika 9) s 1,2- bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidrokloridom (**3d**, 80 % u smjesi, tj. 33,5 % isk.).

Iz osušenog sirovog produkta izoliran je kromatografijom na koloni silikagela samo **3d** (480 mg, 33,5 %, t_t DSC_{onset} 217°C) u formi bezbojnih kristala. TLC: *Rf*=0,49 (diklormetan: metanol: mravlja kis.=8:1:0,5), MS-QTOF: $[M+H-2HCl]^+$ 255,0743, $[M-2HCl]^+$ 254,066, $C_{10}H_{14}N_4S_2$. Čistoća (HPLC): 98%, RRT: 20,518.

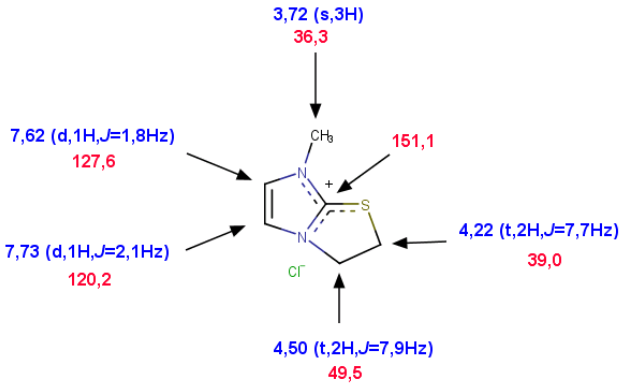
S druge strane, iz izvornog matičnog luga izoliran je kromatografijom na koloni silikagela kloretiltio-derivat **6** (800 mg, 51,7 %)u obliku bezbojnog viskoznog ulja.



Shema 12. Sinteza spojeva **3d**, **6** i **7a** iz **1** u vrijućem DCE, *i*) DCE, refluks, 11 sati.

Čekajući red na analize, utvrđeno je da je **6** vrlo nestabilna supstancija. Detaljnom studijom dokazano je da pri sobnoj temperaturi nakon 21 dan kvantitativno izomerizira u imidazotiazolijum klorid **7a** u formi igličastih kristala (98,0 % , t_t DSC_{onset} 241°C, TLC: *Rf*=0,49 (diklormetan: metanol: mravlja kis.=8:1:0,5), ESI MS-QTOF: $[M-Cl]^+$ 141,0485, $C_6H_9N_2SCl$. Strukture kloretiltio-derivata **6** i imidazotiazolijum klorid**a** **7a** određena je

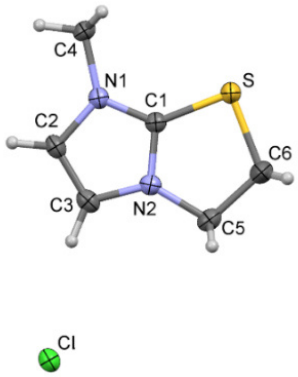
primjenom 1-D, 2-D ^{1}H NMR i ^{13}C NMR-a te spektrometrije masa (Slika 24 i Poglavlja 3.7.7. i 3.7.8.).



Slika 24. Kemijski pomaci za **7a** u DMSO-*d6* ^{1}H (plavo) i ^{13}C (crveno) u ppm pri 25°C.

Ključno je primijetiti da ^{1}H i ^{13}C kemijski pomaci ne mogu potvrditi točnu poziciju pozitivnog naboja u **7a**. Dodatno isto potvrđuju i podaci duljine veza u kristalnoj strukturi (opisani u poglavlju 4.4.) te je iz tog razloga navedenu strukturu ispravno prikazivati s delokaliziranim pozitivnim nabojem tioamidne skupine, kako je i prikazano na Slici 24.

Struktura **7a** dodatno je potvrđena je rendgenskom difrakcijskom analizom na monokristalu (Slika 25. Poglavlje 4.3.)



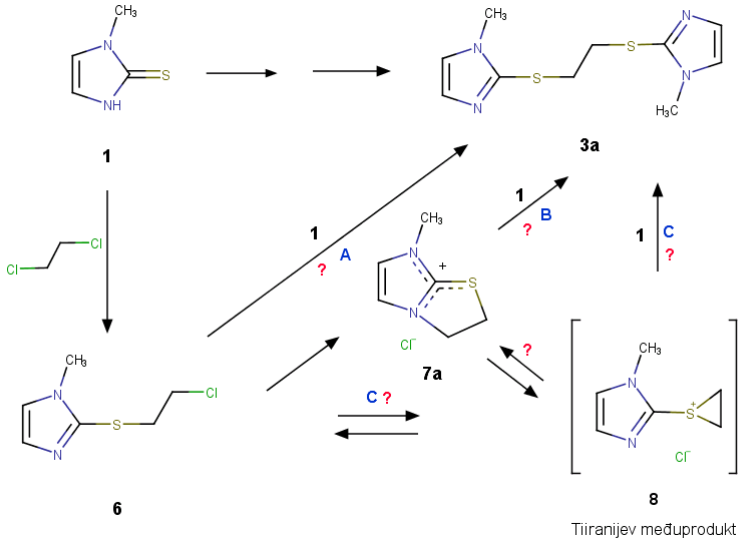
Slika 25. Molekulska struktura **7a** sa shemom atomskog numeriranja.

Dokaz stvaranja kloretiltio- derivata **6** ima dvojaki značaj. Kako po strukturi pripada klasi sumporovih „mustard" spojeva koji, s jedne strane, imaju potencijalna genotoksična svojstva[172] te kao takav predstavlja potencijalni sigurnosni rizik. S druge strane, 2-kloretiltio- spojevi poznati su kao prekursori vrlo reaktivnih tiiranijevih (episulfonijevih) iona preko kojih se često odvija kemizam supstitucija u toj klasi spojeva.[173,174] U literaturi su dobro opisani visoko reaktivni i uz rijetke iznimke,[175] vrlo nestabilni ioni tiiranijevi ioni.[176,177,178] Neki od njih

nedavno su predloženi kao važni sintetski međuprodukti u regio- i stereoselektivnim sulfenoaminacijama tioimidazola s alkenima.[179] Također, mogu se pronaći kao međuproizvodi s genotoksičnim potencijalom.[172] Stoga prisutnost kloretiltio- derivata **6** otvara mogućnost stvaranja dimera **3** preko tiiranijeva iona **8**.

Imajući u vidu stvaranje kloretiltio- derivata **6** i imidazotiazolijum klorida **7a** u istoj reakciji te nedvosmisleno određene njihove strukture, kao i dokazanu izomerizaciju **6** u **7a**, potonji u stvari predstavlja, prema našem saznanju, prvi izolirani, pri sobnoj temperaturi stabilan, izomer tiiranijeva iona **8**, kojem je struktura određena rentgenskom strukturnom analizom.

S time u rukama predloženi su sintetski putovi prema **3a** mogu uključivati izravni nukleofilni napad **1** na **6** (Shema 13, put A), zatim nukleofilni napad **1** na **7a** (Shema 13, put B), ili pak nukleofilni napad **1** na vrlo nestabilni tiiranijev (episulfonijev) međuprodukt **8** (Shema 13, put C).



Shema 13. Potencijalni sintetski putevi iz **1** prema **3a**.

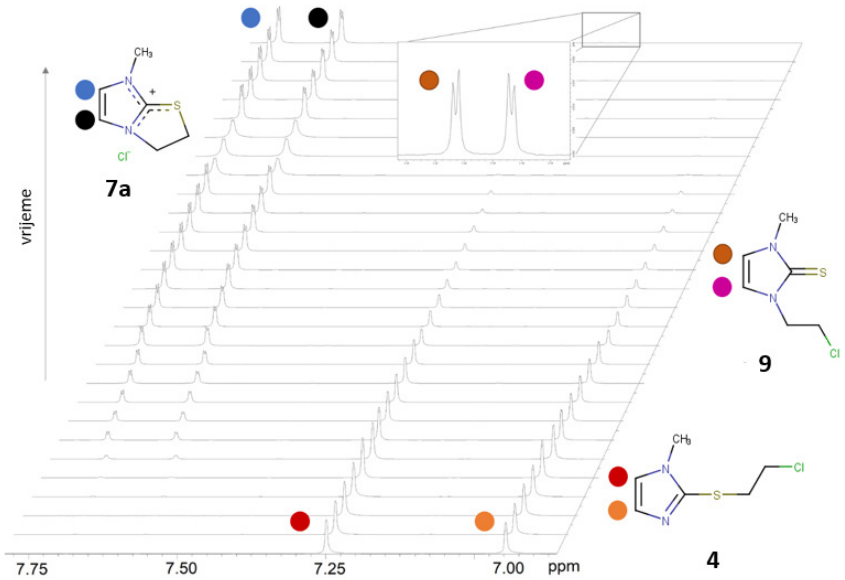
Na temelju svih ovih saznanja bilo je nužno razlučiti kojim od tri navedena puta ide transformacija **1** u **3a** te su tom smjeru pokrenute daljnje studije.

*NMR studij transformacije **6** u 7-Metil-2H,3H,7H-imidazol[2,1-b]tiazol-4-ijum klorid (**7a**)*

S ciljem otkrivanja je li transformacija kloretiltio- spoja **6** u stabilan imidazotiazolium klorid **7a** ide preko preko tiiranijevog međuprodukta **8**, ova je reakciju praćena ^{1}H i ^{13}C NMR-om u DMSO-d_6 pri sobnoj temperaturi snimanjem vremenski ovisnih protonskih spektra do završetka reakcije. Tijekom razdoblja od tri mjeseca nisu uočeni signali koji bi upućivali na prisustvo

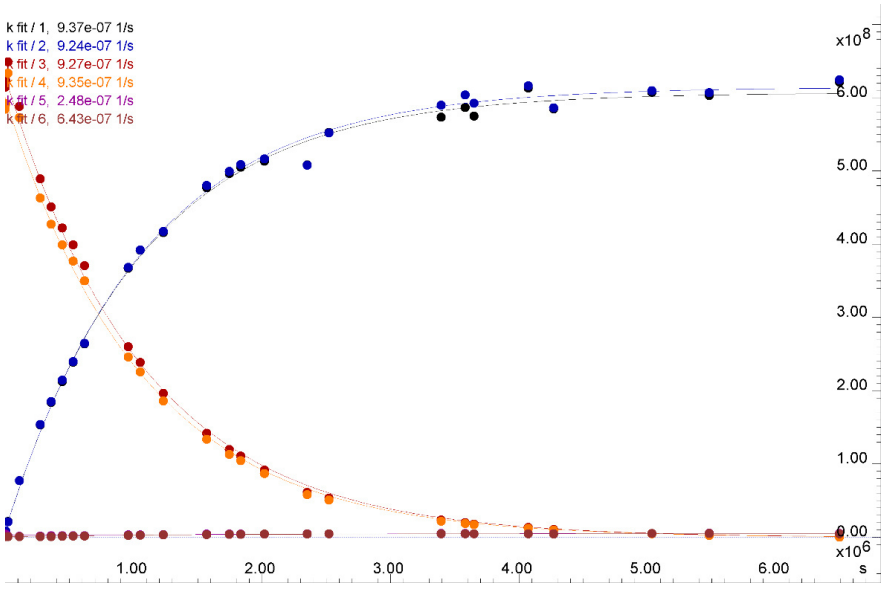
tiranijevog međuprodukta **8**. S tim u svezi u ^{13}C spektrima također nisu uočeni signali u području oko 40 ppm gdje su Dohn i Casida izvijestili o tiranijevom ionu nastalom iz derivata cisteina u superkiselim uvjetima.[173] Međutim, potvrđena je spontana transformacija **6** u **7a**, a dodatno analizom spektara uočeno je već nakon tri dana pojavljuje dodatni skup signala pri vrlo niskim koncentracijama (cca 3%) koje pripadaju dosad nepoznatom izomeru. Kasnije, taj je spoj sintetiziran i potvrđeno je riječ o 1-kloretil-2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tionu (**9**) (Poglavlje 3.7.11.).

Iz ovih se podataka moglo zaključiti da a) ili mehanizam ne uključuje tiiranijev ion **8** kao međuprodukt, ili b) da se **8** zbog svoje reaktivnosti prebrzo razgrađuje da bi se mogao detektirati NMR spektroskopijom.



Slika 5. Vremenski ovisni protonski spektari u kojem su vidljivi imidazolni protoni u smjesi **6**, **7a** i **9**.

Kvantifikacijom integrala dobro odvojenih imidazolnih signala za sva tri promatrana spoja određena je kinetika transformacije (Slika 26), a konstantne brzina izračunate su pomoću softvera Bruker Dynamics Center V2.6.3 (Slika 27) . Transformacija **6** u spojeve **7a** i **9** završava nakon 75 dana s prividnom ravnotežom u relativnim koncentracijama od 99,1 % za **7a** i 0,94 %, za **9**.



Slika 6. Kinetika transformacija prikazana krivuljom vrijednosti intervala za dva imidazolna protona za spojeve **6** (crveno narančasto), **7a** (plavo) i **9** (smeđe).

Kako bi se opisao uočeni pad intenziteta signala **6** i porast signala koji pripadaju **7a** i **9** upotrebljen je model uzastopnih reakcija prvog reda s reverzibilnim drugim korakom (Shema 14).[180]

$$\mathbf{6} \xrightarrow{k_1} \mathbf{7a} \underset{k_3}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \mathbf{9}$$

Shema 14. Kinetički model izomerizacije kloretiltio- derivata **6** u **7a** i **9**.

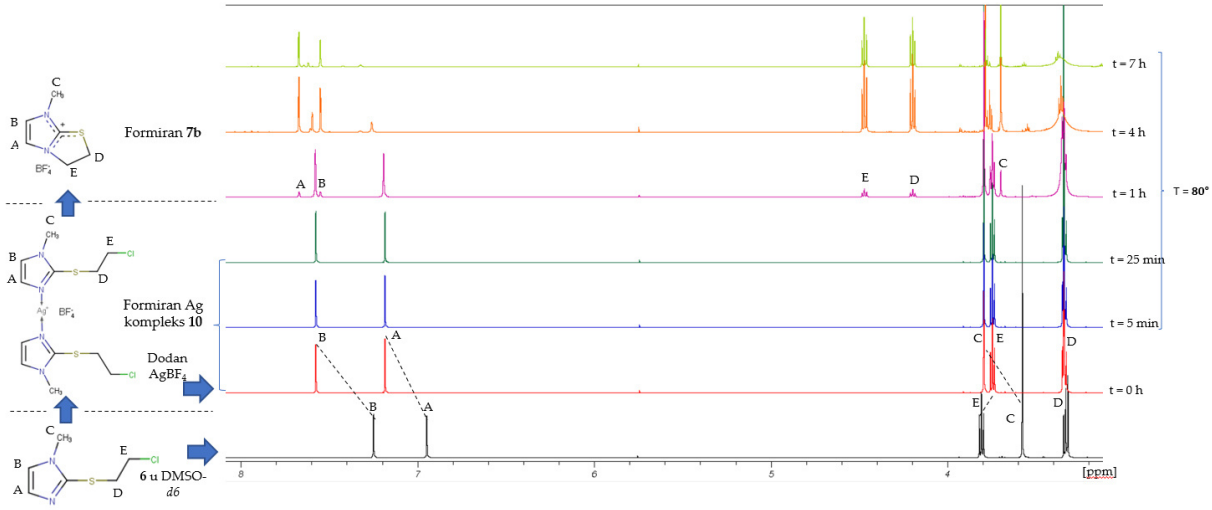
Dobivene konstante brzine izračunate su kao prosječne vrijednosti iz dva odabrana signala imidazola i za obe su iznosile $k_1 = k_2 = 9{,}31 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ s vrijednošću R2 od 0,998 za prvi korak reakcije tj transformacija **6** u **7a** i **7a** u **9**, dok je k_3 iznosio $6{,}43 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ s vrijednošću R2 od 0,972 za povratni korak **9** u **7a**.

*Pokušaj detekcije tiiranijevog međuprodukta **8** uz $AgBF_4$*

Budući da tijekom praćenja transformacije **6** u **7a** NMR spektroskopijom nije utvrđeno prisustvo tiiranijeva iona **8**, primijenjena je literaturno poznata metoda hvatanja (trapping) **8** pomoću srebrnog tetrafluoroborata pri temperaturi ispod 0°C.[181] U okviru tehničke izvedivosti pokusa DMSO-d_6 je zamijenjen toluenom–d_8 u kojem je otopljen **6**, a temperatura je snižena na -20°C. Tada je snimljen početni spektar i zatim je dodan srebrni tetrafluroborat. Odmah nakon

dodavanja srebrne soli došlo je do stvaranja bijelog taloga i u svim narednim protonskim spektrima koji su snimani tijekom 3 sata uz postupno povećanje temperature na 25°C nisu uočeni signali koji odgovaraju početnom **6** ili bilo kojem drugom spoju, jasno sugerirajući da nastali talog nije topljiv u toluenu-d_8. Na kraju procesa je u smjesu dodana mala količina DMSO-d_6 nakon čega je talog otopljen. U konačnici na temelju provedenog pokusa moglo se zaključiti da nije uočen **8** već je neočekivano došlo do formiranja taloga nepoznatog sastava.

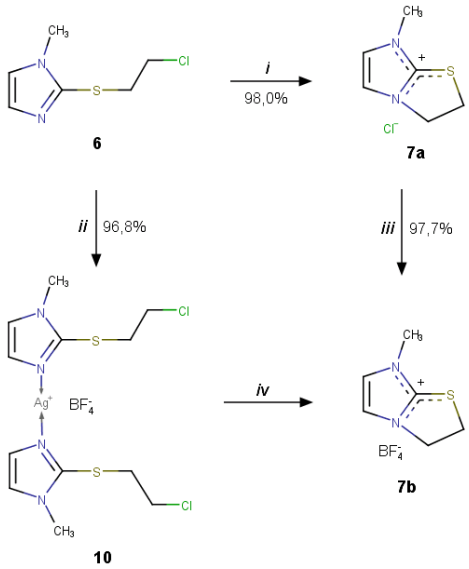
Činjenica da je dobiveni talog nepoznatog sastava bio topljiv u DMSO-d_6 sljedeći je pokus proveden u DMSO-d_6, u kojem je, pri sobnoj temperaturi, otopljen kloretiltio-derivat **6** te je ponovo je snimljen protonski spektar (Slika 28, crni spektar) nakon čega je dodan $AgBF_4$. Njegov dodatak u otopinu **6** odmah je dovelo do promjena u kemijskih pomacima signala (Slika 28, crveni spektar). Kasnije, je ova tvar sintetizirana i okarakterizirana kao Ag-kompleks **6**, tj. bis-{2-[(kloroetil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebrni(I)tetrafluoroborat (**10**). Prateći dalje spektar tijekom narednih 40 minuta nije bilo promjene (Slika 28, zeleni spektar). Stoga je temperatura povećana na 80°C pri čemu je uočena pojava nove skupine signala (Slika 28, ljubičasti spektar). Tijekom narednih 7 sati signali Ag-kompleksa **10** su potpuno nestali, a signali novog spoja su potpuno dominirali spektrom. Kasnije je nakon sinteze i sveobuhvatne karakterizacije utvrđeno da uočeni signali odgovaraju 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum tetrafluoroboratu (**7b**). Također i tijekom ove dodatne studije nisu otkriveni signali koji bi pripadali tiiranijevom međuproduktu **8**.



Slika 28. ^{1}H NMR spektri transformacije **6** u **10** i **7b.**

Sintetskom potvrdom NMR studije, tj. reakcijom **6** i **7a** sa srebrovim tetrafluoroboratom u metanolu pri sobnoj temperaturi (Shema 15) pripravljeni su srebrov kompleks sa kloroetiltio-derivatom **6**, tj. bis-{2-[(kloroetil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebrni(I)tetrafluoroborat (**10,**

96,8 %, t_t DSC$_{početak}$ 133°C), odnosno 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazo[2,1-*b*]tiazol-4-ijum tetrafluoroborat (**7b,** 97,7 %, t_t DSC$_{početak}$ 135 °C) u obliku bezbojnih igličastih kristala.



Shema 15. Prikaz transformacije **6** u **7a** i **10, t**e **7a** u **7b**; *i*) Sobna temperatura, 21 dan; *ii*) $AgBF_4$, MeOH, sobna temperatura, 24 sata; *iii*) $AgBF_4$, MeOH, sobna temperatura, 1 sat; *iv*) DMSO-d_6, 80°C, 7 sati.

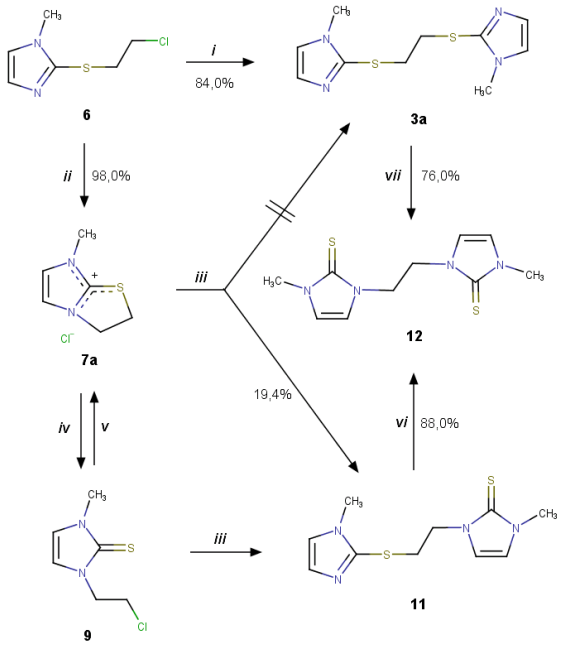
Struktura oba spoja određena je spektroskopskim metodama i potvrđena je rentgenskom strukturnom analizom (Vidi poglavlje 4.3) Treba napomenuti da je tako pripravljen **7b** imao ista spektralne karakteristike, kao i onaj iz NMR studije, gdje je srebrov kompleks **10** grijan u DMSO- d_6.

U skladu s provedenim NMR pokusima predloženi put transformacije **6** u **3a** preko tiranijevog intermedijera **8** (put B, Shema 13) nije izgledan.

Razlučivanje sintetskog puta i studije izomerizacije

Prethodno je dokazano da **6** nije u ravnoteži s tiranijevim međuproduktom **8**, a ovaj pak sa stabilnim imidazotiazolijvim kloridom **7a** (put B, Shema 13), ali i da kvantitativno izomerizira u imidazotiazolijev klorid **7a**. Stoga je pažnja usmjerena na razmatranje hipotetičkog puta C (Shema 13), tj. na reakciju imidazoltiazolijeva klorida **7a** s metimazolom (**1**). Ona je provedena u vrijućem acetonitrilu tijekom 10 sati. Međutim, umjesto očekivanog dimera **3a** preko tiiranijeva iona **8**, dobiven je 2,3-dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tioetil]-1*H*-imidazol-2-tion (**11**) kao bijeli kristalni produkt u 19,4 % iskorištenju (t_t DSC$_{početak}$101,7°C; EI-

MS-QQQ: $[M+H]^+$ 255,0) (Shema 16). Struktura mu je utvrđena spektroskopskim metodama, a potvrđena rentgenskom strukturnom analizom njegova monokristala.



Shema 16. Izomerizacija u nizovima: **6** → **7a** ↔**9**, **6** → **3a** → **12** te **7a** → **11** → **12**; *i*) **1**, MeCN, HCOOH, refluks, 43 sata; *ii*) sobna temperatura, 21 sat; *iii*) **1**, MeCN, refluks, 10 sati; *iv*) MeCN, refluks, 10 sati; *v*) spontano, sobna temperatura; *vi*) 170°C, 10 sati: *vii*) 170°C, 17 sati.

Neočekivano stvaranje *S,N*-dimera **11** otvorila je pitanje tijeka reakcije. Zbog toga je provedena slijepa proba, tj. analogna reakcija **7a** u vrijućem acetonitrilu ali bez **1**. Nakon 10 sati dobiven je već prije spomenuti 1-kloretil-2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tionu (**9**) u iskorištenju od 25,0%). t_t $DSC_{početak}$ 65 °C; EI-MS-QQQ: $[M+H]^+$ 177,6). Nisko iskorištenje može se objasniti postojanjem ravnoteže između **7a** i **9** budući da nije primijećena promjena u kromatogramu nakon četvrtog sata reakcije. Struktura mu je utvrđena spektroskopskim metodama. Pokušaji pripreme monokristala spoja **9** nisu bili uspješni iz razloga što on, vrlo brzo nakon izolacije, izomerizira pri sobnoj temperaturi, kako u čvrstom stanju tako i u otopini natrag u **7a**, što je u skladu s podacima iz kinetičke studije.

Tako je snimanjem ^{1}H NMR-a otopina kromatografski čistog uzorka *N*-kloretil derivata **9** u DMSO-d_6 pri sobnoj temperaturi utvrđeno da već nakon 8 sati uzorak sadrži još samo 49 % **9**, ali i 51 % **7a** što upućuje na brzu izomerizaciju. Nakon 18 sati u protonskom spektru prisutni su samo signali **7a** čime se potvrđuje potpuna izomerizaciju od **9** u **7a**.

Ovom izomerizacijom ujedno je i potvrđena struktura *N*-kloretil derivata **9**.

Dodatno, slijedeći metodu Silve i suradnika[38] provedena je termička izomerizacija N-CH_2CH_2-S dimera **11** u krutom stanju pri 170°C tijekom 10 sati pri čemu je dobiven N-CH_2CH_2-N izomer, tj. 1,2-bis (2,3-dihidro-3-metil-1*H*-imidazol-2-tion-1-il)etan (**12**) u iskorištenju od 88,0%.). t_t $DSC_{početak}$ 195°C (Literatura 194-195°C[42]); EI-MS-QTOF: $[M+H]^+$ 254,37. Struktura mu je određena spektroskopskim metodama, a dodatno potvrđena analognom izomerizacijom **3a**, pri čemu je N-CH_2CH_2-N izomer **12** dobiven u iskorištenju od 76 %. Talište, *Rf* vrijednosti i NMR podaci bili su u skladu s podacima prethodno navedenim pod metodom A.

Budući da tijekom provedenih studija nisu pronađeni ni sintetski niti spektroskopski dokazi o postojanju tiiranijeva međuprodukta **8**, moglo se zaključiti da stvaranje dimera **3a** ne slijedi ni sintetski put B niti C (Shema 13) ili je **8** nestabilan pri čemu se ne može detektirati NMR spektroskopijom.

U konačnici ostao je za promotriti put A (Shema 13) pri čemu se **6** uz prisustvo **1** direktno transformira u **3a**, bez prisutnog bilo kojeg međuprodukta. Stoga je provedena je reakcija **6** s **1** u vrijućoj, mravljom kiselinom zakiseljenoj, otopini acetonitrila tijekom 43 sata pri čemu je dobiven **3a** u 84,0 % iskorištenju, a talište, *Rf* vrijednosti i spektroskopski podaci bili su u skladu s prije u tekstu prikazanim podacima.

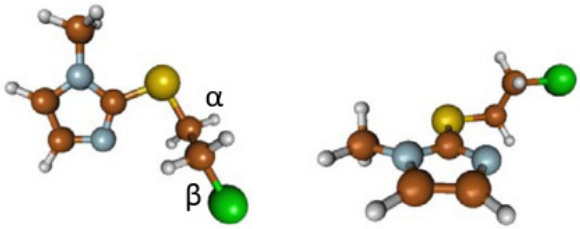
Važno je napomenuti da tijekom reakcije nije uočeno stvaranje imidazotiazolinijeva klorida **7a**, što ide u prilog činjenici da je tijekom reakcije dušikov atom protoniran te je na taj način spriječena intramolekularna ciklizacija **6** u **7a**.

Ovom je reakcijom potvrđeno da alkiliranje metimazola s 1,2-dikloretanom ide preko kloretiltio-derivata **6**, tj. da slijedi sintetski put A do dimera **3a** (**1** → **6** → **3a**) (Shema 13). No i dalje je ostalo za razlučiti je li je tiiranijev međuprodukt **8** prisutan u bilo kakvom scenariju procesa. Stoga su provedene računalne studije s ciljem utvrđivanja vjerojatnosti prisustva **8** u promatranoj klasi spojeva.

4.2.3. Računalna studija

Prvo je promotrena struktura kloretiltio-derivata **6** obzirom da se ona smatra prekursorom tiiranijeva međuprodukta **8**. Spoj **6** prilično je dobro definiran sustav i sadrži čvrstu *N*-metilimidazolnu jedinicu te fleksibilan kloretilni fragment povezan preko tiolne veze na

položaju 2. U polarnim aprotičnim otapalima najstabilnija geometrija prikazana iz dva različita kuta vidi se na Slici 29.

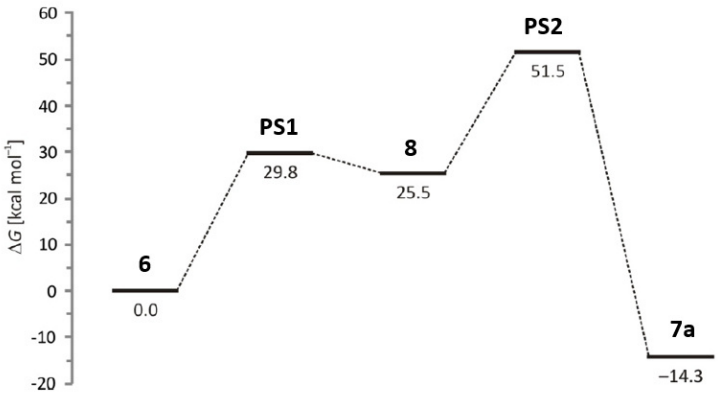


Slika 29. Prikaz molekule **6** u polarnim aprotičnim otapalima.

Reaktivnost ovog spoja temelji se na 2 činjenice: (a) veza ugljik–klor najslabija je veza u spoju te je klor dobra izlazeća te (b) molekula sadrži 2 nukleofilna centra, sumpor iz tiola te nezasićeni dušik iz imidazolnog prstena. U kontekstu toga, može doći do interne pregradnje u kojoj β-atom ugljika može provesti elektrofilni napad na neki od spomenuta dva atoma uz izlazak Cl^- aniona.

*Transformacija **6** u **7a** preko tiiranijeva međuprodukta **8***

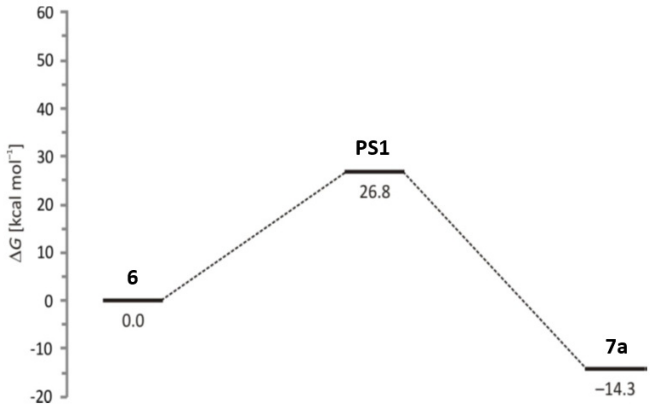
Promotrena je izvedivost transformacije **6** u **7a** preko tiiranijevog međuprodukta **8**. Reakcija napada na sumpor je izvediva i povezana s barijerom od 29,8 kcal/mol do prijelaznog stanja PS1 koje je karakterizirano djelomično stvorenom C–S vezom (2,08 Å) i djelomično puknutom C–Cl vezom (2,61Å). Tim prvim stupnjem reakcije zaista nastane nestabilan **8**, čija energija je, nakon izlaska kloridnog aniona, svega 4,3 kcal/mol stabilnija u odnosu na prijelazno stanje PS1, odnosno čak 25,5 kcal/mol viša u odnosu na reaktant **6** (Slika 30).



Slika 30. Reakcijski profil transformacije **6** u **7a** preko **8** uz dva prijelazna stanja, PS1 i PS2.

Ovaj dio reakcije podržava očekivanja da se radi o vrlo nestabilnom intermedijeru, koji je kratko-živući i teško vidljiv tehnikama poput NMR-a. Da bi došlo do stvaranja **7a** mora doći do pucanja jedne od C–S veza u tročlanom prstenu i stvaranja nove veze s dušikom u imidazolnom prstenu. Za to je potrebno novih 26 kcal/mol, što je i više nego u prvom koraku te povećava ukupnu barijeru reakcije na $\Delta G^{\ddagger}$ = 51,5 kcal/mol, a što je neizvedivo pri normalnim uvjetima i sobnoj temperaturi čime cjelokupni profil sugerira neizvedivost reakcije.

Alternativni pristup je napad nukleofilnog β-ugljika u **6** direktno na nezasićeni dušik u imidazolnom prstenu pri čemu se dobiva **7a** bez međuprodukta **8** (Slika 31). Direktna reakcija transformacije **6** u **7a** povezana je s kinetičkom barijerom od $\Delta G^{\ddagger}$ = 26,8 kcal/mol, što je za cijelih 3,0 kcal/mol manje nego u prvom slučaju, a što se prevede u otprilike 160 puta bržu reakciju ovim putem. Nadalje, reakcija odmah proizvede **7a** i to na egzergoni način, pri čemu reakcijska Gibbsova energija iznosi ΔGR = –14,3 kcal/mol, što je dodatan argument izvedivosti i spontanosti ovog procesa.

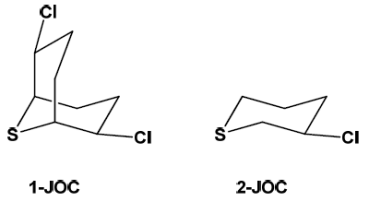


Slika 31. Reakcijski profil transformacije **6** u **7a** preko prijelaznog stanja PS1.

Razlika u reaktivnosti sumporovog i dušikovih atoma u molekuli **6** mogu objasniti zašto se dobiva **7a**. Atom klora već je inicijalno "pripremljen" za izlaz kao anion te je njegov atomski naboj –0,11 |e|. No, zanimljivo, sumporov atom nije posebno nukleofilan te je njegov naboj čak pozitivan i iznosi +0,27 |e|. Oba dušika u imidazolnom prstenu posjeduju određenu nukleofilnost, pri čemu N-atom s metilnom skupinom ima naboj –0,42 |e|, dok je drugi N-atom još i nukleofilniji s nabojem –0,59 |e|, što objašnjava zašto je reakcija najizglednija upravo na tom mjestu.

Dobiveni računski podaci stavljeni su u kontekst drugih objavljenih supstrata za koje je poznato da stvaraju tiiranijev ion. U sustavima gdje nema eletrofilnim mjesta dosita dolazi do formiranja

tiiranijevog intermedijera, a takvom tipu internih ciklizacija doprinosi i kutna napetost polaznog spoja (Slika 32).[183]



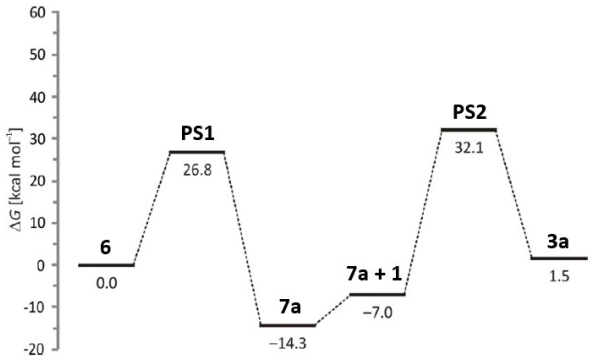
Slika 32. Primjer molekula 1-JOC i 2- JOC koji su modelni primjer za formiranje tiiranijevog iona.

Na spoju 1-JOC i 2-JOC provedena je računska analiza te je prvo obrađena molekula 2-JOC. Računi pokazuju da je u slučaju formiranja tiiranijevog međuprodukta reakcija povezana s kinetičkom barijerom $\Delta G^{\ddagger}$ = 21,0 kcal/mol, što je za 8,8 kcal/mol manje nego u slučaju formiranja **6** ($\Delta G^{\ddagger}$ = 29,8 kcal/mol) (Slika 32). Dodatno nakon izlaska Cl^{-} aniona, reakcijska Gibbsova energija je pozitivna ΔGR = 13,3 kcal/mol, što opravdava nastavak reakcije i vjerojatno konačnu egzergonost nakon eventualnog uvođenja eksternog nukleofila. Spoj 2-JOC koji je manje napeti sustav u odnosu na 2-JOC ima manje povoljnu reakciju stvaranja tročlanog prstena te ima nešto višu barijeru $\Delta G^{\ddagger}$ = 23,9 kcal/mol te još manju termodinamičku izvedivost procesa ΔGR = 16,7 kcal/mol.

U zaključku, rezultati dobiveni NMR studijom i računskim kalkulacijama upućuju da reakcija ne ide preko tiiranijeva međuprodukta **8** već dolazi do direktne transformacije **6** u **7a**. Dodatno zbog visoke stabilnosti **7a**, pri promatranim uvjetima i visoke energijske barijere teško je izvjestan prijelaz u **8**.

*Reakcija **6** s **1** kao nukleofilom i dobivanje **3a***

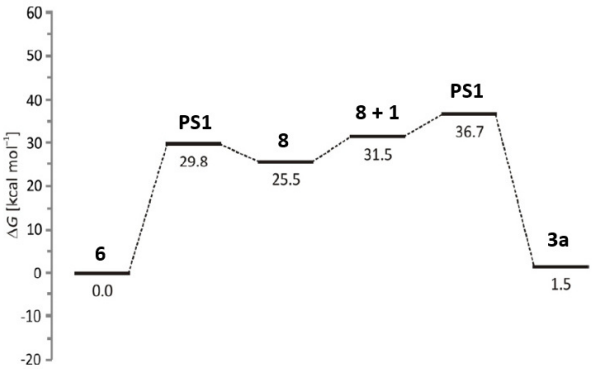
Prvo je promotrena reakcija u kojoj se već iz **6** formira **7a** nakon kojeg slijedi napad **1** i dobivanje **3a**, što bi odgovaralo sintetskom putu B (Shema 13, Slika 33). Važno je istaknuti da **1** pri promatranim uvjetima postoji u formi NH tautomera zbog veće stabilnosti u odnosu na alternativni SH tautomer, koji je za 14,1 kcal/mol manje stabilan, što je u skladu s već prije utvrđenim.



Slika 33. Reakcijski profil transformacije **6** u **7a** preko prijelaznog stanja PS1, te do **3a** preko prijelaznog stanja PS2.

Nakon formiranog peteročlanog prstena **7a** i dobitka od ΔGR = –14,3 kcal/mol u reakcijskoj energiji, ulazak **1** zahtjeva 7,3 kcal/mol i dodatnih 39,1 kcal/mol da bi se stiglo do prijelaznog stanja PS2 koje opisuje kidanje N–C veze u peteročlanom prstenu **7a** (2,06 Å) te stvaranje nove C–S veze s eksternim nukleofilom (2,38 Å). Time ovaj korak reakcije postaje neizvediv s ukupnom kinetičkom barijerom od $\Delta G^{\ddagger}$ = 46,4 kcal/mol, Dodatno, nastali produkt **3a** je, u odnosu na energiju početnog spoja **6** čak i endergon na ΔGR = 1,5 kcal/mol, što dodatno otežava reakciju. Razlog ovako nepovoljnom profilu je u velikoj stabilnosti spoja **7a** od –14,3 kcal/mol u odnosu na početni spoj **6**, što onda otežava svaki daljnji korak. Stoga se, prilično uvjerljivo, može tvrditi da konačni spoj **3a** ne nastaje iz prethodno formiranog **7a** čime sintetski put B (Shema 13) postaje neizvediv.

Iako je sintetski put C (Shema 13) u kojem eksterni nukleofil **1** reagira s početnim spojem tek nakon formiranja tiiranijevog međuprodukta **8** energijski nepovoljan svejedno je proučen i prikazan na Slici 34.

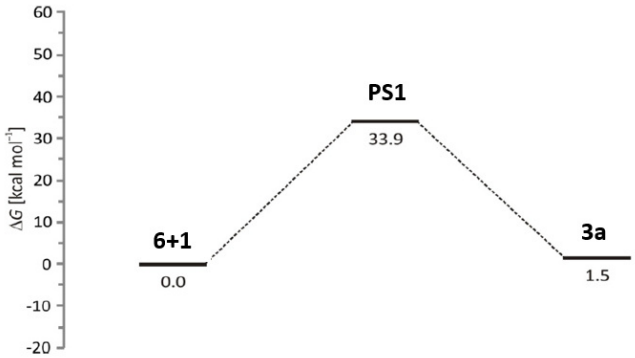


Slika 34. Reakcijski profil transformacije **6** u **3a** preko **8**.

U prvom dijelu reakcije nastaje tiiranijev međuprodukt **8** preko energetske barijere od 29,8 kcal/mol, koji je, nakon izlaska Cl^- aniona, 25,5 kcal/mol u energiji iznad početnog **6**. Nakon toga, ulazak **1** u reakcijski kompleks s **8** zahtjeva 6,0 kcal/mol te dodatnih 5,2 kcal/mol za dolazak do prijelaznog stanja PS2 s ukupnom kinetičkom barijerom od $\Delta G^{\ddagger}$ = 36,7 kcal/mol, koje opisuje kidanje C–S veze u prstenu (2,07 Å) i stvaranja nove C–S veze s **1** (2,71 Å). Nakon toga, reakcijom nastaje očekivani produkt **3a**, ponovno uz reakcijsku energiju od ΔGR = 1,5 kcal/mol. Ako se bolje promotri korak formiranja **8** reakcijski sustav, može izabrati (a) investirati 4,3 kcal/mol te se preko PS1 vratiti u **6** na energiju od ΔGR = 0,0 kcal/mol, ili (b) investirati značajno više 11,2 kcal/mol te preko PS2 dati produkt **3a** uz nepovoljniju energiju od ΔGR = 1,5 kcal/mol. Očito je da će se sustav preferirano slijediti povratak u inicijalni spoj **6**, čime sintetski put C (Shema 13) postaje također slabo izvediv.

Sintetski put A (Shema 13) ide direktnim napadom **1** na **6** pri čemu se dobiva **3a**, a prikazan je na Slici 35.

U toj reakciji potrebno je 8,6 kcal/mol za dovođenje eksternog nukleofila **1** u reakcijski kompleks s polaznim **6** te 25,3 kcal/mol za dolazak do prijelaznog stanja PS1 koje opisuje kidanje C–Cl veze (2,36 Å) te stvaranje nove C–S veze s **1** (2,46 Å). Reakcijom kroz jedan korak direktno nastaje konačni spoj **3a**, uz ukupnu reakcijsku Gibbsovu energiju, od ΔGR = 1,5 kcal/mol. Ovaj proces je, dakle, izvediv i jednostavan, a ukupna kinetička barijera od $\Delta G^{\ddagger}$ = 33,9 kcal/mol svakako daje očekivani produkt **3a**.



Slika 35. Reakcijski profil transformacije **6** u **3a** u direktnoj reakciji s **1**.

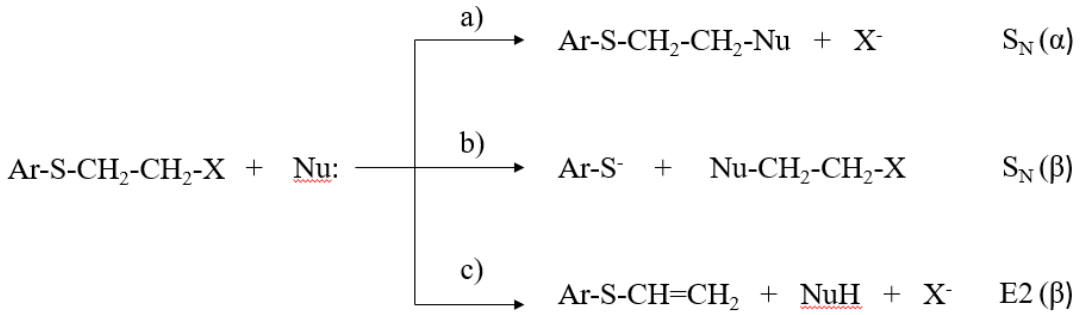
U zaključku dobiveni rezultati primjenom računskim metoda u dobrom su skladu s eksperimentalno, tj. sintetski utvrđenim podacima i potpomažu činjenicu da dimerni spoj **3a** nastaje izravnom reakcijom kloretiltio- derivata **6** s **1** (sintetski put A, Shema 13).

*Ravnoteža između **7a** i **9***

Također je modelirana konverzija **7a** u **9** u polarnim aprotičnim otapalima. Utvrđeno je, da kloridni anion kao nukleofil napada ugljik iz S-C veze pri čemu dolazi do kidanja S-C veze te se kao produkt dobije **9**. Energija aktivacije za tu reakciju je relativno visoka i iznosi 26,1 kcal/mol. Stoga je reakcija termodinamički nepovoljna, jer je reakcijska Gibbsova energija endergona za +1.4 kcal/mol. To upućuje da je produkt **9** manje stabilan od **7a**, što uz relativno visoku energiju aktivacije u potpunosti potvrđuje da će se reakcija **7a** u **9** odvijati tek na povišenim temperaturama, dok pri sobnoj temperaturi dolazi do spontanog povratka u **7a**.

4.2.4. Reakcije **6** s drugim nukloefilima

Nastavno na istraživanje reaktivnosti klortiltio- derivata **6** s metimazolom (**1**), proučen je tijek njegovih reakcija u prisustvu drugih nukleofila. Promatrajući literaturno objavljene podatke reakcije su nukleofilima mogu slijediti tri reakcijska puta, a) supstituciju na α ugljikovom atomu pri čemu se dobivaju α supstituirani derivati, S_N (α) (Shema 17, a), zatim b) supstitucijom na β ugljikovom atomu uz izdvajanje pobočnog lanca – CH_2-CH_2-X, S_N (β) (Shema 17 b) i c) eliminaciju halogena na α ugljikovom atomu pri čemu se dobiva nezasićeni pobočni lanac, E2(β) (Shema 17, c).[182]

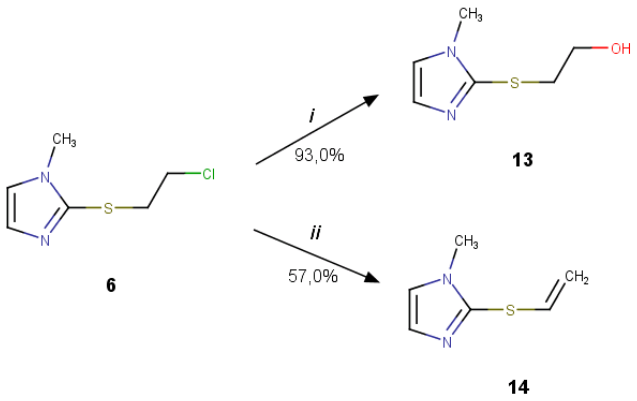


Shema 17. Prikaz reakcijskih puteva koje može slijediti derivat **6**.

U proučavanim reakcijama na supstratima koji su sadržavali β-kloroetil sulfid glavnina je slijedila nukleofilnu supstituciju, predominantno S_N (α) kao u ranije opisanom slučaju dobivanja **3a,** dok je 1,2- eliminacija E2 (β) uočena u dva slučaja i to u reakciji p-fenilmerkaptoetil fenolata s kalijevim etoksidom u smjesi otapala EtOH/DMSO pri čemu su dobiveni fenil vinil sulfidi[174] i u drugom slučaju kada su korišteni p-kloretil-p-tolilsufidi kao supstrati u otopini EtOH/EtONa pri temperaturi od 40-65°C.[184]

S ciljem dobivanja više saznanja o tome koji reakcijski put slijedi supstrat koji je imidazolne građe prvo je provedena reakcija **6** u 10%-tnoj otopini $NaHCO_3$ pri povišenoj temperaturi. Nakon 2 sata pri 80°C dolazi do formiranja nove mrlje, a nakon izolacije i prečišćavanja dobiva se bezbojno ulje koje odgovara 2-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan-1-ol (**13**). *Rf*=0,54 (diklormetan:aceton=8:2). EI MS-QTOF: m/z: $[M+H]^+$ 159,000, $C_6H_{10}N_2OS$ (Shema 18). Struktura **13** određena je primjenom spektrometrijskih i spektroskopskih tehnika (Poglavlje 3.3). U zaključku sukladno očekivanom iz **6** u alkalnom mediju dobiven je hidroksi derivat **13** a opaženo slijedi put S_N (α) (Shema 17a).

Zatim je **6** otopljen u 10%-tnoj otopini KOH i kuhan u povratu kroz 1,5 sati, a nakon izolacije i pročišćavanja kolonskom kromatografijom dobiva se 2-(viniltio)-1-metil-1*H*-imidazol (**14**) u formi bezbojnog ulja. *Rf*=0,57 (diklormetan/aceton=8:2), EI-MS-QQQ: $[M+H]^+$ 140,1. (Shema 18). Struktura **14** određena je primjenom spektrometrijskih i spektroskopskih tehnika (Poglavlje 3.3). Reakcija dobivanja **12** iz **6** u prisutnosti KOH kao jake baze, ide u prilog prije opisanom eliminacijskom putu E2 (β) (Shema 17, c).

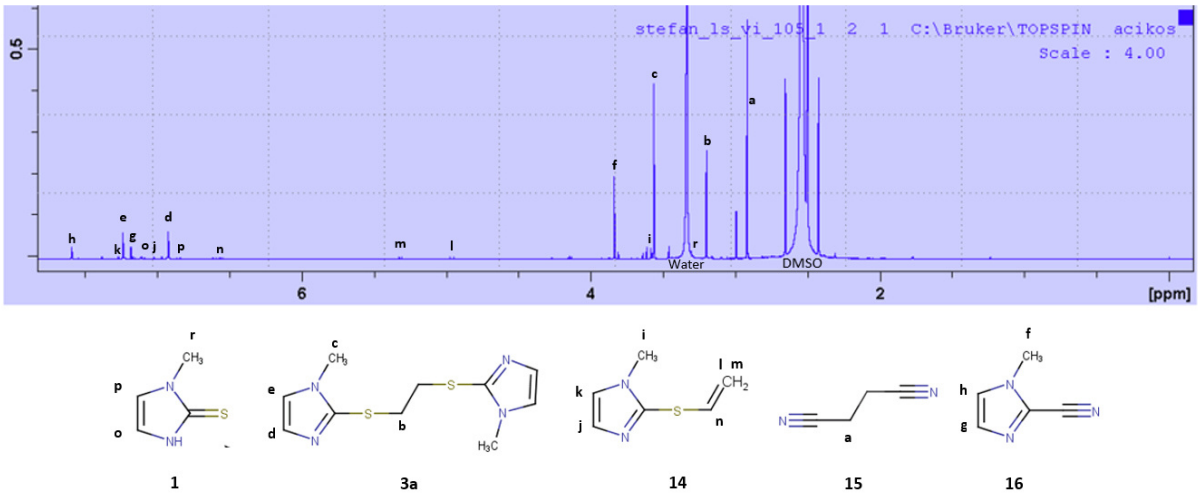


Shema 18. Sinteza hidroksietil i vinil derivata **13** i **14** iz **6**; *i*) $NaHCO_3$ (aq), 80°C, 3 sata; *ii*) KOH (aq), refluks, 1,5 sat.

Studirana je i reakcija kloretiltio- derivata **6** s kalijevim cijanidom. Poznato je da cijanid u polarnom aprotičnom otapalu disocira na cijanidni anion koji je ima dobra nukleofilna svojstva.[185,186]

Zbog otrovnosti cijanida, reakcija je preliminarno je provedena u DMSO-d_6 pri 70°C i studirana primjenom 1-D tj. ^1H i ^{13}C, 2-D HSQC i HMBC te MS-QTOF tehnika. Nakon 6 sati uočen je potpuni nestanak početnog **6**, a analizom spektara nađeno je pet spojeva; već poznati metimazol (**1**, 2% molarni sadržaj), 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (**3a**, 31%), 1-metil-2-

(viniltio)-1*H*-imidazol (**14**, 5%) te sukcinonitril (1,2-dicijanoetan, **15**, 44%) i 2-cijano-1-metil-1*H*-imidazol (**16**, 14%) (Slika 36, Shema 19).

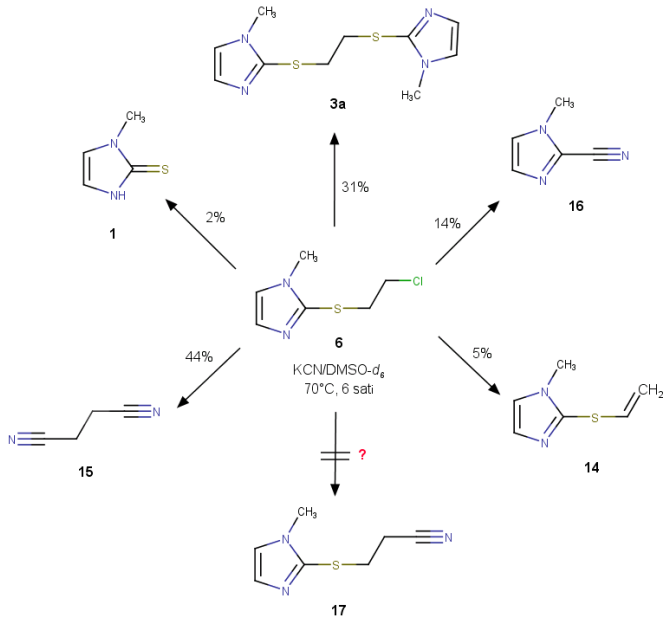


Slika 36. ^{1}H NMR spektar detektiranih spojeva, **1**, **3a**, **14**, **15** i **16**

Dok su radi usporedbe za spojeve **1**, **3a** i **14** postojali spektri iz ovog rada, spektri za sukcionitril (**15**) nađeni su u Brukerovoj NMR bazi podataka**,** a za 2-cijano-1-metil-1*H*-imidazol (**16**) dobiveni su predikcijom kemijskih pomaka na temelju poznatih struktura unutar sustava Bruker Advance.

Nakon spektralne analize, reakcijska smjesa je ekstrahirana s etilnim acetatom, a iz uparnog ostatka ekstrakta izolirani su kromatografijom na koloni silikagela, kromatografski čisti sukcinonitril, **15** (40,0 %) u obliku bezbojnog viskoznog ulja. *Rf*=0,85 (diklormetan/aceton =8:2), HRMS $[M+H]^+$ 81,045, $C_4H_4N_2$. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): -CH_2- (s, 4 H) 2,92, ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): -CH_2-, 13,7, CN 118,6, a potom i kromatografski čisti 2-cijano-1-metil-1*H*-imidazol (**16**, 10,0 %), u obliku bezbojnog viskoznog ulja. *Rf*=0.79 (diklormetan/aceton =8:2), HRMS: $[M+H]^+$ 108,056, $C_5H_5N_3$. ^{1}NMR (DMSO-d_6, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 3H), 3,84, -N(CH_3)-CH= (d, 1H) 7,60, =N-C<u>H</u>= (d, 1H) 7,18. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 151 MHz/ppm): N-CH_3 33,8, -N(CH_3)-CH= 126,3, =N-C<u>H</u>= 131,0, <u>C</u>-CN 121,5, CN 111,6.

Time su za ova potonja dva spoja dodatno potvrđene, a prethodno predviđene, strukture.



Shema 19. Reakcija **6** s kalijevim cijanidom u DMSO-d_6.

Promatrajući identificirane spojeve u reakciji **6** s kalijevim cijanidom kao nukleofilom, može se zaključiti da se reakcija prvenstveno odvija supstitucijom tipa S_N (β) pri čemu se dobiva **1** i **15** obzirom na NMR utvrđena iskorištenja.

Može se pretpostaviti da nukleofilnim napadom cijanida na β ugljikov atom etilenske skupine **6** dolazi do dvostupnjevitog koraka pri čemu se u prvom stupnju dobiva 3-kloropropionitril (nije uočen), a nakon čega slijedi supstitucija klora drugom cijano skupinom i stvaranje sukcinonitrila (**15**). Pritom formirani imidazol tiolat reagira dalje dajući, s polaznim spojem **6** s jedne strane, **3a** i slijedeći S_N (α) put, odnosno protoniranjem, s druge strane, stvarajući metimazol (**1**). Nastanak spoja **16** može se objasniti desulfurizacijom **1** u DMSO-d_6 i adicijom cijanida kao nukleofila pritom imajući na umu da DMSO može pri povišenoj temperaturi pokazivati oksidacijska svojstva, a desulfuracija **1** je već prethodno opisana.[47]

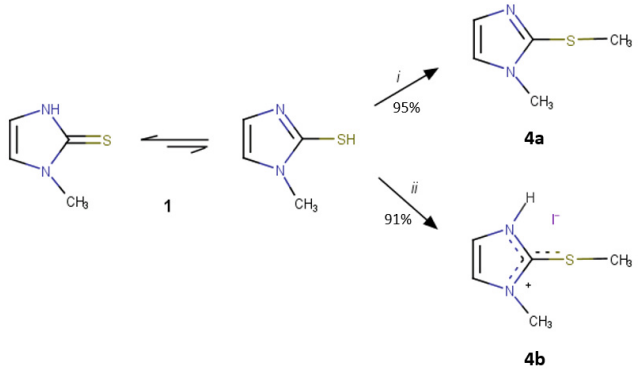
Prisutan vinil derivat **14** nastaje eliminacijskim putem E2 (α), što nije neuobičajeno, obzirom na bazna svojstva otopine cijanida.

U konačnici može se zaključiti da promatrana reakcija **6** s cijanidnim nukleofilom u DMSO-d_6 pri povišenoj temperaturi, sukladno sintetiziranim i karakteriziranim spojevima slijedi i puteve supstitucije i eliminacije, od kojih je supstitucija preferirana.

Ipak, kako u ovom preliminarnom pokusu nije detektiran očekivani 2-cijanoetiltio-1-metil-1*H*-imidazol (**17**) (Shema 19), dobivene rezultate ne treba uzimati zdravo za gotovo, jer to tek treba potvrditi u strogo definiranim preparativnim uvjetima.

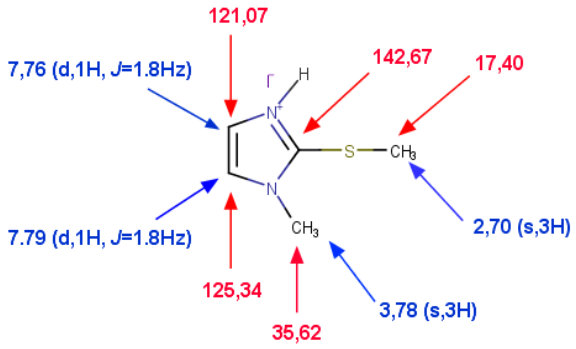
4.2.5. Metilacijske studije metimazola (**1**)

1-Metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol (**4a**) poznat je kao onečišćenje C metimazola (**1**). Javlja se kao njegovo procesno onečišćenje i u kontekstu farmaceutske kakvoće kontrolira se tijekom inicijalnih analiza. Iako je sinteza **4a** opisana,[23] a i njegove soli poput jodida 1-metil-(2-tiometil)-1*H*-imidazol hidrojodid (**4b**) poznate u literaturi,[44] pokazalo se nužnim unijeti više svjetla u svojstva i stabilnost **4a** i **4b** poglavito iz razloga što su dostupni podaci nesuvisli i konfuzni, a dodatno što su soli i kompleksi tioamidnih spojeva s jodom od značajnog interesa za proučavanje metabolizma i farmakologije **1**. Dodatno, ukazala se je potreba za vlastitim izvorom **4a**, jer se farmakopejski standard onečišćenja C nalazi na tržištu kao smjesa s metimazolom.[63] S tim u svezi inicijalno je provedena sinteza **15a** prema propisu Vampe i suradnika.[23] Prema njemu, **1** je otopljen u otopini natrijevog karbonata i u tu je otopinu, uz miješanje pri sobnoj temperaturi, postepeno dodavan jodmetan. Nakon 2 sata smjesa je ekstrahirana s diklormetanom, a ekstrakt uparen do suha. U uparenom ostatku javljao se kristalinični talog koji je posljedica nedovoljne količine baze koja je nužna za neutralizaciju jodida stvorenog tijekom reakcije. Nastavno na to, količina baze je korigirana i u ponovljenom prilagođenom postupku (vidi eksperimentalni) dobiven je čisti 1-metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol (**4a,** 95,0 %) kao bezbojna viskozna tekućina. Čistoća; HPLC, 100 %. *Rf* = 0,59 (1,2-dikloretan:metanol=9:1), MS-QQQ: $[M+H]^+$ 129,0489, Molarna masa $C_8H_{10}N_4S_2$ (Shema 20). Dobiveni **4a** karakteriziran je primjenom MS i NMR spektroskopije pri čemu je nedvosmisleno potvrđena njegova struktura (Poglavlje 3.7.20).



Shema 20. Reakcija dobivanja **4a** i **4b** iz **1**; *i*) CH_3I, Na_2CO_3 (1,5M), 2 sata, *ii*) CH_3I, aceton, dušik, 2 sata.

S druge strane reakcijom **1** s ekvimolarnom količinom jodometana u acetonu uz miješanje pri sobnoj temperaturi tijekom 3 sata, dobiven u obliku bijelog kristalnog produkta 1-metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol hidrojodid (**4b**, 91,0 %) (Shema 20), t_t $DSC_{početak}$ 147°C (lit. 150°C[44]). Čistoća; HPLC 99,9%. ESI-MS-QTOF $[M+H]^+$ 227.0423. Molarna masa $C_8H_{10}N_4S_2$. Sadržaj jodida od 48% određen je ionskom kromatografijom, što je u odnosu na teoretsku vrijednost od 49% prihvatljivo.

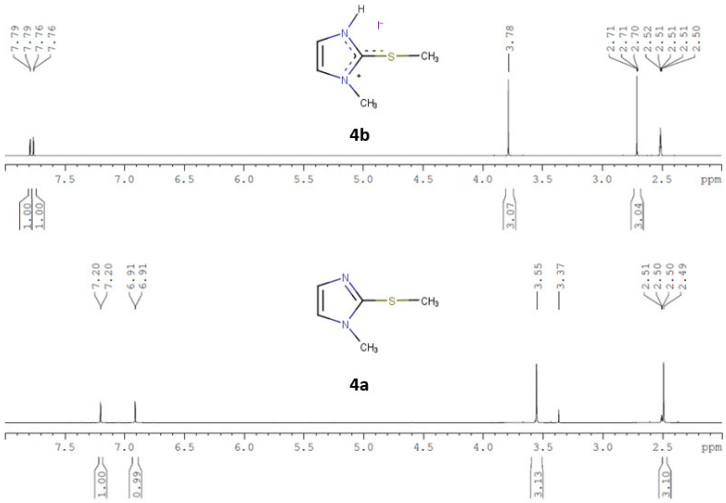


Slika 37. Kemijski ^1H (plavo) i ^{13}C NMR pomaci (crveno) **4b** u DMSO-d6

NMR spektar otopine **15b** u otopini DMSO-d_6 (Slika 37, plavo) sastoji se od para dubleta pri 7,76 ppm i 7,79 ppm (s malom konstantom sprege od 1,8 Hz) koji odgovaraju protonima u tioimidazolnom prsten, zatim singleta pri 2,70 ppm koji odgovara protonima tiometilne skupine i dodatno singletu pri 3,78 ppm koji odgovara protonima u N-CH_3 skupini. Relativne integracije i kemijski pomaci protona u skladu su s predloženom strukturom. ^{13}C-NMR spektar **15b** (Slika 37, crveno) sastoji se od ugljika tiokarbonilne skupine pri 142,67 ppm, te imidazolnih protona

pri 121,07 ppm i 125,34 ppm. Ugljik tiometilne skupine nalazi se pri 17,40 ppm, a dušikova metilna skupina pri 35,62 ppm.

Promatrajući ^{1}H NMR spektar **4b** vidljiv je veliki pomak metilnih, imidazolnih i tiometilnih protona prema višim vrijednostima δ u usporedbi s odgovarajućim pomakom u neprotoniranom **4a** (Slika 38). Slično, primijećen je i značajan pomak prema višim vrijednostima δ za ^{13}C NMR signale **4b** u odnosu na neprotoniran **4a**. Otklanjanje opaženo u signalima na ^{1}H i ^{13}C NMR spektrima **4b** nastaje zbog postojanja pozitivnog naboja na imidazolu i jačih vodikovih veza između H···I u odnosu na bazu **4a**. U masenim spektrima pri pozitivnoj ionizaciji najzastupljeniji ion je pri 129,0845 m/z, a pripisan je $[M+H]^{+}$ baznom piku **4a**. Dodatno, fragmenti na 114,0427 m/z ukazuju na cijepanje tiometilne skupine.



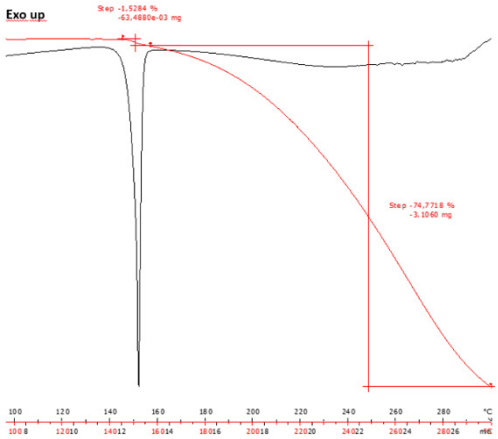
Slika 38. Uporedba ^{1}H NMR spektara soli **4b** (gore) i baze **4a** (dolje) u DMSO-d_6.

Struktura **4b** je potvrđena rentgenskom strukturnom analizom, a monokristali **4b** su dobiveni sporom kristalizacijom iz acetona.

Temeljem spektroskopskih podataka kao i određene kristalne strukture na monokristalu (Poglavlje 4.3), nedvosmisleno je potvrđena struktura **4b**, a time indirektno i **4a**.

S ciljem daljnjeg uvida u stabilnost **4b** proučeno je ponašanje pri povišenoj temperaturi. Primjenom termogravimetrijske analize (TGA) i diferencijalno pretražne kalorimetrije (DSC) ispitana je toplinska stabilnost **4b**. Mjerenja su provedena u atmosferi N_2 pri brzini zagrijavanja od 10 Kmin^{-1}. Na termogramu je vidljiv oštar endotermni pik (Slika 39) koji odgovara taljenju (početak 140°C), dok drugi široki endotermni događaj u rasponu od 180°C do 300°C vjerojatno ukazuje na raspad **4b**. Štoviše, TGA krivulja (Slika 39) pokazuje da je spoj termički stabilan do

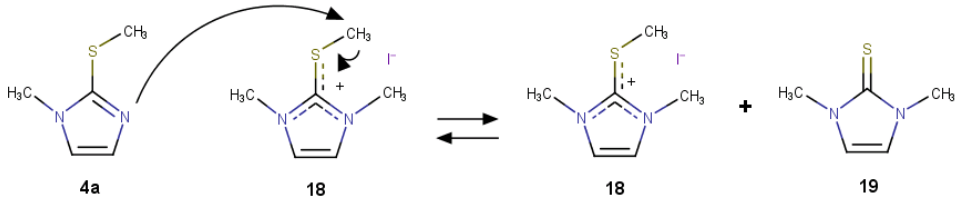
tališta, vjerojatno zbog prisutnih vodikovih veza u čvrstoj formi. Dodatno, s porastom temperature dolazi do brzog gubitka mase koji upotpunjuje zaključak o vjerojatnoj razgradnji.



Slika 39. TGA i DSC analiza **4b** pri brzini zagrijavanja od 10 ° C min^{-1}u inertnoj atmosferi dušika.

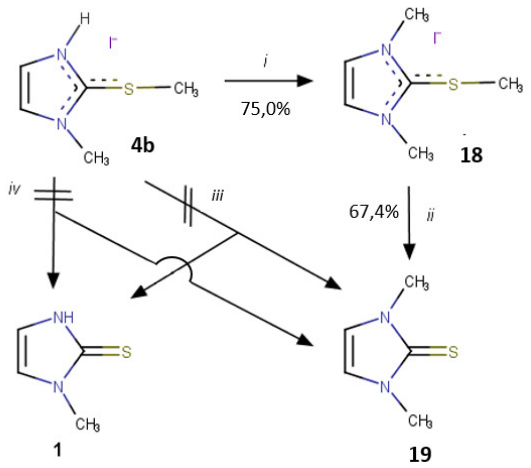
Nakon što se utvrdilo kako se **4b** ponaša pri povišenoj temperaturi, pristupilo se proučavanju njegovih kemijskih svojstva, poglavito imajući na umu da je S-CH_3 veza labilnog karaktera.[187]a U kontekstu srodnih tvari poznato je da metilacija i transfer metilne skupine s jedne molekule na drugu mogu biti od značajne toksikološke važnosti zbog potencijalne interakcije onečišćenja s DNA.[188]

Kako bi se proučili uvjeti pri kojima dolazi do transfera metilne skupine pristupilo sintezi 1,3-dimetil-2-metiltioimidazolijevog jodida (**18**) za kojeg je poznato da ima katalitičku ulogu u intermolekularnom transferu metilne skupine (Shema 21).[44] S obzirom da podaci o svojstvima **18** dolaze iz spornog rada Kistera i suradnika[44] za koje postoje literaturni navodi da su dobiveni rezultati upitni[45] upravo to je dodatno osnažilo potrebu da se objavljeni podaci usporede s vlastitim istraživanjima.



Shema 21. Predložen mehanizam stvaranja **18** i **19** iz **4a** prilagođeno prema.[44]

Prvo je provedena metilacija **4a** uz jodmetan u heterogenim uvjetima tj. u suhom acetonitrilu i bezvodnom natrijevom hidrogenkarbonatu, a nakon 5 sati zagrijavanja u refluksu (Shema 22) i ekstrakcije s diklormetnom te uparavanja organskog ostatka u vakumu dobiveni su bijeli kristali (**18**) s iskorištenjem od 75,0%, t_t $DSC_{onset-endset}$ 168-182°C (literatura 187°C[154]) analitičke čistoće 99% prema HPLC-u. NMR podaci (Poglavlje 3.7.22) odgovaraju podacima u literaturi[154], pri čemu je potvrđena predložena struktura.



Shema 22. Pokus direktne metilacije i demetilacije **4b**, *i*) CH_3I, MeCN, $NaHCO_3$, refluks, 5h; *ii*) $NaHCO_3$, MeCN, refluks 13h; *iii*) $NaHCO_3$, MeCN, refluks, 8h; *iv*) Δ (147°C, 2h).

Imajući sintetizirane i standardizirane **4a** i **18** pristupilo se proučavanju uvjeta pri kojima se može odvijati demetilacija. U tim u svezi **18** je zagrijavan u suhom acetonitrilu uz natrijev hidrogen karbonat tijekom 11 sati u refluksu (Shema 22), a nakon ekstrakcije s diklormetanom i uparavanjem organskog ostatka u vakumu dobiven je 1,3-dimetilimidazol-2-tion (**19**) s iskorištenjem od 67,4% (32mg) i t_t DSC_{onset} 183°C (literatura 183°C[155,156]). *Rf* =0,81 (1,2-dikloretan:metanol= 9:1), a ^1H i ^{13}C NMR podaci u skladu s literaturnim navodima.[156]

Naime, dobiveni demetilacijski produkt **19** iz **18** je u skladu je s navodima Kistera i suradnika,[44] te na taj način prateći očekivani kemizam uz spektroskopske podatke potvrđuje predložene strukture. Štoviše, imajući jasno determiniran i strukturno potvrđen niz **17→18→19** postavlja se pitanje pri kojim bi se uvjetima demetilirao **4a** obzirom na već utvrđenu labilnu prirodu S-CH_2 veze.

Kako bi se dobio odgovor na ovo pitanje, **4a** je zagrijavan pri istim uvjetima kao i **18** tj. u suhom acetonitrilu uz natrijev hidrogen karbonat u refluksu kroz 8 sati, a reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom na silikagelu uz dikloretan:metanol=9:1 kao mobilnu fazu.

Tijekom perioda od 8 sati nije uočena mrlja **19** koja bi podržavala činjenicu o transferu metilne skupine tipa S-R→N-R, a dodatno nije uočeno ni prisustvo mrlje metimazola (**1**) koja bi upućivala na gubitak metilne skupine i uklanjanje jodmetana. Štoviše izostanak očekivanih spojeva upućuje na različito ponašanje **4a** u odnosu na **18** i ukazuje na veću stabilnost pri istim uvjetima ispitivanja. Dodatno, poznavajući talište **4a** koje se kreće oko 147°C, a nakon toga slijedi promjena mase koja upućuje na raspad, kako bi se utvrdila stabilnost u čvrstom stanju, provedeno je zagrijavanje na oko 145°C a reakcija je opet praćena tankoslojnom kromatografijom. Nakon 2 sata zagrijavanja nisu utvrđene dodatne mrlje koje bi odgovarale produktima **1** ili **18**, sugerirajući izrazitu stabilnost **4a** ne samo u otopini već i u čvrstom stanju.

Iako se halogeni poput jodida mogu koristiti za uklanjanje alkilnih skupina[189], a proces je ovisan o supstratu i primijenjenim uvjetima poput primjerice temperature,[190] u slučaju **4a** navedene razlike mogu se interpretirati na način da je ovdje ipak riječ o hidrojodidnoj soli koja putem vodikovih veza doprinosi stabilnijoj tioamidnoj strukturi u čvrstom stanju. Dodatno, s druge strane u acetonitrilu kao aprotičnom otapalu dolazi do solvatizacije imidazolijevog kationa[191] pri čemu je sposobnost jodida kao demetilacijog inicijatora uvelike smanjena. Istraživanja infracrvenom spektrometrijom na litijevom jodidu u acetonitrilu i dimetilsulfoksidu pokazala su da i jodid može biti solvatiziran, no autori zaključuju da su nužne dodatne studije,[192] a s tim u svezi u kontekstu vlastitih dobivenih rezultata može značiti i dodatni faktor koji odjeljuje imidazolijev kation od jodida te u konačnici doprinosi stabilizaciji **4a**. U zaključku **4a** pokazuje veliku stabilnost i u čvrstom stanju i u otopini, a njezino eventualno prisustvo kao onečišćenje ne pruža zabrinutost sa sigurnosnog aspekta iz razloga što je njegova sposobnost alkilacije kao srodne tvari vrlo mala.

4.2.6. Oksidacijske studije **1**

Kisik je sveprisutna molekula koja u kontekstu kemijske stabilnosti farmaceutski djelatnih tvari imaju veliki značaj. Ponekad je reakcije oksidacije poglavito autoksidacije teško razumjeti pa i u konačnici reproducirati jer mogu biti katalizirane onečišćenjima ili reaktivnim međuproduktima čiji sadržaj može biti varijabilan.

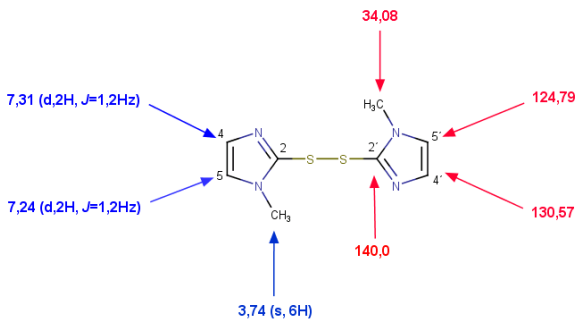
Uzimajući u obzir važnost oksidacija, u ovom je radu metimazol (**1**) podvrgnut djelovanju izabranih oksidansa pri čemu su dobiveni produkti izolirani i sveobuhvatno karakterizirani primjenom spektroskopskih tehnika, a pojedinim je predstavnicima određena kristalna struktura i ispitana njihova stabilnost.

*Oksidacija **1** s jodom*

2,2'-Disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**, metimazol disulfid) je metabolit metimazola i njegovo potencijalno onečišćenje. O njemu postoje kontraverze u literaturi jer je opisan kao žuta forma s talištem 127-128°C,[158] i 138°C,[50] a opisana i bezbojna forma dobivena iz diklormeatana,[50] ali nije opisana nikakva karakterizacija. S obzirom da neki podaci dolaze iz patentne literature, a drugi egzotičnog časopisa, potreba za poznavanjem vjerodostojnih podataka o njemu, ali i potrebe za posjedovanjem izvjesne količine standardiziranog uzorka **5a**, prišlo se njegovoj sintezi i sveobuhvatnoj karakterizaciji.

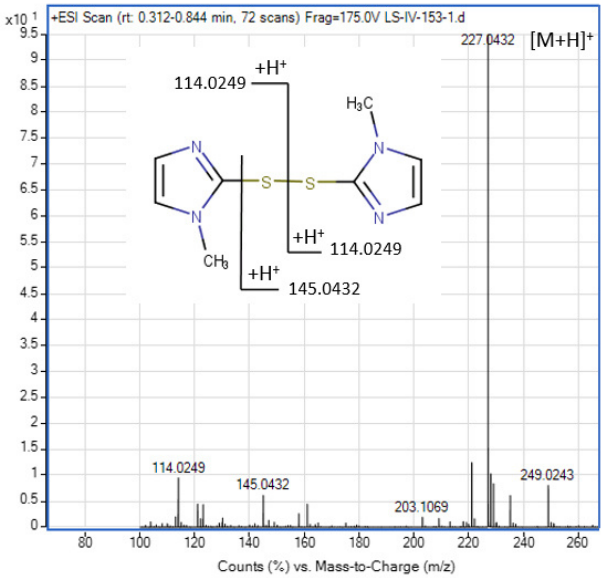
Disulfid **5a** pripravljen je oksidacijom metimazola (**1**) s jodom, za razliku od literaturno poznate oksidacije s vrlo otrovnim fozgenom.[158] Reakcija je provedena u 1,2-dikloretanu uz trietiamin pri sobnoj temperaturi u inertnoj atmosferi dušika tijekom 3 sata te prekristalizacijsom iz suhog etilnog acetata dobiva se 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**) u obliku žutih kristala i iskorištenju od 58,0 %. Talište **5a** prema DSC-u (početak) iznosi 131°C (Literatura: 127-128°C,[158] 138°C[50]). Pokušaj priprave bijele forme kristalizacijom iz diklormetana,[50] bio je bezuspješan (Poglavlje 3.7.26).

Snimljeni ^{1}H NMR spektar otopine **5a** u DMSO-d_6 sastoji se od para dubleta pri 7,31 ppm i 7,21 ppm (s konstantom sprezanja od 1,2 Hz) koji odgovaraju vodikovim atomima imidazola i singleta pri 3,73 ppm koji odgovara metilnoj skupini (Poglavlje 3.7.25). Relativne integracije i kemijski pomaci u skladu su s predloženom strukturom **5a**. ^{13}C-NMR spektar sastoji se od signala ugljika tiokarbonilne skupine pri 140,00 ppm, zatim signala imidazolnih ugljikovih atoma pri 130,57 ppm i 124,79 ppm, dok ugljikov atom metilne skupine vezane na dušik ima signal pri 34,08 ppm. Signal C2 ugljikovog atoma nije uočen nakon dugotrajnog snimanja zbog elektronskih ili konformacijskih efekata susjedne disulfidne veze, no njegovo prisustvo utvrđeno je HSQC, COSY, HMBC korelacijskim pokusima (Slika 40).



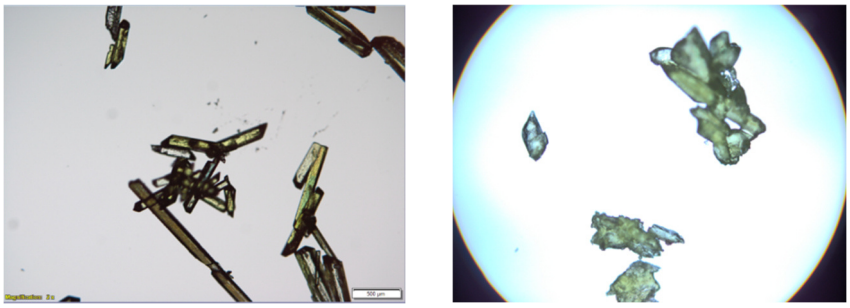
Slika 40. Kemijski ^{1}H (plavo) i ^{13}C NMR (crveno) pomaci žute forme **5a** u $CDCl_3$.

Maseni spektri snimljeni pri pozitivnoj ionizaciji od 175V ukazuju da je najzastupljeniji ion pri 227,0423 m/z, a isti odgovara pripisan baznom piku **5a** ($[M+H]^+$). Dodatno, dva formirana fragmenta pri 114,0249 m/z ukazuju na kidanje disulfidne veze i stvaranje dva tioimidazolna fragmenta, dok s druge strne fragment pri 145,0432 m/z ukazuje na kidanje metiltioimidazolne skupine (Slika 41).



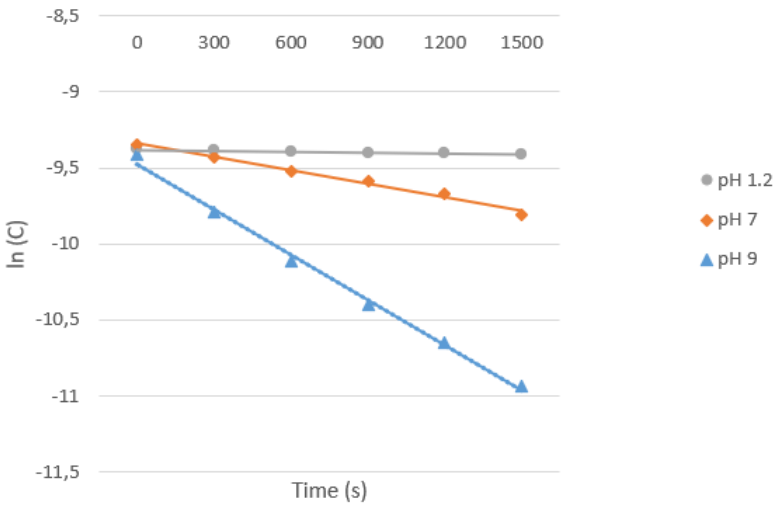
Slika 41. LC-QTOF MS-MS spektar **5a** snimljen u ESI (+) načinu rada (175,0 V).

Tijekom kristalizacijskih pokusa **5a** iz različitih otapala (vidi više u Poglavlju 4.3.2) kristalizacijom iz acetona dobiveni su kristali metimazol disulfida **5b**, koji su morfološko, ali i po DSC-u različiti od **5a**, a koji su prema GLC analizi sadržavali acetona (Slika 42). Studirani su pod oznakom **5b**, a detalji su opisani u Poglavlju 4.3.2. Važno je istaknuti da je kristalna struktura **5a** u tijeku istraživanja bila nepoznata i kao novost prezentirana na Ružičkinim danima 2017 godine u Vukovaru, no nije deponirana u kristalografsku bazu. Nedavno, u 2020. godini je ista i objavljena[193] u sklopu istraživanja kompleksa **1** s boratom i voframom, no nije dovedena u kontekst sa srodnim tvarima ili farmaceutikom.



Slika 42. Mikroskopski prikaz metimazol-disulfida dobivenog kristalizacijom etilnog–acetata **5a** (lijevo) te iz acetona **5b** (desno).

Tijekom sinteze **5a**, a poglavito reproducirajući podatak iz literature poput rada Eskhi i suradnika[50] uočeno je prema tankoslojnoj kromatografiji da u postupku obrade s natrijevim tiosulfatom dolazi do raspada **5a** na polazni **1**. Kako bi se ta situacija rasvijetlila provedeno je pH ovisno ispitivanje hidrolitičke stabilnost. Reakcijski profil razgradnje prikazan je na Slici 43 kao odnos koncentracije (C) tj. ln (C) u odnosu na vrijeme u satima. Visoka vrijednost korelacije ln (C) u odnosu na vrijeme od 95% pokazuje da razgradnja prati kinetiku prvog reda.



Slika 43. Prikaz razgradnje **5a** u ovisnosti o pH.

Izračunate su konstante brzine razgradnje (k) i vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$) pri različitim pH vrijednostima 1,2 do 9,0 i rasponu temperatura od 22°C do 50°C. Gledajući konstante brzine možemo zaključiti da se brzina razgradnje **5a** povećava s povećanjem pH, a dodatno **5a** je

stabilan u kiselim uvjetima. (pH 1,2) To ukazuje u ovom slučaju ukazuje na pH ovisnu razgradnju (Tablica 12, Poglavlje 3.7.27.).

Ovisnost o temperaturi (T) pri različitim vrijednostima pH ispitivana je na tri temperature 22°C 30°C i 50°C. Povećanje konstantne brzine u zavisnosti o temperaturi i pH ukazuje na to da je razgradnja **5a** proporcionalna povećanju temperature. Energije aktivacije (E_a) za razgradnju **5a** izračunate iz nagiba i bile su 55,3 kJ/mol, 54,3 kJ/mol za pH 1,2, i 7,0, dok je razgradnja na pH 9 pri 33 i 50 bila vrlo brza tj. u par minuta te stoga Ea nije izračunata. E_a je bio najveći pri pH 1,2 stoga se može zaključiti da je **5a** manje podložan temperaturno uvjetovanoj razgradnji pri pH 1,2 nego pri drugim uvjetima.

*Oksidacija **1** s vodikovim peroksidom*

Poznavajući već prethodno opisanu desulfurizaciju metimazola (**1**) oksidacijom u kiselim medijima, željelo se unijeti više svjetla u tijek reakcije, a poglavito promotriti reakciju **1** u nevodenom mediju.

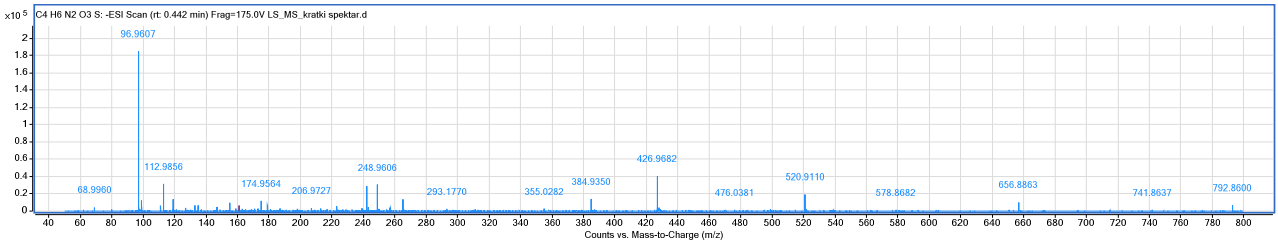
Prvo je provedena oksidacija **1** (0,88 mmol) u etilnom-acetatu s 30%-tnim vodikovim peroksidom (1 mmol) pod inertnom atmosferi dušika pri sobnoj temperaturi. Sasvim očekivano glavni produkt reakcije bio je 2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazola) **5a**, a njegov udio prema tankoslojnoj kromatografiji (1,2-diklormetan:metanol) uz vizualizaciju parama joda iznosio je cca 30%. Ponovljena je reakcija u etilnom acetatu, no uz povećani udio 30%-tnog vodikovog peroksida od 1,5 mmola te su uočeni jednaki rezultati kao u prethodnom pokusu tj nađen je **5a** kao glavni produkt. U novom pokusu povećan je volumen oksidansa na 2 mmola, pri čemu je **5a** uočen u znatno manjem postotku dok je glavnina produkta odgovarala novoformiranoj mrlji pri dnu kromatograma. U smjesi je također zaostajalo i neproreagiranog **1**. Zatim je u daljnjem optimiranju reakcije udio oksidansa povećan na 2,5 mmola, a kao medij korišten je etilni acetat/acetonitril. Miješanjem tijekom 10 sati u inertnoj atmosferi dobiveni sirovi uljni ostatak je izdvojen, otopljen u vodi i istaložen s acetonom nakon čega je sušen u vakumu do konstantne mase pri čemu je dobiven 1-metil-1*H*-imidazolijum hidrogensulfat (**20**).

U kontekstu karakterizacije **20** prvo su uspoređene IR vrpce s već poznatim podacima iz literature (Tablica 29), a tim u svezi uočeno je dobro podudaranje rezultata.[194]

Tablica 29. Usporedba IR vrpci **20** s literaturnim podacima.

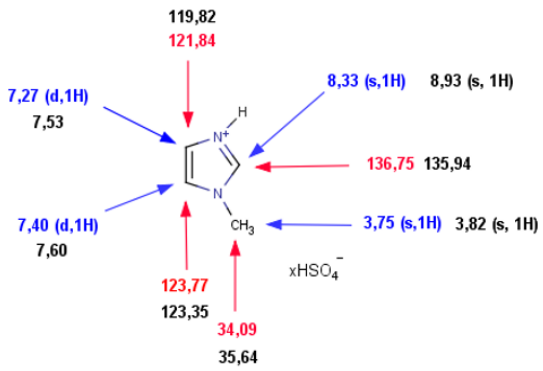
Tip vrpce	**IR vrpce 20**	**IR vrpce prema literaturi/(cm^{-1})** [194]
Aromatsko istezanje C-H veze	3145,72	3151,29
Istezanje alifatske C-H veze	2966,27	2973,75
Istezanje alifatske C-H veze	2864,03	2878,10
Istezanje C=C veze	1452,72	1450,86
Istezanje C-N veze	1167,41	1145,61
Istezanje HSO_4^-	1087,86	1086,39

Na masenom spektru (Slika 44) pri negativnom načinu snimanja i ionizaciji od 175 V uočava se pik pri 96,9607 m/z koji odgovara $[HSO_4]^-$ ionu sumporne kiseline, što nije neuobičajeno te u skladu s podacima uočenim kod drugih ionskih tekućina.[195,196]



Slika 7 Maseni spektar **20** u negativnom načinu snimanja pri 175V.

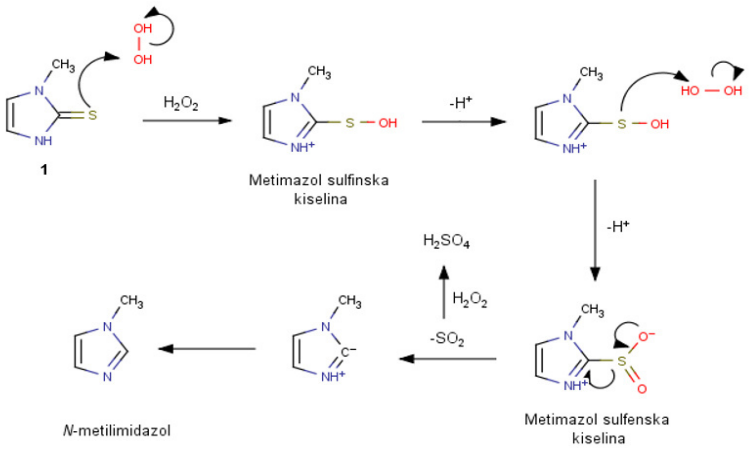
S ciljem daljnje potvrde strukture snimljeni su 1-D i 2-D ^1H i ^{13}C NMR spektri u $CDCl_3$ kao otapalu. Kemijski pomaci u protonskom spektru pri 7,27 i 7,39 odgovaraju imidazolnim protonima, N-CH_3 skupina ima pomak pri 3,74 dok proton vezan za C2 atom imidazolne skupine ima pomak pri 8,33 (Slika 45). Uočeni kemijski pomaci u **20** u skladu su s literaturnim



navodima u okviru eksperimentalne pogreške i razlike u otapalima pri čemu potvrđuju predloženu strukturu.

Slika 45. NMR spektari za **20**; ^{1}H (600 MHz) (plavo), ^{13}C (151 MHz) (crveno) NMR u $CDCl_3$ u odnosu na ^{1}H (400 MHz) ^{13}C (101 MHz) NMR u DMSO-d_6 (crno) prema.[194]

Grivas i Ronne[197] proučavali su desulfurizacije cikličnih tiourea uz vodikov peroksid u octenoj kiselini. Omjer vodikovog peroksida/supstrata 3:1 nužan je za uspješnu provedbu cjelovite desulfurizacije, a to je i dodatno potvrđeno tijekom u ovom radu provedenih pokusa. Prema literaturi pokusi desulfurizacije također su provedene i u mravljoj kiselini, 1M HCl, DMSO-u, 95% etanolu, piridinu, tetrahidrofuranu.[197] Dodatno, provedeni su i pokusi u 1M kalijevom hidroksidu i 25% amonijevom hidroksidu no kao glavni produkt dobivena je sulfonska kiselina.[197] U kontekstu desulfurizacije prema literaturnim navodima predložen je mehanizam desulfurizacije prikazan je na Shemi 23.[198,199] U prvoj fazi dolazi do formiranja sulfinske kiseline koju dalje slijedi eliminacija sumporovog (IV) oksida i formiranja ilida koji nakon vezanja vodika daje *N*-metilimidazol.



Shema 23. Predloženi mehanizam desulfurizacije **1** (prilagođeno prema[197]).

Stvaranje **20** u skladu je s literaturnim podacima, proučavana reakcija oksidacije **1,** a u kontekstu njegove reaktivnosti ima višestruku važnost. U prvom redu nadopunjuje trenutno nađene metode priprave **20** koristeći etil-acetat/acetonitril kao sustav otapala i potvrđujući literaturni citat o nužnoj većoj količini oksidansa u odnosu na supstrat.[197] Kao drugo, važno je istaknuti da nije uočeno prisustvo sulfinske ili sulfenske kiseline u produktu pri čemu također možemo potvrditi da su to, u skladu s literaturnim navodom, nestabilne kratko živuće vrste, što je opet u skladu s literaturnim navodom gdje su navedeni spojevi nađeni kao međuprodukti i detektirani masenom spektrometrijom.[200] Kao treće, promatrajući navedenu reakciju i **20** kao potencijalnu srodnu tvar metimazola i njezinu bazu, *N*-metil imidazol kao farmakopejsko onečišćenje B,[63] a u skladu s opisanim oksidacijskim uvjetima može se zaključiti da je njegovo prisustvo u finalnoj formulaciji malo izgledno.

4.3. Čvrste forme metimazola i njegovih srodnih tvari

Kemijska reaktivnost i biofarmaceutska svojstva (npr. talište, topljivost i oslobađanje, stabilnost, djelotvornost, bioraspoloživost, tečljivost, filtrabilnost, kompresibilnost) mogu biti različita kod različitih čvrstih formi iste djelatne tvari, te je poznavanje i karakterizacija čvrstih formi (amorfi, polimorfi, pseudopolimorfi ili solvati, itd) djelotvornih ljekovitih tvari od svekolike važnosti u farmaceutici, jer mogu značajno utjecati na kakvoću gotovog proizvoda.[201,202] Posebno stoga što tijekom procesa priprave ili skladištenja finalne farmaceutske forme mogu prelaziti jedna u drugu. Čvrste forme pojedine djelatne tvari mogu imati značajno različita fizikalna svojstva, čime mogu znatno djelovati na njegovu djelotvornost lijeka. Djelatne tvari dobivaju odobrenje za specifičnu čvrstu formu, a u kontekstu proizvodnje važno je istaknuti da je kristalizacija jedna od najvažnijih operacija u procesu proizvodnje djelatne tvari željene kakvoće kao i željenog kristalnog oblika.

Unatoč značajnoj primjeni tireostatika metimazola u literaturi su poznate samo dvije polimorfne forme, od kojih samo jedna nalazi primjenu u farmaceutskoj industriji, a iz tog je razloga bilo nužno provesti pretraživanje polimofnih formi metimazola.

Istraživanja čvrstih formi djelatnih tvari dodatno usložnjava pojava već malih količina specifičnih onečišćenja djelatnih tvari, tako da istraživanja na njihovoj spoznaji i svekolikoj karakterizaciji teku paralelno s istraživanjem polimorfnih formi. U tom su kontekstu odabranim srodnim tvarima metimazola iz Poglavlja 3 karakterizirano čvrsto stanje s ciljem

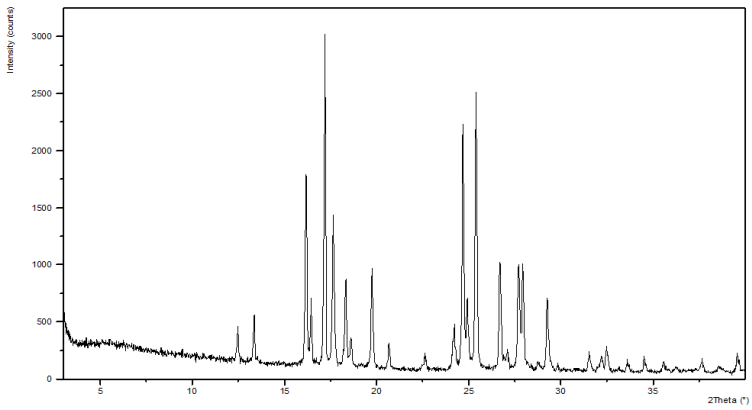
upotpunjavanja opaženih kemijskih i fizičkih svojstva, a tamo gdje je to moguće i neophodno provedeno je pretraživanje dodatnih čvrstih formi i studije transformacije čvrstog stanja.

4.3.1. Studij probira polimorfa metimazola (**1**)

Obzirom na važnost metimazola (**1**) , njegovu svekoliku primjenu u medicini i tehnici nužno je provesti probir s ciljem utvrđivanja potencijala **1** za formiranje polimofa kao podlogu za detaljnije studije koje uključuju utvrđivanje fizičke i kemijske stabilnosti novih čvrstih formi, zatim njihova biofarmaceutska i tehnološka svojstva. Topljivost, kristaliničnost i kristalna svojstva djelatne tvari ovisna su uvjetima tijekom kristalizacije poput temperature, tlaka, omjera otapala i sl, no jedan od poprilično važnih čimbenika je kristalizacijsko otapalo koje može usmjeriti ili spriječiti kristalizaciju željene čvrste forme.[203]

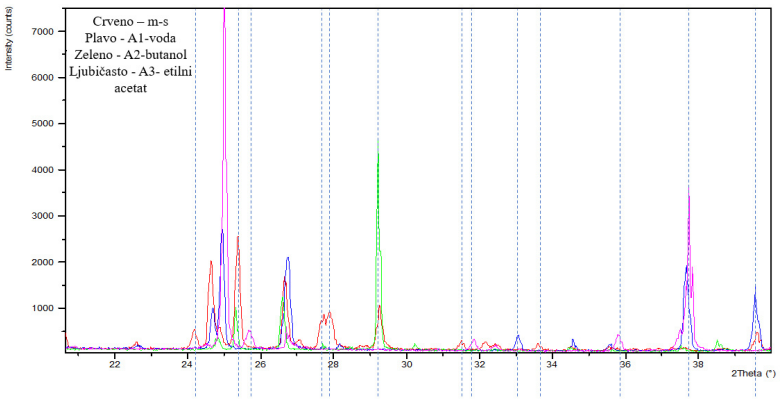
Struktura **1** ima polarnih i nepolarnih skupina što u kontekstu topljivosti u navedenim protičnim otapalima može doprinijeti stvaranju intramolekulskih veza putem vodikovih veza dok s druge strane kod aprotičnih otapala prisustvo vodikovih veza izostaje, a upravo te razlike mogu doprinijeti stvaranju nove kristalne forme. S tim u svezi, a poznavajući dobru topljivost **1** provedena je studija kristalizacije primjenom različitih polarnih protičnih otapala (voda, metanol, etanol, izopropanol, butanol izobutanol), do polarnih aprotičnih otapala (aceton, acetonitril, dimetilformamid, kloroform, etilni acetat) bez zagrijavanja, tj otapanjem **1** miješanjem i spontanom kristalizacijom pri čemu je uslijedila filtracija i sušenje između slojeva filter papira.

Pokusima kristalizacije prethodila je standardizacija **1** koja je provedena na način da je difraktogram praha polazne sirovine (Slika 46) uspoređen s teorijskim prahom iz kristalografske baze, pri čemu nisu uočene razlike u položaju pikova 2θ°. Dodano, termogram standarda ima talište (označeno kao početak tališta - onset) koje je u rasponu od 142,10°C do 144,10°C. U kontekstu vlastitih rezultata razlog uočene razlike objašnjava se prvenstveno upotrebom različitih DSC uređajima. Uspoređujući navedene vrijednosti tališta standarda u odnosu na literaturu gdje se talište kreće u rasponu od 143-147°C[1] možemo zaključiti da odstupanje može biti posljedica posljedica a) primjene drugih instrumenata npr. uređaja za određivanje tališta ili pak b) samog izražavanja vrijednosti poput početka tališta ili potpunog taljenja pri čemu se unosi razlika od 1-2°C. U cilju vlastite studije rezultati će se izražavati kao početak taljenja.



Slika 46. Difraktogram praha standarda **1**.

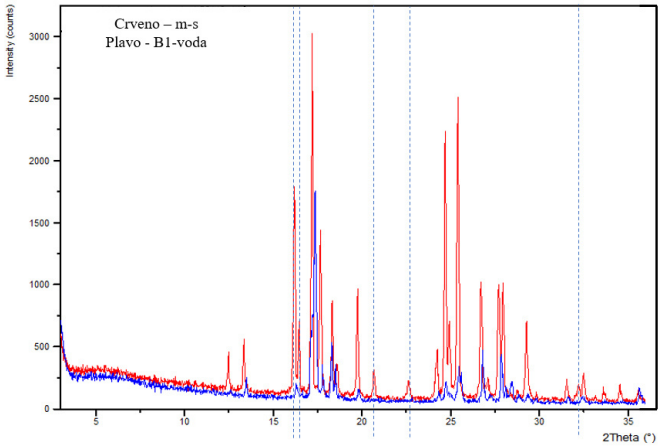
Talište je na svim uzorcima A1-A10 analizirano DSC-om pri čemu je uočen endotermni događaj tališta u rasponu od 142,3°C do 143,6°C. Difraktogram praha acetonitrila A9 bio je jednak standardu metimazola, dok su ostali uzorci A1-A10 bili evidentno različiti pri čemu su dominantno prikazivali odsustvo i pojavu novih pikova 2θ° u odnosu na standard metimazola (Poglavlje 3.9.1 Tablica 13). Na uzorcima A1, A2, A3 pojavljuju se novi pikovi pri 37,8 2θ° koji izostaju u standardu metimazola, dok istim uzorcima nedostaju pikovi pri 24,0 2θ° i 28 2θ° u odnosu na standard metimazola (Slika 47). Na ostalim se uzorcima A4-8 i A10 uočavaju jednako odsustvo/prisustvo pikova. Nažalost dobiveni kristali nisu bili dobre kvalitete za provedbu strukturne analize na monokristalu.



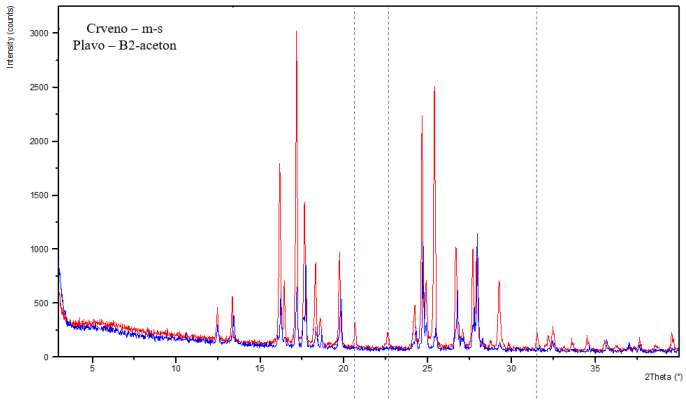
Slika 47. Difraktogram praha za uzorke A1-A3 uspoređeni sa standardom metimazola.

Nastavno na dobivene rezultate gdje je kristalizacija provedena na sobnoj temperaturi bez zagrijavanja otapala promotrena je kristalizacija uz zagrijavanje otapala. S tim u svezi

kristalizacija **1** provedena je iz vode, acetona, butanola, izopranola, izobutanola, etilnog acetata i metanola uz zagrijavanje pri temperaturama od 35°C do 72°C (uzorci B1-B8, poglavlje 3.9.2 Tablica 14). Razlike u difraktogramima praha uočene su u uzorcima kristaliziranih iz vode (B1) i acetona (B2) dok u ostalim uzorcima (B3-B8) nisu uočene promjene u odnosu na standard metimazola. Pobliže promatrajući razlike kod uzorka B1 primijećen je izostanak pika pri 15,3 i 15,4 2θ° (Slika 48) dok je i na uzorku B1 i B2 primijećen izostanak pikova pri 21,0 i 25,5 2θ° u odnosu na standard metimazola (Slika 48, 49).

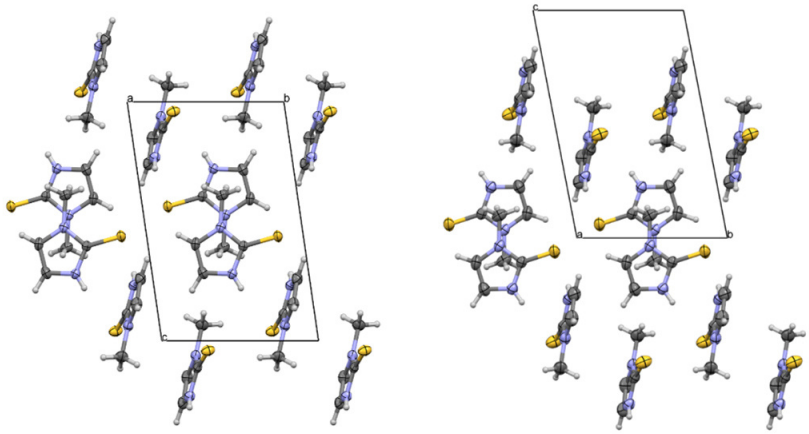


Slika 48. Difraktogram praha B1(plavo) uspoređen sa standardom metimazola (crveno).



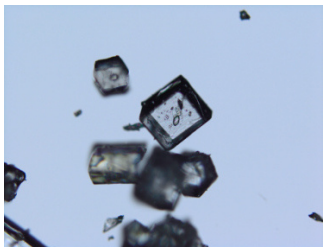
Slika 49. Difraktogram praha B2 (plavo) uspoređen sa standardom metimazola (crveno).

Dodatno, provedena je rentgenska strukturnom analizom na monokristalima **1** iz pokusa B1 i B2, no nisu utvrđene razlike u jedničnoj ćeliji kristala kao niti u pakiranju molekula **1** (Slika 50).



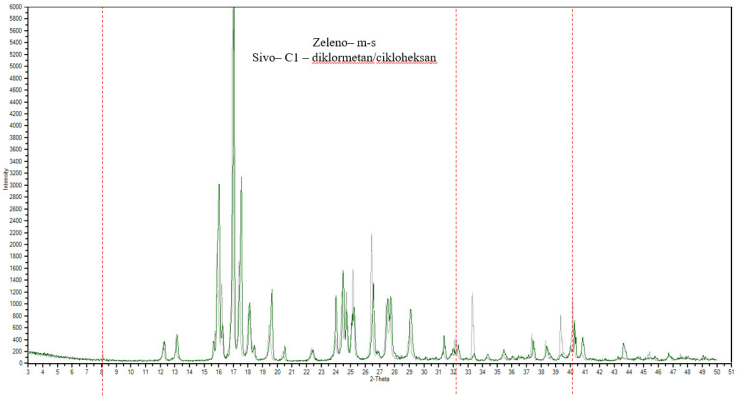
Slika 50. Kristalna struktura **1**; uzorak B1 lijevo, uzorak B2 desno.

U cilju utvrđivanja ponašanja **1** pri različitim kristalizacijskim uvjetima dodatno su proučene kristalizacija taloženjem i kristalizacija spontanom difuzijom u zasićenoj atmosferi kontraotapala. Kristali **1** dobiveni otapanjem u zagrijanom diklormetanu i istaloženi s cikloheksanom (C1) (Slika 51) pokazali su razlike u difraktogramu praha dok se talište od 143,7°C nije značajno razlikovalo u odnosu na standard metimazola.



Slika 51. Mikrograf kristala **1** dobivenih kristalizacijom taloženjem iz diklormetana i cikloheksana (C1).

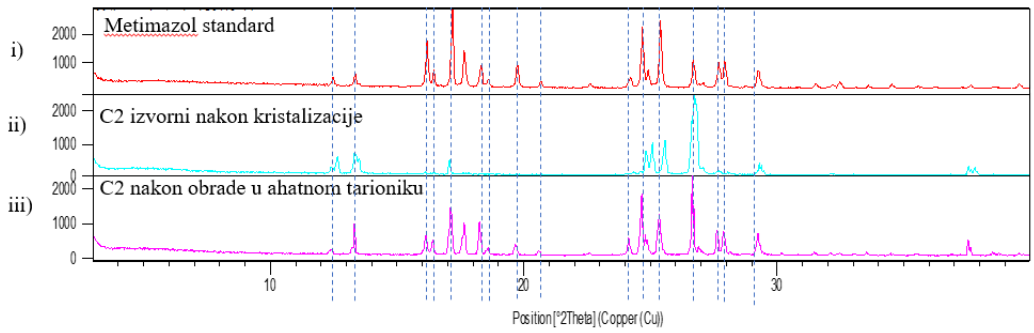
Analizom difraktograma praha **1** (uzorak C1) uočeno je prisustvo dodatnih pikova pri 8,0, 32,0, 40,0 2θ° u odnosu na standard metimazola (Slika 52).



Slika 52. Difraktogram praha C1 (sivo) uspoređen sa standardom metimazola (zeleno).

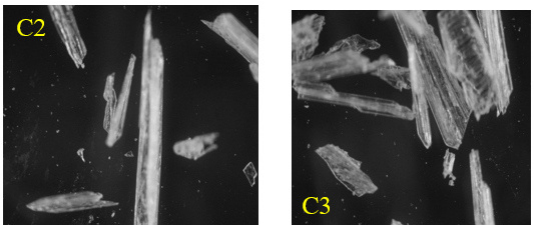
Štoviše, kako bi se unijelo više svjetla u razlika u uočenoj morfologiji kristala i difraktogramima praha C1 određena je kristalna struktura rentgenskom strukturnom analizom. Kristalna struktura je snimljena pri sobnoj temperaturi, a nakon rješavanja i utočnjavanja za zaključiti je da svi parametri jedinične ćelije kao i pakiranje odgovaraju izvornoj triklinskoj formi P-*1* (Poglavlje 3.9.3 Tablica 17).

Kristali C2 i C3 dobiveni otapanjem **1** u acetonu i taloženjem heksanom pri različitim omjerima otapalima (C2 - 7 mL aceton:10 mL heksan; C3 – 10 mL aceton: 10 mL heksan) inicijalno su pokazali razliku u difraktogramima i to predominantno odsustvo pikova u području od 17,0 do 25,0 2θ° odmah nakon priprave no, nakon obrade u ahatnom tarioniku difraktogram je bio jednak difraktogramu praha standarda metimazola (Slika 53).



Slika 53. Difraktogrami praha: i) standarda metimazola, ii) C2 izvorni iz sinteze, iii) C2 obrađen u ahatnom tarioniku.

Kako bi se stekao detaljni uvid u morforlogiju kristala C2 i C3 snimljeni su mikrografi uzorka a, izgled kristala upućuju na prisustvo preferencijalnih kristalnih ploha (Slika 54).



i) ii)

Slika 54. Mikrografi: i) uzorak C2, ii) uzorak C3.

Proveden je i pokus kristalizacije **1** iz diklormentana spontanom difuzijom para cikloheksana, no nisu uočene razlike u odnosu na standard metimazola.

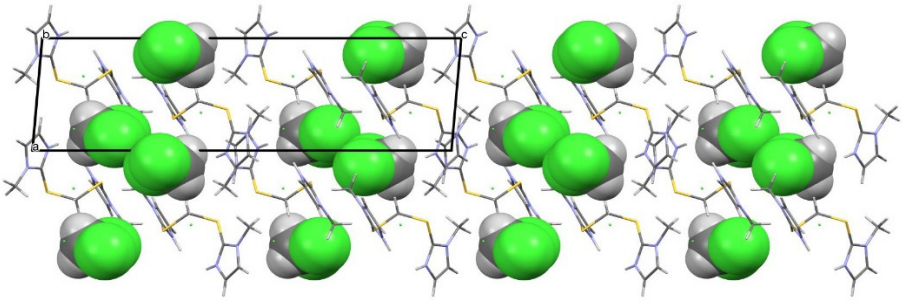
Gledajući dobivene rezultate možemo zaključiti da se kristalizacijom **1** iz polarnih protočnih i aprotočnih otapala u većini slučajeva dobivaju kristali s različitim difraktogramima praha u usporedbi s standardom metimazola. U nekim slučajevima gdje su kristali bili dobre kvalitete određena je kristalna struktura, a rezultati su pokazali istovjetnost kristalografskih podataka s triklinskim standardom polimofa. S druge strane, preferencijalna orijentacija je intrinzično svojstvo kristala pri čemu se kristali usmjeravaju prema preferiranim kristalnim plohama. Uobičajeno preferencijalna orijentacija utječe na povećanje intenziteta pika no isto tako može utjecati na 2θ° vrijednosti pri čemu značajno može utjecati na interpretaciju difraktograma praha.[204] Tijekom pripreme uzorka za XRPD analizu preporuka je, a i dobra praksa usitnjavati uzorak,[205] no to s druge strane može potaknuti promjene u kristalnoj strukturi poput slučaja karbamzepina [206] ili pak famotidina.[207] Preferencijalna orijentacija može biti uzrokom razlike što upućuju rezultati mljevenja kod uzoraka C2 i C3, gdje se dobiva izvorna forma **1**, no to ne može isključiti činjenicu da nisu prisutni drugi polimorfni oblici. Na kraju ostaje pitanje, da li je u ovim uzorcima riječ o preferencijalnoj orijentaciji pripremljenih kristala ili je riječ o novim polimofima, a s tim u svezi nužne su daljnje studije u ovom području kako bi se to razlučilo.

4.3.2. Čvrste forme srodnih tvari

*Čvrste forme 1,1-bis[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorida (**2**b) i transformacija u čvrstom stanju*

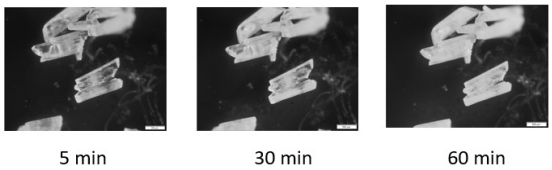
Diklormetanski solvat 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid (**2c**) $[C_9H_{14}N_4S_2]Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$; molarne mase, 327,12; kristalizira u monoklinskom sustavu prostorne

skupine $P2_1/c$ u stehiometrijskom omjeru 1:1 pripravljen je reakcijom **1** s diklormetanom, a kristali su direktno izvađeni iz otopine i snimljeni. Molekulska struktura sastoji se od dvije imidazolne skupine pozitivno nabijene i vezane za *S*-atome ditiometilne skupine. Kloridni anioni imaju ulogu akceptora vodikove veze iz protoniranog atoma dušika imidazola. Važno je istaknuti da između imidazolne molekule i molekule diklormetana ne postoje vodikove veze što može biti razlog slaboj stabilnosti diklormetanskog solvata **2c** (Slika 55).



Slika 55. Kristalno pakiranje **2a** gledano duž kristalografske osi *b*. Molekule diklormetana prikazane su u CPK modelu.

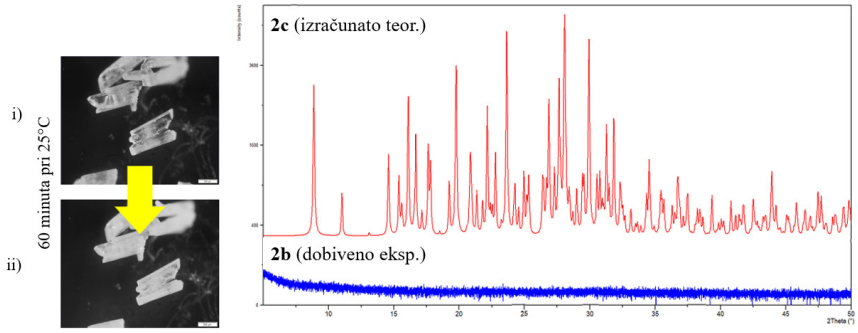
Tijekom izolacije i manipulacije kristalima **2c** dolazi do promjene iz bezbojne u bijelu boju (Slika 56), a proces transformacije traje 60 minuta. Dodatno proces promjene kristala praćen je optičkom mikroskopijom (Slika 56), pri čemu je vidljivo smanjenje prozirnosti kristala pri utjecaju sobne temperature koji započinje na njegovom rubu te se postepeno širi prema središtu, a navedeno je u skladu s literaturnim opisima desolvatacije.[208]



Slika 56. Mikrografi procesa desolvatacije **2c** pri 25°C tijekom 60 minuta i transformacija u **2b.**

Solvati se mogu klasificirati kao pseudopolimorfni oblici. Kada je riječ o asocijaciji otapala s kristalnom tvari, u širem smislu razlikujemo tri slučaja, a to su: a) kristalna arhitektura u kojoj su molekule otapala na površini kristala vezane slabim međumolekulskim silama, zatim b) kristali u kojima je otapalo zarobljeno u pukotinama ili u unutrašnjosti kristala tijekom rasta, ili

pak c) kristali gdje je otapalo vezano u kristalnu rešetku vodikovim vezama ili pak slabim Van der Walsovim vezama, a potonji se mogu dodatno dijeliti na stehiometrijske i nestehiometrijske solvate.[209] Poznato je da promjene u kristalnoj rešetki mogu dovesti do reorganizacije kristalnog sustava kao u slučaju gdje dolazi do stvaranja izostrukturnog solvata[210] ili pak do promjene kristalnog sustava primjerice kod solvata ciklosenida[211] ili u nekim slučajevima i do urušavanja kristalne strukture u neuređeno amorfno stanje kao što je nađeno kod nekih azitromicinskih derivata.[212] Poznavajući navedene slučajeve pristupilo se dodatnim studijama koja su uključivale primjenu XRPD tehnike. Na Slici 57 (i) može se uočiti promjena iz **2b** s vrlo jasno definiranim difraktogramom koji nakon 60 minuta stajanja na sobnoj temperaturi prelazi u amorfno stanje **2b** (Slika 57, ii). U prilog opaženoj transformaciji iz **2c** u **2b** ide i činjenica je diklormetan vrlo slabo vezan u strukturi solvata što zbog visoke hlapljivosti pri sobnoj temperaturi rezultira brzim izlaskom i urušavanjem kristalne strukture, a u prilog tome govori i vremenski okvir transformacije od 60 minuta. Međutim, kako je i prije navedeno, poznato je da promjene tijekom desolvatacije ili stajanja mogu rezultirati preslagivanjem i promjenom kristalnog sustava ili pak može doći do resolvatizacije izlaganjem parama otapala. Na tom tragu provedena su dodatna dva pokusa u trajanju od 15 dana koja su uključivala stajanje **2b** pri sobnoj temperaturi i dodatno izlaganje **2b** atmosferi diklormetana. U konačnici nakon provedenih pokusa nisu uočene promjene u amorfnoj fazi **2b**, što upućuje na njezinu stabilnost pri promatranim uvjetima.



Slika 57. Mikrofotografi: (i) početnog diklormetanskog solvata **2c** i ii) amorfa **2b** nakon 60 minuta pri 25°C i povezani difraktogrami praha.

*Čvrste forme 1,2-bis[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tio]etana **3a** i transformacija u čvrstom stanju*

Dihidrokloridna sol 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana u formi tetrahidrata (**3b**) molekulske formule $[C_{10}H_{16}N_4S_2]Cl_2 \cdot 4(H_2O)$ i molarne mase 399,35, kristalizira u

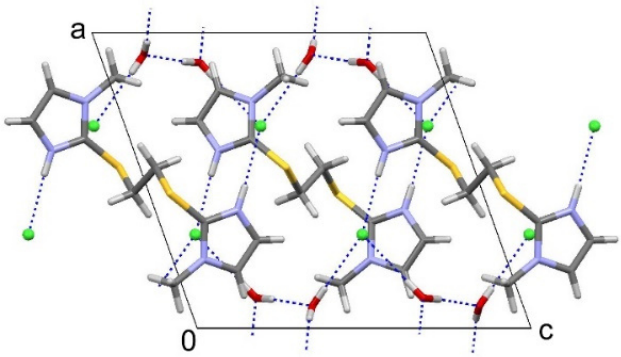
monoklinskom sustavu prostorne skupine $P2_1/c$ pripravljena je reakcijom **1** s diklormetanom. Molekularna struktura **3b** sastoji se od dvije kationske imidazolne skupine vezane za S-atome ditioetilne skupine. Svaki kloridni anion ima ulogu akceptora vodikove veze iz protoniranog atoma dušika imidazola i dvije molekule vode (Tablica 30). Važno je istaknuti da se etanski dio nalazi u centru simetrije, pa je stoga samo polovica molekule **3b** u asimetričnoj jedinici, a imidazolne su skupine orijentirane paralelno jedna u odnosu na drugu.

Tablica 30. Udaljenosti i kutovi vodikovih veza za **3b.**

Donor-H···Akceptor	***d*(D-H)/Å**	***d*(H-A)/Å**	***d*(D···A)/Å**	**< *d*(D-H···A)/°**
N2-H2···Cl[a]	0,86	2,26	3,112(2)	172
O1-H11···O2[b]	0,78(4)	1,98(4)	2,749(5)	169(5)
O1-H12···Cl[c]	0,75(5)	2,44(5)	3,190(4)	178(6)
O2 -H21···Cl	0,78(6)	2,42(6)	3,198(4)	174(5)
O2 -H22···O1	0,83(3)	1,93(3)	2,756(5)	172(3)

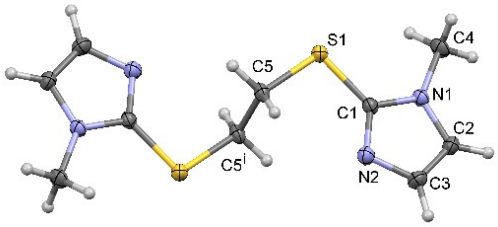
Transformacija asimetrične jedinice: a) 1-x, -1/2+y, 1/2-z; b) -x, 1/2+y, 1/2 -z; c) x, 3/2-y, 1/2+z; d) -x+y, -x, z; e) y, -x+y, -z; f) 1/3-x+y, 2/3-x, -1/3+z.

Dvije molekule vode također su povezane vodikovim vezama. Kroz vodikove veze kationski nabijen protonirani imidazol, kloridni anioni i molekule vode međusobno su povezani u 3D mrežu (Slika 58, Tablica 30).



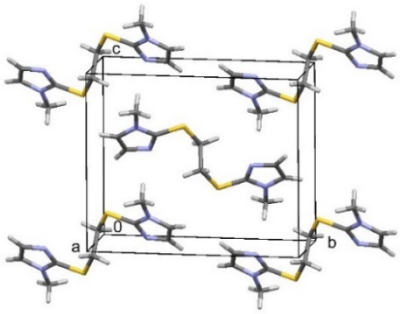
Slika 58. Prikaz pakiranja **3b** gledano duž osi *b*. Vodikove veze označene su isprekidanim plavim linijama.

Bezvodna forma koja odgovara naslovnoj molekuli 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana (**3a**) molekulske formule [$C_{10}H_{14}N_4S$] i molarne mase 254,37, kristalizira u monoklinskom sustavu prostorne skupine $P2_1/c$ pripravljena je kristalizacijom iz suhog diklormetana u atmosferi niske vlažnosti. Molekulska struktura **3a** po svojoj je građi jednaka **3b** izuzev protoniranog imidazolnog prstena (Slika 59), a pakiranje molekula prikazano je na Slici 60.



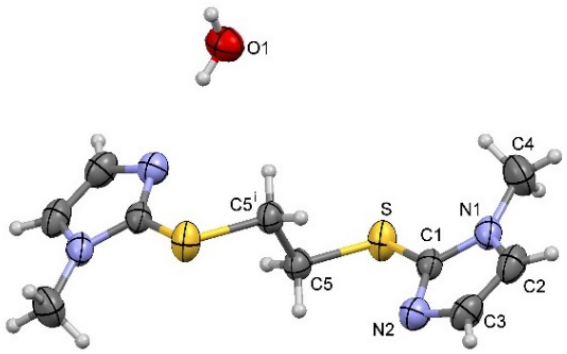
Slika 59. Molekularna struktura **3a** sa shemom atomskog numeriranja.

Između molekula **3a** nisu prisutne vodikove veze već ih međusobno povezuju slabe Van der Waalsove veze (Slika 60).



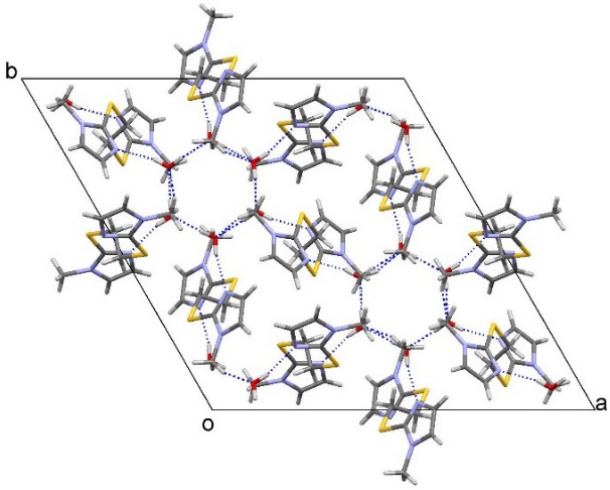
Slika 60. Prikaz pakiranja u spoju **3a**.

1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan u formi dihidrata (**3c**) molekulske formule $C_{10}H_{14}N_4S_2 \cdot 2(H_2O)$ i molarne mase 290,40 kristalizira u trigonskom sustavu prostorne skupine *R*-3, a pripravljen je kristalizacijom iz smjese aceton/voda u omjeru 1:1. Molekularna struktura **3c** jednaka sastoji se od imidazolne skupine vezane za S-atome ditioetilne skupine (Slika 61) i u tom je segmentu jednaka već prije opisanoj strukturi **3a**.



Slika 61. Molekularna struktura **3c** sa shemom atomskog numeriranja; kôd simetrije (i) 2/3-x, 1/3-y, 4/3-z.

Promatrajući organizaciju molekula **3c** vidljivo je da su šest molekula vode međusobno povezane vodikovim vezama pri čemu tvore šesterokut u konformaciji stolice, koja je najčešća konformacija za strukture koje imaju šest molekula vode. Dodatno, u **3c** jedna molekula vode tvori uzorak R6 pomoću elementa simetrije -3 ($R_6^6(12)$., što je u skladu s literaturnim podacima gdje motiv R6 obično tvore molekule vode povezane centrom simetrije.[213] Važno je istaknuti da je molekula vode akceptor vodikovih veza iz N2 i C4 čime tvori 3D mrežu (Slika 62, Tablica 31).



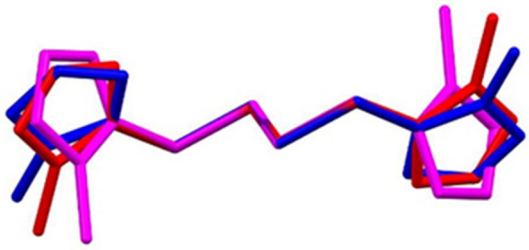
Slika 62. Prikaz pakiranja **3c** gledano duž osi *c*. Vodikove veze označene su plavim isprekidanim linijama.

Tablica 31. Udaljenosti i kutovi vodikovih veza za **3c**.

Donor-H···Akceptor	***d*(D-H)/Å**	***d*(H-A)/Å**	***d*(D···A)/Å**	**< *d*(D-H···A)/°**
O1-H1···N2[d]	0,81(3)	2,03(3)	2,827(3)	167(4)
O1-H12···O1[e]	0,87(4)	1,92(4)	2,787(4)	176(4)
C4-4B···O1[f]	0,96	2,58	3,489(4)	157

Transformacija asimetrične jedinice: a) 1-x, -1/2+y, 1/2-z; b) -x, 1/2+y, 1/2 -z; c) x, 3/2-y, 1/2+z; d) -x+y, -x, z; e) y, -x+y, -z; f) 1/3-x+y, 2/3-x, -1/3+z.

Ako promotrimo molekularne strukture **3a**, **3b** i **3c** možemo zaključiti da se 1,2-bis [(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan sastoji se od dvije imidazolne skupine vezane za *S*-atome ditioetilne skupine (**3a**, **3c**) dok su skupine imidazola protonirane u **3b**. U sve tri strukture etanski dio leži u centru simetrije, pa je samo polovica molekule u asimetričnoj jedinici te su stoga skupine imidazola međusobno paralelno orijentirane. Razlika u tri promatrane strukture je u orijentaciji imidazolne skupine, tj. rotaciji oko veze S-C1 što rezultira različitim torzijskim kutovima C5-S-C1-N1 i to kako slijedi: -173,8 (2) ° za **3a**, -113,4 (2) ° za **3b** i 151,8 (2) ° za **3c** (Slika 63).

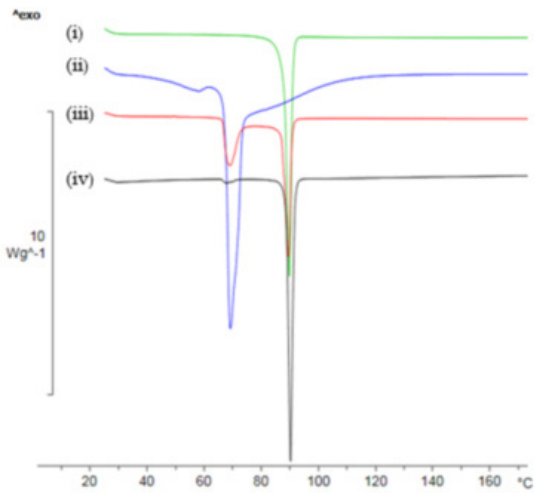


Slika 63. Prekrivanje molekula **3a** (plavo), **3b** (ljubičasto) i **3c** (crveno). Za preklapanje su korišteni atomi C5 i S i njihovi parovi povezani centrom inverzije. Atomi vodika izostavljeni su radi jasnoće.

Hidrati su najčešći tip solvatiranih organskih spojeva,[214] a razumijevanje njihovih puteva dehidracije, kao rasprostranjene, ali nedovoljno shvaćene pojave, kritično je za projektiranje optimalnih svojstava materijala, osobito u slučaju farmaceutskih krutina.[215] Predloženo je nekoliko shema za klasifikaciju hidrata,[216,217,218] ali općenito, dehidracija rezultira s tri vrste kristalografskog ponašanja: a) kristalografski sustav u kojem se kristalna struktura mijenja

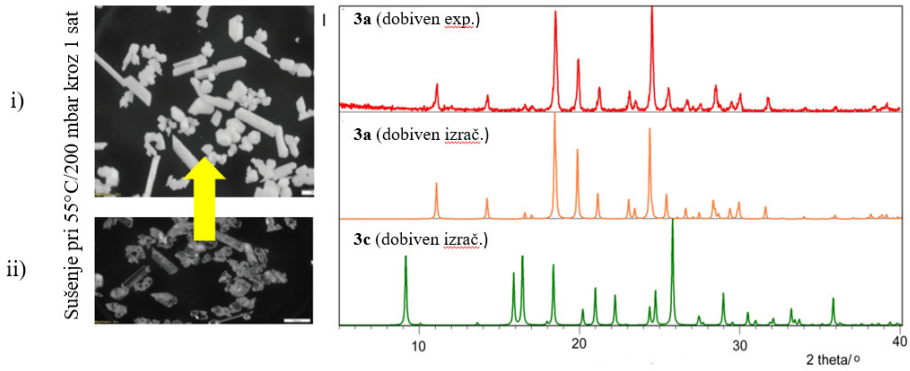
(različit difraktogram praha) nakon dehidracije, do b) kristalografski sustav koji podliježe neznatnoj promjeni kristalne strukture (srodni difraktogram praha) nakon dehidracije, poput nekih solvata azitromicina,[219] ili c) kristalografski sustav koji nakon dehidracije postaje amorfan, poput nekih drugih azitromicinskih solvata.[220]

Različitim eksperimentalnim tehnikama je proučen postupak dehidracije dihidrata **3c** do bezvodnog oblika **3a**. Prvo je promotreno zagrijavanje dihidrata **3c** ispod temperature tališta, na oko 55°C pri sniženom tlaku od 200 mbar do konstantne mase. Nakon 30 minuta uočena je promjena u prozirnosti kristala što upućuje na proces dehidracije, a nakon 60 minuta kristali su potpuno bijeli što upućuje na završetak procesa. Paralelno sa sušenjem u sušnici uzorak **3c** snimljen je DSC tehnikom (Slika 64). Karakteristični termogram za **3c** (Slika 64, ii) vidljiv je na početku mjerenja, no nakon 30 minuta zagrijavanja brzinom 10 K/min pri inertnoj atmosferi dušika uočavaju se dva endoterman pika, gdje jedan odgovara taljenju dihidrata **3c** i drugi koji odgovara spoju **3a** (Slika 64, iii). Nakon 60 minuta zagrijavanja vidljiv je samo jedan endotermni pik s vrijednosti od 90°C koji odgovara taljenju bezvodne forme **3a** (Slika 64, iv), što je u skladu s standardom **3a** (Slika 64, i). Tijekom procesa zagrijavanja važno je istaknuti da nisu uočeni pikovi koji bi upućivali na prekristalizaciju.



Slika 64. Termogrami transformacije dihidrata **3c** u bezvodni oblik **3a** snimljeni pri brzini zagrijavanja od 10°C/min u struji dušika (i) bezvodni oblik **3a**; (ii) dihidrat **3c**; (iii) uzorak **3c** nakon zagrijavanja na 55°C/200 mbar tijekom 30 minuta, i (iv) uzorak nakon zagrijavanja **3c** na 55°C/200 mbar tijekom 60 minuta.

Kako bi se uočene promjene dovele u bolji kontkest, uzorak osušen pri 55°C/200 mbar tijekom 60 minuta snimljen je XRPD tehnikom i sukladno očekivanju, difraktogram je bio je različit od praha dihidrata **3c**, no s druge strane bio je identičan uzorku praha bezvodnog **3a** pripravljenog kristalizacijom (Slika 65), a ovo dodatno podržava činjenicu da je bezvodni **3a** finalni produkt dehidracije **3c**.

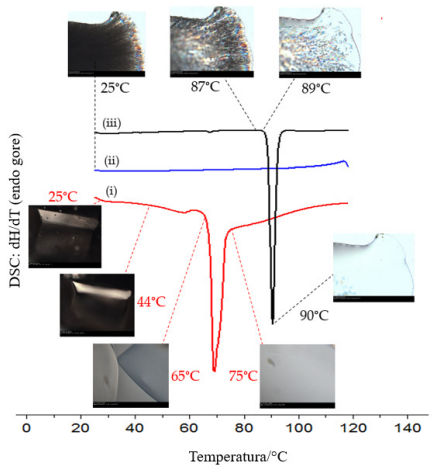


Slika 65. Mikrografi: (i) bezvodnog **3a** nakon sušenja **3c** tijekom 60 minuta na 55°C/200 mbar; (ii) početni dihidrat **3c** i pripadajući difraktogrami praha.

Dodatna istraživanja provedena su pod atmosferskim tlakom kako bi se utvrdilo odvija li se dehidracija **3c** do **3a** putem metastabilnog monohidrata, kao u lizinopril dihidratu,[221] ili putem hemihidrata, u ondansetron hidroklorid dihidratu.[222]

Promjene nakon dehidracije **3c** praćene su kombinacijom termalne mikroskopije (HSM) i DSC tehnike pri brzini zagrijavanja/hlađenja od 10°C/min (Slika 66). Proces taljenja **3c** započinje na 40°C i završava na oko 65°C (Slika 66, i). Odmah, nakon tališta, talina **3c** je ohlađena na sobnu temperaturu dajući staklasti produkt koji nije kristalizirao iako je praćen kroz dulje vrijeme. Međutim, ako se **3c** zagrijavao do 80°C uronjen u ulje tijekom HSM pokusa i potom talina ohlađena, primijećena je rekristalizacija dihidrata **3c** zbog uvjeta koji sprječavaju učinkovito uklanjanje vode. Štoviše, ako se uzorak zagrijavao tijekom taljenja, do 95°C u otvorenoj posudi, nakon čega je slijedilo hlađenje na sobnu temperaturu, došlo je do spontane kristalizacija, a prema XRPD -u dobivena je smjesa dihidrata **3c** i bezvodnog oblika **3a**. Nasuprot tome, ako je talina **3c** zagrijavana do 120°C i potom ohlađena na sobnu temperaturu, došlo je nakon duljeg stajanja do sporog procesa nukleacije i rasta bezvodnog oblika **3a**, što je i vidljivo na mikrografu (Slika 66, ii). Nastavno zagrijavanjem ohlađenog uzorka uočava se početak taljenja na 89°C

koje u potpunosti završava na oko 90°C (Slika 66, iii), a navedeno u potpunosti odgovara bezvodnom obliku **3a**.



Slika 66. Odabrani DSC termogrami i HSM mikrografi dihidrata **3c** snimljeni pri brzini zagrijavanja/hlađenja od 10°C/min: (i) korak zagrijavanja dihidrata **3c** do 120°C; (ii) korak hlađenja na sobnu temperaturu i (iii) korak zagrijavanja rekristaliziranog bezvodnog oblika **3a**.

Važno je napomenuti da tijekom zagrijavanja i hlađenja nisu uočeni dodatni egzotermni i endotermni događaji niti promjene u XRPD u koje bi mogle ukazivati na stvaranje potencijalnih monohidratnih ili hemihidratnih formi. Uočene promjene podržavaju činjenicu da dehidracija **3c** *in vacuo* pogoduje brzom uklanjanju vode ispod tališta, bez pojave tekućine ili faze taljenja. Uklanjanje molekula vode iz **3c** pod tim uvjetima dovodi do premještanja molekula u kristalnoj rešetki, i formiranja novog kristalnog sustava koji odgovara bezvodnom **3a**. Štoviše, kristalizacija **3a** iz taline dihidrata **3c** pod atmosferskim tlakom događa se tek kada je sva preostala voda uklonjena iz uzorka (na 120°C). S druge strane, kada je uzorak dihidrata **3c** zagrijan samo do 95°C, primijećena je istovremena kristalizacija **3a** i **3c**, što je u skladu s djelomičnom dehidracijom **3c** nakon 30 minuta pod sniženim tlakom.

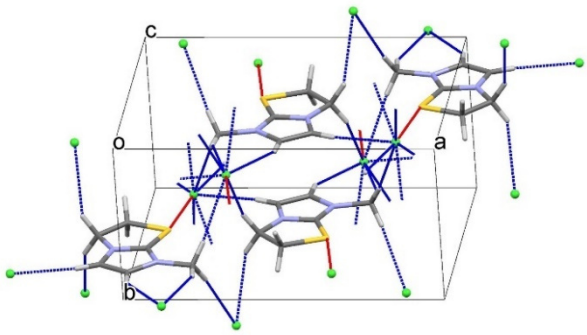
U konačnici, možemo zaključiti da dehidracija u oba uvjeta, tj. pod smanjenim i atmosferskim tlakom prelazi u bezvodni oblik **3a** te je u skladu s dobro poznatom činjenicom da procesi dehidracije uvelike ovise o atmosferskom okruženju.[201,217]

*Čvrste forme 7-metil-2H,3H,7H-imidazol[2,1-b]tiazol-4-ijum klorida (7**a**) i tetrafluoroborata (7**b**)*

7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid (**7a**) molekulske formule $C_6H_9N_2SCl$ i molarne mase 176,66, kristalizira u ortorombskom kristalnom sustavu prostorne skupine.

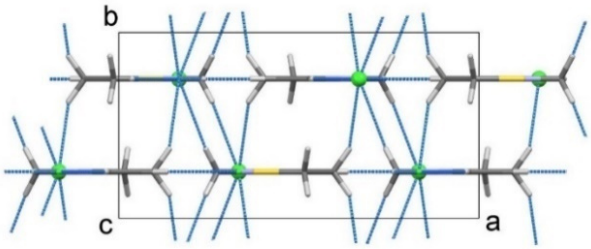
Pnma, a pripravljen je spontanom kristalizacijom **4** u čvrstom stanju. Molekularna struktura **7a** sastoji se od planarne imidazoltiazolne jedinice koja leži paralelno s *ac* kristalografskom osi.

U usporedbi s neutralnim imidazoltiazolima vidljivo je da uvođenje pozitivnog naboja utječe na promjenu u imidazolnom djelu bicikličke jedinice.[223] Duljine veza u **7a** između C1-N1 od 1.327 (3) Å, i S-C1 od 1.725 (2) Å ukazuju da između navedenih atoma ne postoji formalna dvostruka veza. Očekivana vrijednost za C=N vezu iznosu 1,265 Å dok za C-N iznosi 1,474 Å[224], te je za zaključiti da veze između C1-N1 i C1-N2 imaju neku vrstu karaktera dvostruke veze. Dodatno udaljenost između S-C1 iznosi 1.725 (2) Å dok očekivana vrijednost za C=S iznosi 1,61 Å[225] što upućuje na postojanje pozitivnog naboja. Finalno, sagledavajući duljine veze možemo zaključiti da atomi sumpora i dušika sa slobodnim elektronskim parovima u interakciji s C1 i N1 doprinose delokalizaciji što je u skladu s literaturnim podacima,[226] dok tiazolni prsten ima više alifatski karakter. Na Slici 67 prikazano je pakiranje 4 molekule **7a** u jediničnoj ćeliji. Postoje slabe vodikove veze tipa C-H ⋯ Cl u rasponu od 3.484 (2) do 3.7655 (12) Å koje povezuju ione u 3D strukturu.



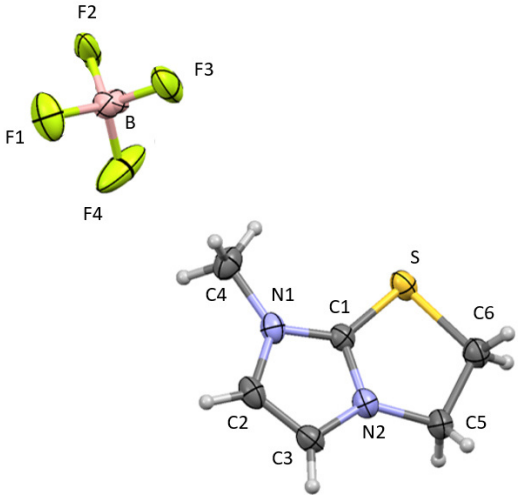
Slika 67. Prikaz pakiranja molekula **7a**. Vodikove veze označene su plavim točkastim linijama, a elektrostatička interakcija Cl · ·· S crvenim linijama.

Atom klora je nabijen formalno negativno dok atom sumpora S može biti pozitivno nabijen uzimajući u obzir delokalizaciju tiamidnog djela molekule. U prilog tome ide i slaba elektrostatička interakcija između Cl · ·· S koja objašnjava kratki kontakt od 3.2125 (9) (Slika 68).



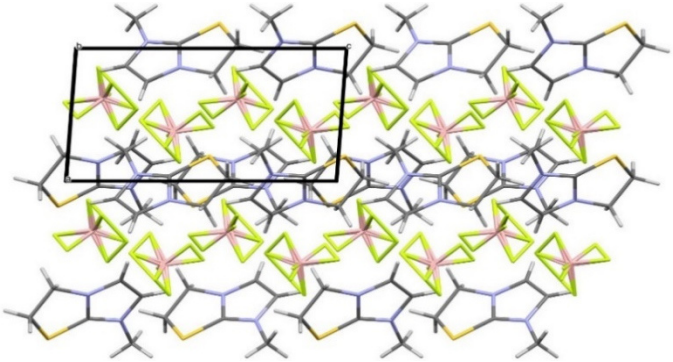
Slika 68. Projekcija **7a** duž *c* osi. Vodikove veze označene su isprekidanim plavim linijama.

Tetrafluorboratna sol 7-metil-2*H*,3*H*,7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum tetrafluoroborat (**7b**) molekulske formule $C_6H_9BF_4N_2S$ i molarne mase 228,02, kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu prostorne skupine $P2_1/c$, a monokristali su pripravljeni kristalizacijom sporim isparavanjem iz metanola. Molekularna struktura **7b** poput **7a** sastoji se od planarne imidazoltiazolne jedinice (Slika 69). Razlika u anionskom djelu molekule uzrokovala je promjenu kristalnog sustava, tj. **7a** kristalizira u ortorombskom dok **7b** u monoklinskom kristalnom sustavu, što je u skladu s očekivanjem obzirom da je anion koordinacijski ovisan o veličini i geometriji. Nisu uočene značajne razlike u duljinama veza u imidazoltiazolnom djelu molekule između **7b** i **7a**, što podržava postojanje delokaliziranog pozitivnog naboja.



Slika 69. Molekularna struktura **7b** sa shemom atomskog numeriranja.

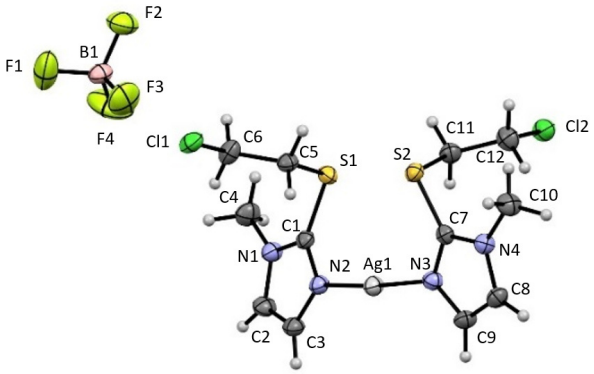
Na Slici 70 prikazano je pakiranje 4 molekule **7b** u jediničnoj ćeliji. Važno je istaknuti da između atoma u molekuli ne postoje vodikove veze već samo slabe Van der Waalsove veze između tetrafluorboratnog aniona i imidazoltiazolne jedinice tvoreći 3D strukturu.



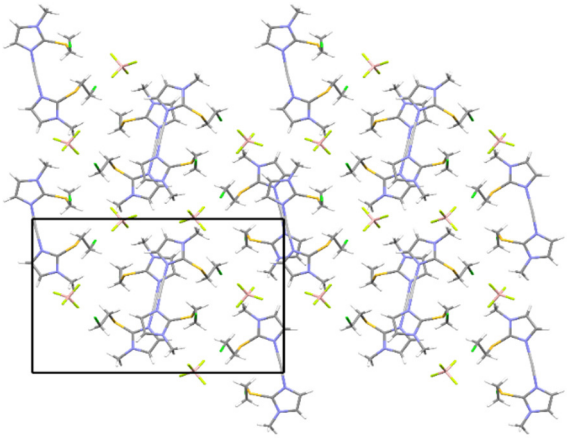
Slika 70. Prikaz pakiranja molekula u **7b**.

*Čvrsta forma Bis-{2-[(kloretil)tio]-1-metil-1H-imidazol}-srebrnog(I) tetrafluoroborata (**10**)*

Bis-{2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebrni(I) tetrafluoroborat (**10**) molekulske formule $C_{12}H_{18}N_4AgBCl_2F_4S_2$ i molarne mase 586,00, kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu prostorne skupine $P2_1/c$, a monokristali su pripravljeni kristalizacijom sporim isparavanjem iz metanola. U Molekularna struktura **5b** ioni srebra su koordinirani s dva dušikova atoma imidazolnih jedinica u približno linearnom razmještaju 173.93(8)° (Slika 71). Imidazolne jedinice nisu simetrijski ovisne i zaokrenute su za kut od 19°. Ključno je primijetiti da su duljine veza Ag1···S1 i Ag1···S2 kraće u odnosu na sumu van der Waalsovog radiusa dok su Ag1···Cl1 (iz susjedne molekule) I S1···Cl1 manji od njihove sume. Kationi su orijentirani u ravnini centra simetrije u lance paralelne s kristalografskom osi *c*. Slabo koordinirani tetrafluorboratni anion koordiniran je sa susjednim C-H vezama (Slika 72).



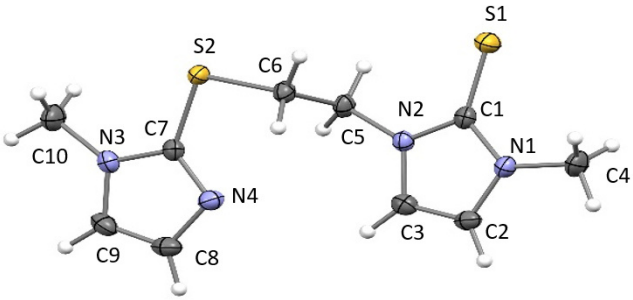
Slika 71. Molekularna struktura **10** sa shemom atomskog numeriranja.



Slika 72. Prikaz pakiranja molekula u **10** duž kristalografske osi *a*.

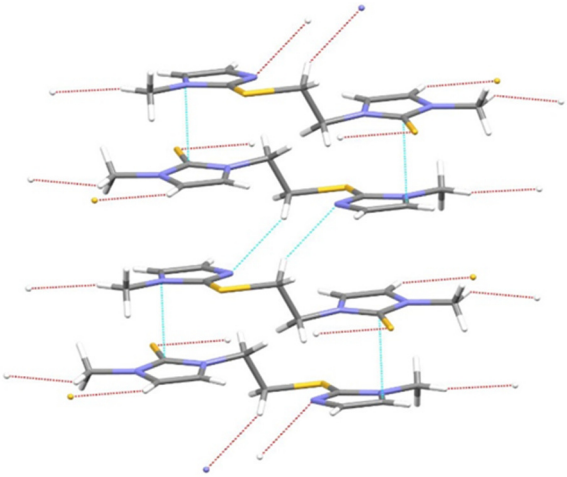
*Čvrsta forma 2,3-dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1H-imidazol-2-il)tioetil]-1H-imidazol-2-tiona (**11**)*

2,3-Dihidro-3-metil-1-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tioetil]-1*H*-imidazol-2-tion (**11**) molekulske formule $C_{10}H_{14}N_4S_2$ i molarne mase 254,37, kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu prostorne skupine $P2_1/c$, a monokristali su pripravljeni kristalizacijom sporim isparavanjem iz metanola. Molekularna struktura **11** sastoji se od dva imidazolna prstena odvojena tioeterskim $-CH_2-CH_2-S-$ mostom (torzijski kutovi su 77,1° i 158,6°). Pojedinačne molekule sastoje se od dva ravna dijela nagnuta za 6,8° (Slika 73).

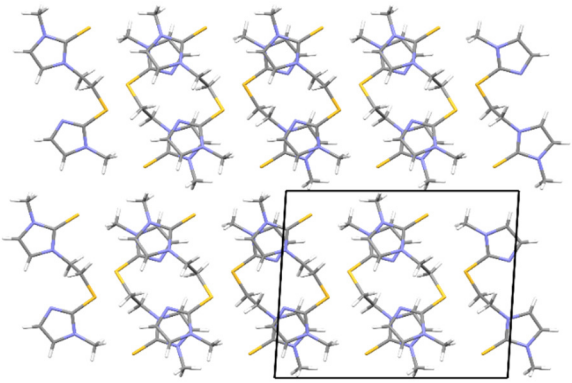


Slika 73. Molekularna struktura **11** sa shemom atomskog numeriranja.

Molekule su složene jedna uz drugu duž kristalografske osi b i drže ih slabe vodikove veze tipa C-H ⋯ N i π-interakcije. U druga dva smjera molekule drže zajedno C-H ⋯ S i kraći H ⋯ H kontakti (Slika 74, 75).



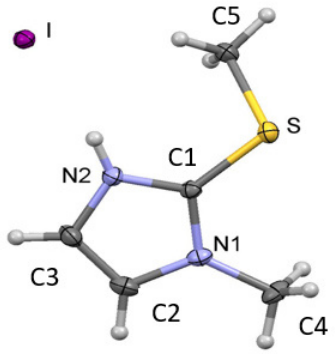
Slika 74. Prikaz intermolekulskih interakcija u **11**. Molekule su orijentirane paralelno duž kristalografske *b* osi.



Slika 75. Prikaz pakiranja molekula u **11** duž kristlografske osi *b*.

*Čvrsta forma 1-metil(2-metiltio)-1H-imidazol hidrojodida (**4b**)*

1-metil(2-metiltio)-1*H*-imidazol hidrojodid (**4b**) molekulske formule $C_5H_9IN_2S$ i molarne mase 256,10, kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu prostorne skupine $P2_1/c$, a monokristali su pripravljeni kristalizacijom isparavanjem iz acetona. Molekularna struktura **4b** sastoji se od pozitivno nabijenog imidazolnog prstena i negativno nabijenog jodida (Slika 76). Tiometilna skupina je rotirana izvan ravnine imidazolnog prstena. Duljine veza C1-S i C5-S od 1,7328(15) i 1,8013(17) Å, kao i C1-N1 i C1-N2 od 1,3371(18) i 1,3368(19) Å ukazuju na delokalizaciju dvostruke veze analogno kako je i već opisano u slučaju **7a** i **7b.**



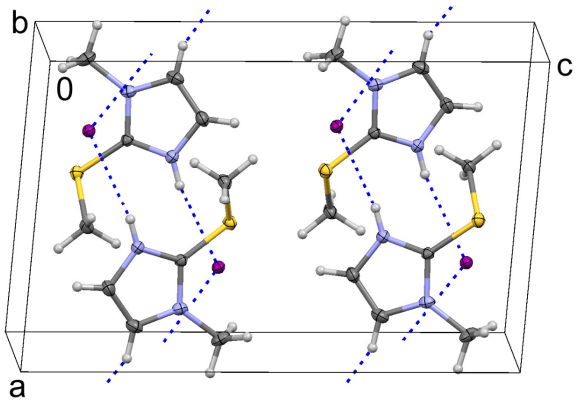
Slika 76. Molekularna struktura **4b** sa shemom atomskog numeriranja.

Kation i anion su povezani vodikovim vezama N2-H2···I od 2,713(18) Å i C2-H2···I od 3,050(18) Å u lance duž *a*-osi (Tablica 32).

Tablica 32. Udaljenost i kutevi vodikovih veza za **4b**.

Donor-H···Akceptor	***d*(D-H)/Å**	***d*(H-A)/Å**	***d*(D···A)/Å**	**< *d*(D-H···A)/°**	**Simetrija A**
N2-H2···I	0,81(7)	2,713(18)	3,495(8)	161	1-x,1/2+y,1/2-z
C2-H2···I	0,91(3)	3,050(18)	3,883(9)	152	-x,1/2+y,1/2-z

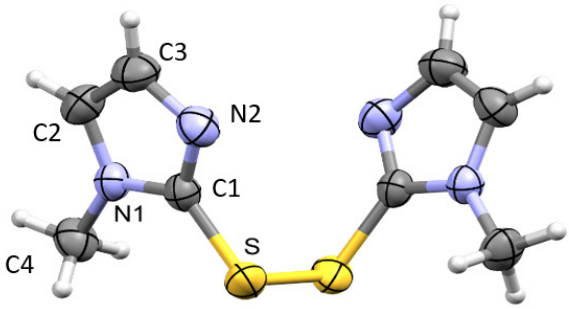
Promatrajući pakiranje **4b** u međumolekulskim interakcijama dominira kontakt C—H ··· I, što dovodi do stvaranja trodimenzionalnih mreža (Slika 77).



Slika 77. Pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji kristala hidrojodidne soli **4b**. Vodikove veze prikazane su plavim točkastim linijama

*Čvrsta forma 2,2'-disulfandiilbis (1-metil-1H-imidazola) (**5**)*

2,2'-disulfandiilbis (1-metil-1*H*-imidazol) (**5a**) molekulske formule $C_8H_{10}N_4S_2$ i molarne mase 226,32, kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu prostorne skupine *C*2/*c*, a monokristali su pripravljeni kristalizacijom isparavanjem iz etilnog acetata. Molekularna struktura **5b** sastoji se od dvije imidazolne jedinice povezane S-S vezom kroz čiju sredinu prolazi rotacijska ravnina (Slika 78). Torzijski kut za C - S - S – C iznosi 62,85 (6). Duljina disulfidne veze iznosi 2.0927 (5) Å.

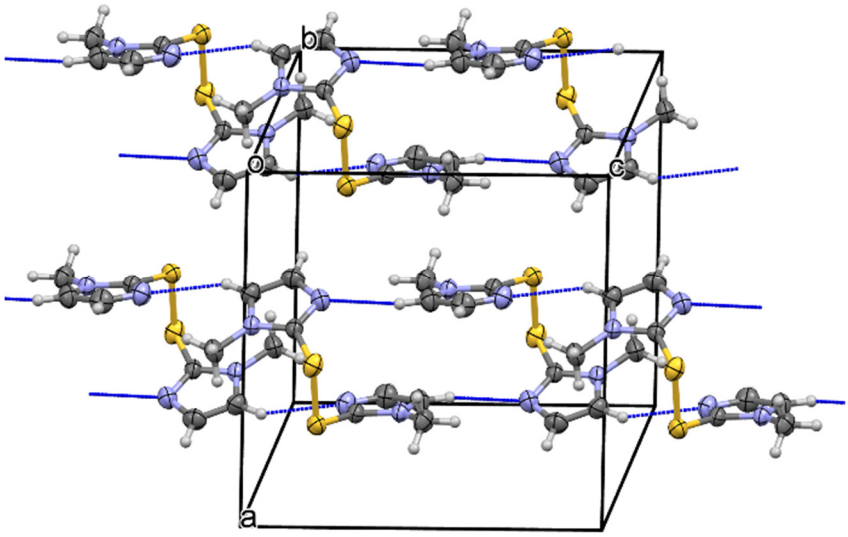


Slika 78. Molekularna struktura **5a** sa shemom atomskog numeriranja.

Molekule su u strukturi **5a** povezane slabim vodikovim vezama tipa C-H ··· N od 3.4227 (18) Å (Tablica 33) u dvostruke beskonačne lance. Među lancima su samo slabe van der Waalsove sile. Duljina disulfidne veze iznosi 2.0927 (5) Å (Slika 79).

Tablica 33. Udaljenost i kutevi vodikovih veza za **5a**.

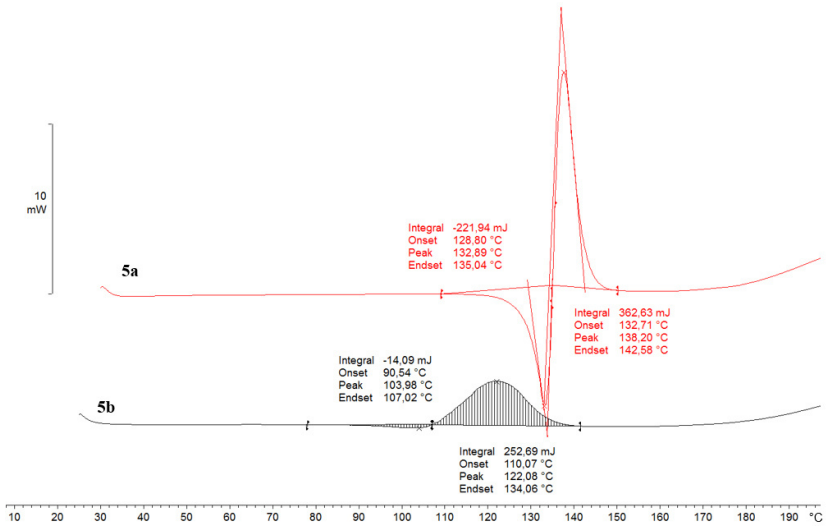
Donor-H···Akceptor	***d*(D-H)/Å**	***d*(H-A)/Å**	***d*(D···A)/Å**	**< *d*(D-H···A)/°**	**Simetrija A**
C2-H2···N2	0,930	2,620	3,422(7)	145	x,1-y,1/2+z



Slika 79. Pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji kristala **5a**. Vodikove veze prikazane su plavim točkastim linijama

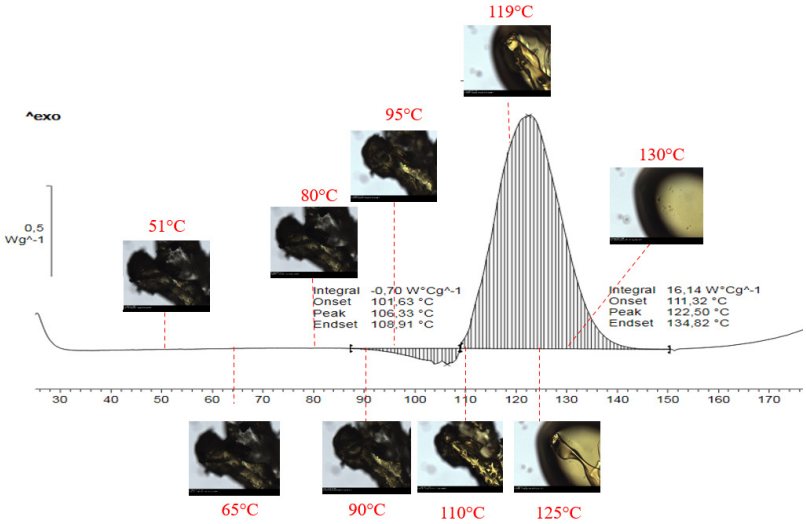
U literaturi je također opisana i bezbojna forma[50] **5a**. S ciljem dobivanja bezbojne forme provedeni su kristalizacijski pokusi iz diklormetana, dikloretana, acetona, etilnog acetata, metanola, etanola i izopropanola pri različitim omjerima (Poglavlje 3.7.26.), no u konačnici bezbojna forma nije dobivena.

Tijekom pokusa kristalizacije **5a** iz acetona sporim isparavanjem otapala u omjeru 10:0,5 (aceton/mL:**5a** g) dobiveni su kristali žute forme različitih svojstva, a ista je označena kao **5b**. Prema TLC-u nisu uočena prisutna onečišćenja, a *Rf* vrijednost odgovara **5a**. Na termogramima između uzoraka mogu se uočiti evidentne razlike, pri čemu je za **5a** vidljiv endotermni pik tališta s početkom pri 129°C, dok **5b** ima bitno različiti izgled termograma u odnosu na **5a**, a početak tališta mu je pri 90°C (Slika 80). Dodatno, plinskom kromatografijom određen je udio acetona u **5b** te je utvrđeno da je prisutno 3,02% acetona.



Slika 80. Termogrami **5a** i **5b** snimljeni pri brzini od 10 K/min u inertnoj atmosferi dušika.

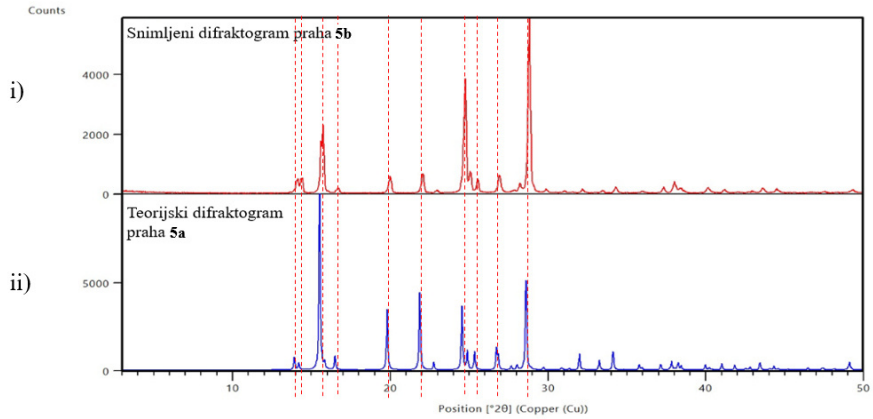
U cilju dodatnog rasvjetljavanja razlike u termogramima između **5a** i **5b** provedene su daljnje studije. Uzorci **5b** snimljeni su primjenom 1-D ^{1}H i ^{13}C i 2-D NMR tehnika i uspoređeni s kemijskim pomacima **5a,** no na spektrima nisu uočene značajne razlike. Dodatno kako bi se utvrdilo da li eventualno u uzorku ima tragova zaostalog jodida iz sinteze provedena je analiza ionskom kromatografijom no u **5b** nisu nađeni tragovi jodida. Analizom termalnom mikroskopijom uočavaju se promjene već pri 90°C koji u potpunosti odgovaraju početnoj vrijednosti na endotermnom piku, a zatim slijedi proces taljenja koji se glavninom odvija u egzotermnom piku a taljenje završava pri 130°C (Slika 81).



Slika 81. DSC termogram i HSM mikrograf **5b** snimljen pri brzini zagrijavanja od 10K/min.

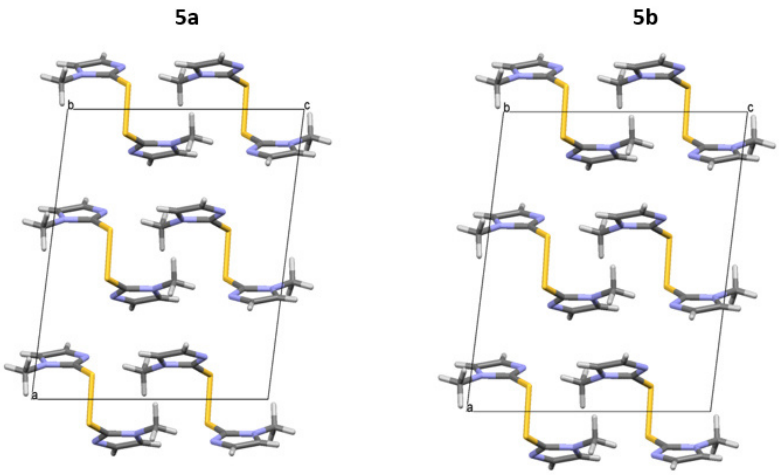
Na temelju uočenih razlika primjenom termalnih tehnika uzorak je analiziran XRPD, a na dobivenim difraktogramima se primjećuje da položaj prisutnih pikova 2θ° odgovara položaju

pikova 2θ° na teorijskom difraktogramu deriviranom iz strukture , no isto tako uočava se i mala razlika u piku pri 15,5 2θ° gdje su kod **5b** vidljiva dva pika 2θ° u odnosu na **5a** gdje je prisutan samo 1 pik 2θ° (Slika 82).



Slika 82. Difraktogrami praha: i) **5b** dobivenog iz acetona i ii) teorijskog difraktograma deriviranog iz strukture **5a** dobivenog prekristalizacijom iz etilnog acetata.

Temeljem uočene razlike u izgledu pika pri 15,5 2θ° pristupilo se određivanju kristalne strukture rendgenskom difrakcijom na monokristalu pri niskoj temperaturi. Rješavanjem strukture **5b** i usporedbom s **5a** nisu uočene razlike u jediničnoj ćeliji kao ni u ostalim kristalografskim parametrima, a posljedično ni u pakiranju molekula **5b**. (Slika 83).



Slika 83. Pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji kristala **5a** u odnosu na **5b**.

Sagledavajući dobivene rezultate može se zaključiti da iako su uočena razlika u termalnim svojstvima **5b** nema uočenih razlika u kristalnoj strukturi kao ni u molekularnom pakiranju. No važno je istaknuti da je kristalizacija provedena iz acetona i određen je udio acetona u **5b** plinskom kromatografijom te je utvrđeno da je prisutno 3,02% acetona. U tom kontekstu sagledavajući NMR podatke, nije uočeno prisustvo acetona, no navedeno se može pripisati pragu detekcije NMR tehnike koja iznosi 1-4%.

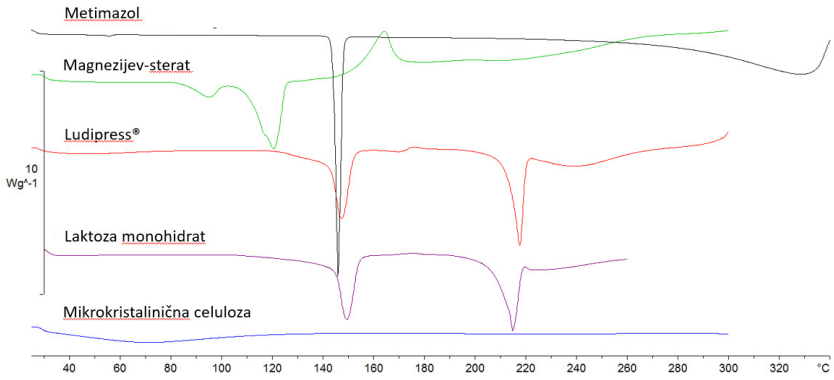
U zaključku na temelju dobivenih rezultata, a poglavito razlike u termalnim svojstvima možemo zaključiti da se radi o formi drukčijih svojstva. Strukturna analiza objedinjena NMR, XRPD tehnikom te rentgenskom strukturnom analizom nije ukazala na razlike podržavajući činjenicu da se potencijalno radi o izostrukturnoj formi. Štoviše u **5b** nađeno je 3,02% prisutnog acetona pri čemu je za pretpostaviti da može biti riječ o nestehiometrijskom solvatu gdje je aceton prisutan na površini kristala. Ne treba isključiti i ostale mogućnosti koji mogu biti uzrokom utvrđenih termalnih svojstva **5b** poput možebitne kemijske promjene uzrokovane acetonom poput npr. polimerizacije i sl. no na temelju provedenih studija to ne možemo sa sigurnošću potvrditi te su nužne daljnje studije kako bi se navedene promjene u termalnim svojstvima finalno determinirale i u potpunosti razlučile.

4.4. Stabilnost metimazola (1) u farmaceutskim formulacijama

4.4.1. DSC studija kompatibilnosti metimazola u smjesama

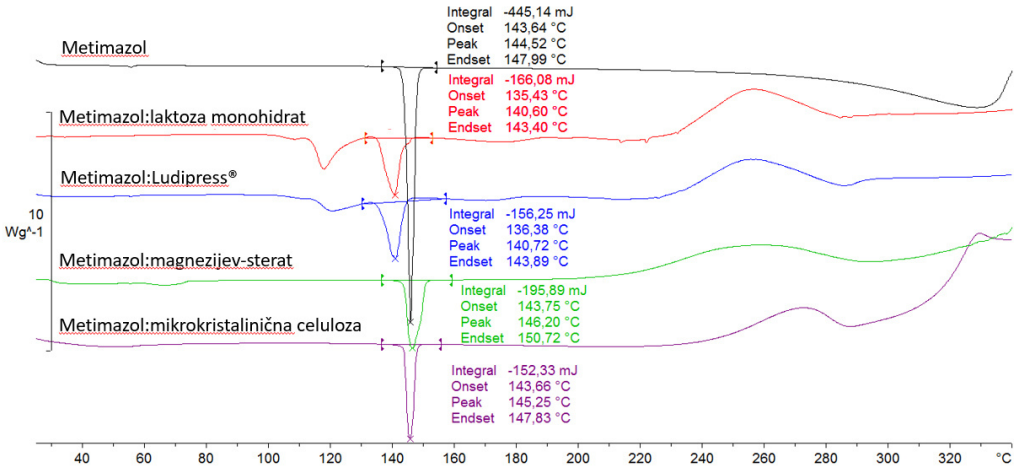
U cilju utvrđivanja možebitne fizičke i kemijske interakcije metimazola (**1**) i farmaceutskih pomoćnih tvari pristupilo se ispitivanju pripremljenih binarnih i ternarnih smjesa. Kao pomoćne tvari odabrani su zbog svoje uloge u formulaciji i tehnoloških svojstava u procesu proizvodnje, Ludipres® (predstavlja smjesu polivinilpirolidona i krospovidona), mikrokristalična celuloza i magnezijev stearat. U studiju je povrh toga dodatno uključena i laktoza monohidrat koja je odabrana iz razloga što se zbog svojih svojstava koristi kod vlažne granulacije. Binarne i ternarne smjese pripremljene su na način kako je opisano u eksperimentalnom djelu (Poglavlje 3.11). Termoanalitička tehnika poput DSC-a je korisna tehnika za ispitivanje međudjelovanja između djelatne i pomoćne tvari poglavito ako je riječ o klasičnim čvrstim farmaceutskim oblicima poput praška, tableta ili kapsula.[227] Prednost DSC-a je u nužnoj maloj količini uzorka, brzini mjerenja i brzom utvrđivanju potencijalnih interakcija.[228] Na slici 84. prikazani su pojedinačni termogrami metimazola i pomoćnih tvari te binarnih i ternarnih smjesa, a enodotermni pikovi metimazola su u svim termogramima jasno vidljivi. Ostale pomoćne tvari

poput magnezijevog-stearata, mikrokristalinične celuloze i laktoze monohidrat imaju karakteristične pikove koje su opisane u literaturi.[229]



Slika 84. Termogrami metimazola i odabranih pomoćnih tvari.

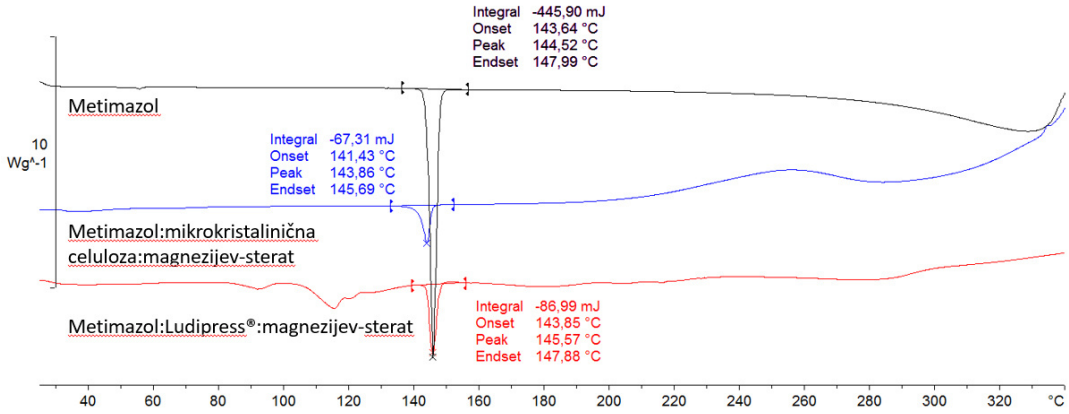
Slika 85 prikazuje smjesu metimazola i Ludipresa® u omjeru 1:1. Ludipress ima dva pika pri onset 142,27°C i 213,10°C (Slika 69). Dodatkom Ludipresa® dolazi do sniženja tališta smjese za 7,35°C, iako je pik metimazola u smjesi jasno vidljiv. Također vidljivo je da dolazi do sniženja vrijednosti ΔH smjese u odnosu na čisti metimazol. Jednaki trend smanjenja tališta smjese uočen je kod binarne smjese metimazol:laktoza s razlikom od 8,2°C (Slika 85) i kod ternarne smjese metimazol:magnezijev stearat:mikrokristalinična celuloza s razlikom u talištu od 2,2°C (Slika 86).



Slika 85. Termogrami ispitanih binarnih smjesa.

Ako promotrimo binarne smjese metimazola:mikokristalinične celuloze zatim metimazol:magnezijev stearat i u konačnici ternarnu smjesu metimazol:magnezijev-

stearata:Ludipres®, možemo zaključiti da su tališta smjesa u potpunosti u skladu s talištem metimazola što ukazuje na malu vjerojatnost interakcije između sastavnica. Uočeni pomak u talištu metimazola kod binarnih i ternarnih smjesa upućuje na fizičku interakciju metimazola i pomoćnih tvari ili na formiranje onečišćenja ili pak djelomičnu nemješljivost.[230,231,228]



Slika 86. Termogrami ispitanih ternarnih smjesa

U zaključku iako su primjenom DSC tehnike uočene potencijalna međudjelovanja, pripremljene formulacije podvrgnute su stabilitetnoj studiji kako je i navedeno u tablici 19 (Poglavlje 3.11) u trajanju od 12 mjeseci, kako bi se utvrdila kemijska stabilnost binarnih i ternarnih smjesa.

4.4.2. Stabilitetna studija metimazola u smjesama

Prvo je promotrena binarna smjesa metimazol:Ludipres® obzirom da na utvrđenu interakciju koja je utvrđena u DSC studiji. Nakon 12 mjeseci praćenja smjese pri uvjetima normalnog 20°C/60%RV i ubrzanog praćenja 40°C/75%RH te pri sniženom udjelu vlage 40°C/25%RH, sadržaj je na svim uvjetima bio u rasponu od 99,9 % do 100,0 %, a uočena onečišćenja **21** i **22** kretala su u rasponu od 0,01 % do 0,02 % (Poglavlje 3.11. Tablica 20). Neznatna promjena sadržaja metimazola i niska razgradnja uvjerljivo potvrđuju stabilnost smjese metimazol:Ludipres®. U kontrolnom uzorku metimazola nije uočeno prisustvo onečišćenja **21** i **22** pri svim ispitanim uvjetima tijekom 12 mjeseci praćenja.

Za smjesu metimazol:magnezijev sterat i metimazol:laktoza monohidrat nije utvrđeno međudjelovanje u DSC studiji, a isti rezultat potvrđuje i stabilitetna studija. Pri svim ispitivanim

uvjetima (Poglavlje 3.11. Tablica 21, 22) nije uočeno stvaranje onečišćenja **21** i **22**, što ukazuje na visoku stabilnost promatranih smjesa.

Jednaki zaključak može se izvesti i za smjesu metimazol:Ludipres® i magnezijev stearat (Poglavlje 3.11. Tablica 23) gdje je nakon 12 mjeseci uočena zanemariva koncentracija onečišćenja **22**.

Promatrajući smjesu smjesu metimazol:mikokristalinična celuloza tijekom 12 mjeseci stabilitetnog ispitivanja, a vidljivo je da dolazi do porasta onečišćenja **22** tijekom vremena (0,1%) poglavito pri uvjetu gdje su sastavnice izložene povećanom udjelu vlage i prisustva zraka (25°C/65%RV) (Poglavlje 3.11. Tablica 24). Više vrijednosti onečišćenja **22** od 0,2% su nađene i pri žešćim uvjetima stabilnosti, tj pri povišenoj temperaturi ili pak kombinaciji povišene temperature i vlažnosti (45°C/75%RV) i odsustva/prisustva zraka. S tim u svezi poznato je da mikrokristalinčna celuloza može sadržavati hidroksialkilne radikale formirane hidrolizom 1,4-glikozidne veze uz uklanjanje vodika.[232] Slična studija pokazala je da hidroksi alkilni radikali u prisustvu kisika mogu reagirati s hidroperoksidnim radikalima (•OOH) pri čemu dolazi do stvaranja vodikovog peroksida.[233,234] Štoviše, slični rezultati s mikrokristaliničnom celulozom uočeni su u studiji u kojoj je studirana na zrak osjetljiva djelatna tvar CP-448,187.[235]

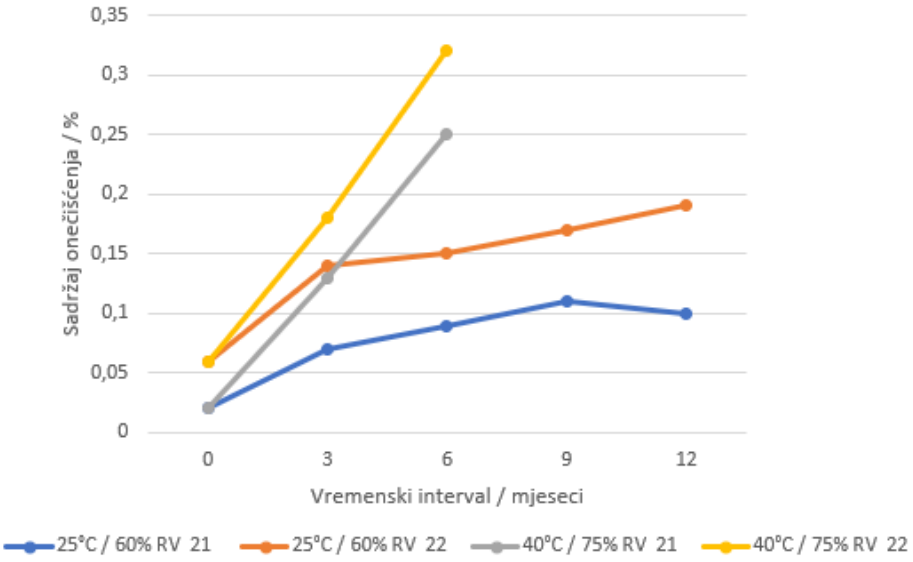
Promatrajući smjesu metimazol:mikrokristalinična celuloza:magnezijev stearat, može se uočiti porast onečišćenja **21** i **22** nakon 12 mjeseci na svim uvjetima (Poglavlje 3.11. Tablica 25). Razlog porastu onečišćenja je evidentno prisustvo mikrokristalinične celuloze i već prije obrazloženog utjecaja prisutnih slobodnih radikala u pomoćnoj tvari.

U zaključku može se primijetiti da razina onečišćenja u binarnim i ternarnim smjesama nije značajna obzirom na put primjene i dnevnu dozu unosa uzimajući u obzir da granica za onečišćenja **21** i **22** iznosi maksimalno 0,5 %.

4.4.3. Stabilitetna studija prototipa ciljne formulacije

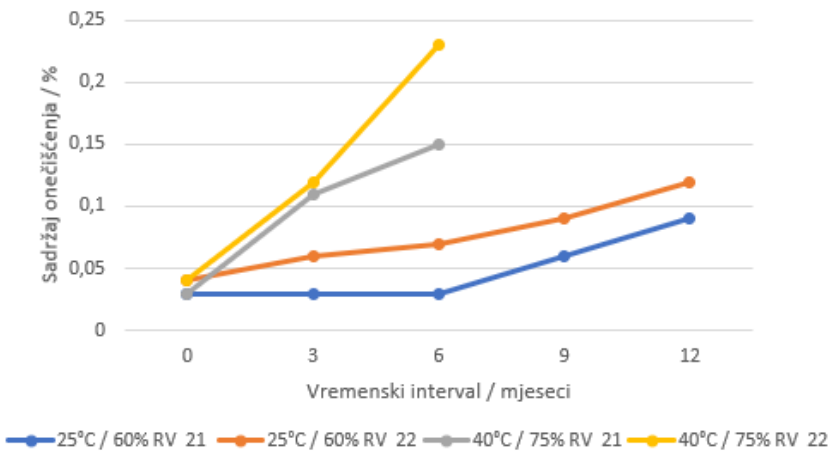
Temeljem provedene studije na binarnim i ternarnim smjesama pripremljena je kvarterna smjesa (šarža E-123) koja predstavlja prototip formulacije, a sadrži djelatnu tvar metimazol, Ludipress®, magnezijev-stearat i mikrokristaliničnu celulozu. Uzimajući u obzir proizvodne i tehničke mogućnosti za proces priprave čvrste oralne forme odabran je postupak direktnog komprimiranja. Upravo iz tog razloga laktoza monohidrat nije uključena u formulacijski

prototip iako je u smjesi metimazola i laktoze monohidrata uočena niska razina onečišćenja, a dodatno jer se više primjenjuje kod postupaka vlažne granulacije. U kvarternoj smjesi također je stavljen fokus na onečišćenja **20** i **21** obzirom na njihovo već prije utvrđeno prisustvo i porast. Izrađena su tri kontrolna broja prototipa formulacije u formi tableta (Poglavlje 3.11), a zatim su izloženi uvjetu 25°C/60%RV kroz 12 mjeseci i 40°C/75%RV u trajanju od 6 mjeseci. Prema slikama 87, 88 i 89 vidljivo je da već u vremenskom intervalu 0 mjeseci ima prisutnih onečišćenja **21** i **22**, što upućuje na to da reakcija razgradnje započinje već tijekom procesa oblikovanja.



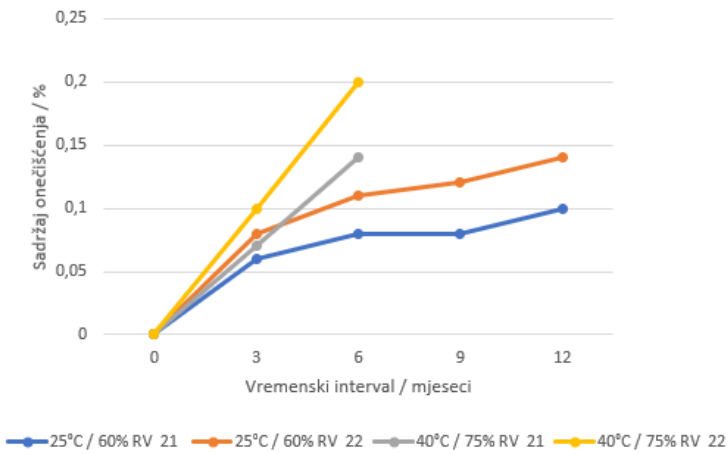
Slika 87. Onečišćenja **21** i **22** nakon 12 mjeseci na 25°C/60%RV i 6 mjeseci na 40°C/75%RV za šaržu F-123.

Iako su uočene vrijednosti niske i kreću se u rasponu od 0,0 % do 0,06 % važno je istaknuti da je analiza provedena do nakon 20 dana od pripreme što sugerira da je postupak razgradnje iniciran u kratkom vremenskom odmaku od pripreme te da je riječ o već prisutnim specijama, što nije bio slučaj kod uzoraka binarnih i ternarnih smjesa gdje se po pripremi provodila i analiza. Kod sve tri serije uočen je porast onečišćenja pri oba uvjeta. Pri uvjetu 25°C/60%RV rezultati za onečišćenje **21** raste u sve tri ispitivane serije dok je najveća vrijednost od 0,10 % nađena kod šarže F-123 (Slika 87) i H-123 (Slika 89). Pored toga onečišćenje **22** je također prisutno na istom uvjetu i u sva tri kontrolna broja i njegove su vrijednosti više u odnosu na onečišćenje **21**, a najveća vrijednost od 0,15 % zamjećena je nakon 12 mjeseci u uzorku G-123 (Slika 88).



Slika 88. Onečišćenja **21** i **22** nakon 12 mjeseci na 25°C/60%RV I 6 mjeseci na 40°C/75%RV za šaržu G-123.

Sukladno očekivanjima pri žešćim uvjetima temperature i vlage tj. pri uvjetu 40°C/75%RV vrijednosti onečišćenja su još i više, a nakon 6 mjeseci kreću se od 0,14 % do 0,25 % za onečišćenje **21** i od 0,20 % do 0,32 % za onečišćenje **22**. Imajući na umu dobivene rezultati na binarnim i ternarnim smjesama. Razlog uočenim višim rezultatima za **21** i **22** kod kvartnerne smjese, u odnosu na binarne i ternarne smjese je u ugrađenom Ludipresu® koji sadrži povidon i krosopovidon.[236] Povidon i krospovidon mogu sadržavati male količine vodikovog peroksida koji se koristi kao incijator u procesu radikalske polimerizacije[237] ili čak i određenu količinu peroksidnih i hidroperoksidnih vrsta[238] zaostalih iz pocesa proizvodnje. Iako je povidon, krospovidon i u konačnici Ludipress® često korištena pomoćna tvar nedavno je utvrđena njegova uloga u oksidacijskoj razgradnji raloxifen-hidroklorida.[239]



Slika 89. Onečišćenja **21** i **22** nakon 12 mjeseci na 25°C/60%RV i 6 mjeseci na 40°C/75%RV za šaržu H-123.

Na kraju možemo zaključiti da je združeni utjecaj mikrokristalinične celuloze i Ludipresa® povećava postotak onečišćenja u prototipu formulacije no važno je istaknuti da su i nakon 12 mjeseci praćenja vrijednosti unutar definiranih granica.

4.4.4. Studija prisilne razgradnje

S ciljem dobivanja detaljnijeg uvida u čimbenike koji utječu na formiranje onečišćenja **20** i **21** provedena je studija prisilne razgradnje na kvarternoj smjesi kontrolni broj E-123. U kontekstu studije uzorak je izložen djelovanju topline, UV-VIS zračenju, kiseloj i baznoj okolini te oksidaciji, a promjene su promatrane u odnosu na kontrolni netretirani uzorak u kojem su prisutna onečišćenja **21** i **22** (Poglavlje 3.12).

U uzorku izloženom povišenoj temperaturi (Poglavlje 3.12. Tablica 27) uočen je porast onečišćenja **22**, no došlo je i značajnog porasta onečišćenja **22** u odnosu na kontrolni uzorak.

Utjecaj UV-VIS zračenja značajno je povećao koncentracije i oba onečišćenja i to za onečišćenje **21** s 0,08 % na 2,17%, a za onečišćenje **22** s 0,11 % na 1,86 %. U kiselom i baznom mediju nisu uočene značajnije promjena oba promatrana onečišćenja u odnosu na kontrolni uzorak. U uzorku tretiranom vodikovim peroksidom uočen je porast samo onečišćenja **21** i to s 0,08 % na 0,19 %.

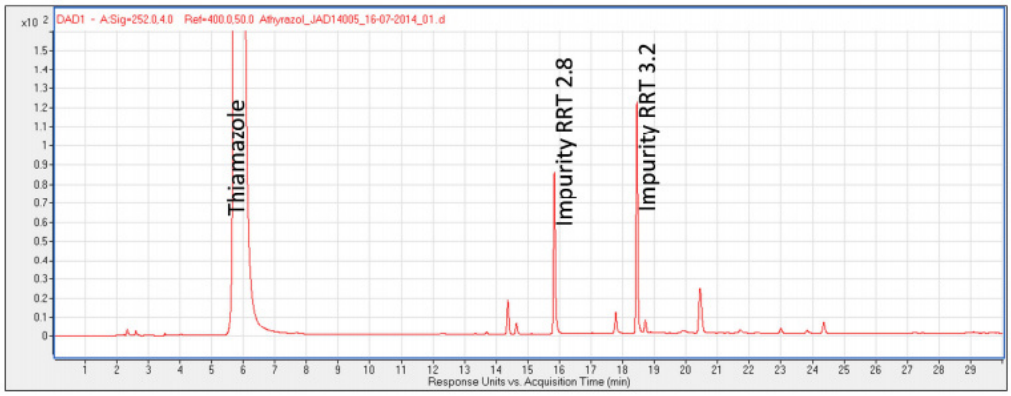
4.4.5. Stabilnost metimazola u otopini fotoinicijatora

Utvrđeni utjecaj mikrokristalinične celuloze i Ludipresa® u ispitanim smjesama na razgradnju metimazola (**1**) i porast onečišćenja **21** i **22** kao i podaci o utjecaju UV-VIS zračenja i temperature u studiji prisilne razgradnje usmjerio nas je da detaljnije proučimo potencijalni utjecaj radikalskog puta razgradnje u studiji bez utjecaja pomoćnih tvari. Kako bi se provjerio utjecaj radikalima inducirane razgradnje korišten je inicijator 2,2´azobis-2-metilpropanonitril (AIBN), dodan u otopinu metimazola u acetonitrilu, a otopine su pripremljene i izložene uvjetima kako je opisano u eksperimentalnom djelu (Poglavlje 3.13). Vrijeme izlaganja otopine iznosilo je 48 sati iz razloga što AIBN-u vrijeme poluživota opada s povišenom temperaturom.[240] U pokusu 1 (Poglavlje 3.13. Tablica 28) metimazol i AIBN izloženi su dušikovoj atmosferi pri povišenoj temperaturi (50°C/75%RV) te je uočena niska koncentracija onečišćenja **21** dok onečišćenje **20** nije bilo prisutno. U kontrolnoj otopini (Poglavlje 3.13. Tablica 28 Pokus 2) nisu detektirana onečišćenja. Iste sastavnice izložene su jednakom temperaturnom stresu uz prisustvo zraka, no ovdje je uočeno samo onečišćenje **22** u također u niskoj koncentraciji od 0,01%, a u kontrolnoj otopini (Poglavlje 3.13. Tablica 28. Pokus 4) očekivano nisu nađena tražena onečišćenja. Također promotrilo se i utjecaj fotolitičke inicijacije AIBN-a djelovanjem UV zraka. Pri ovom su pokusu (Poglavlje 3.13. Tablica 28. Pokus 5) i to pri temperaturi 25°C/60%RV uočena oba onečišćenja i to u blago višim vrijednostima u odnosu na pokuse gdje je termolitički inducirana aktivacija AIBN-a i to je za onečišćenje **21** nađeni udio od 0,02 %, dok je onečišćenje **22** bilo prisutno u postotku od 0,03 %. Blago više vrijednosti uočene su pri višoj temperaturi (Poglavlje 3.13. Tablica 28. Pokus 6). U kontrolnim otopinama nađeno je onečišćenje **22** no u vrlo niskoj koncentraciji i to ispod limita detekcije.

4.4.6 Identifikacija detektiranih onečišćenja metimazola

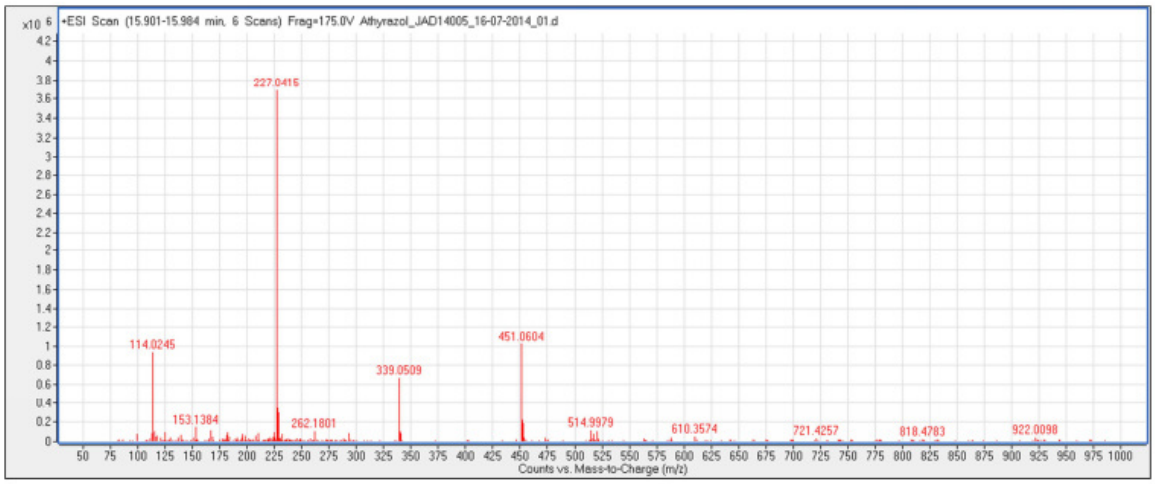
U kontekstu svih dobivenih podataka i u cilju utvrđivanja kakvoće finalnog prototipa gotovog proizvoda nametnula se kao potreba provedbe identifikacije onečišćenja **21** i **22**. Promatrajući podatke o vremenu elucije metimazola (**1**) u odnosu na spojeve **21** (RRT 2,8) i **22** (RRT 3,2) može se zaključiti da je riječ o srodnim, manje polarnijim molekulama. S tim u svezi pristupilo se identifikaciji onečišćenja **21** i **22** primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenom spektrometrijom. Za analizu je korištena kvarterna smjesa šarže F-123, a

dobiveni kromatogram prikazan je na slici 90, pri čemu je vidljivo da najveći postotak sadržaja onečišćenja dolazi upravo od promatranih onečišćenja.



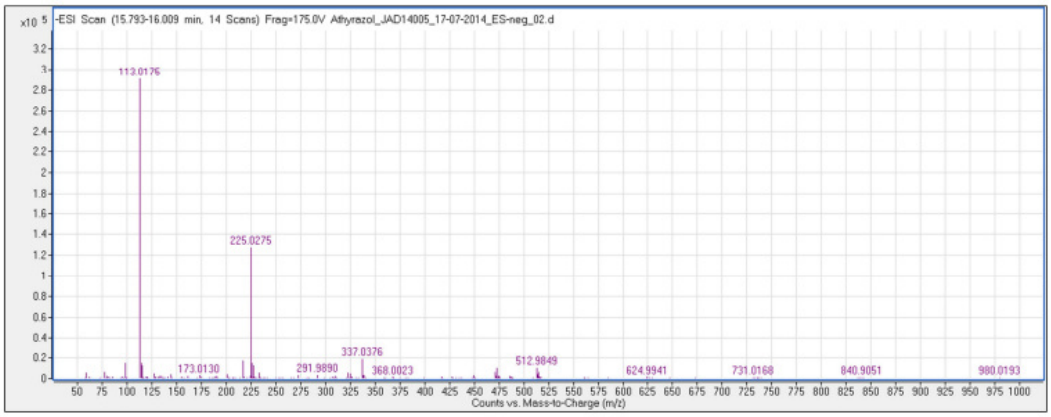
Slika 90. Kromatogram uzorka kvarterne smjese šarže F-123 snimljen pri 254 nm.

Snimanjem MS/MS spektara utvrđeno je da onečišćenju **21** odgovara signal pri m/z 227,0416 (Slika 91). Tijekom analize uočen je i fragment pri m/z 114.0245 koji upućuje na činjenicu da se molekula fragmentira na izvorni **1**. Na masenom spektru uočeni su dodatno pikovi pri m/z 339,0509 i m/z 451,0604, a međusobna razlika između 329,0509 i 451,0604 iznosi 112 Da, što upućuje na dodatno formiranje trimerne ili tetramerne specije. Dodatno, analizom HRMS spektra određena je molekulska formula onečišćenja **20** koja odgovara $C_8H_{10}N_4S_2$. Dobiveni podatak o molekulskoj formuli uz maseni spektar upućuje da je riječ o dimernoj molekuli.



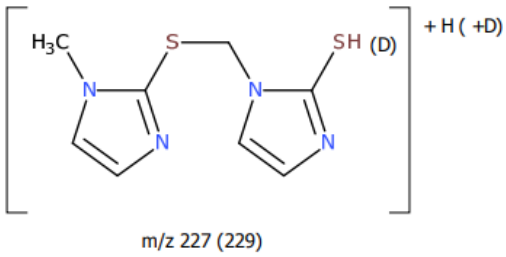
Slika 91. Maseni spektar onečišćenja **21** snimljen u pozitivnom modu ESI (+).

Također signal pri m/z 225,0275 koji odgovara onečišćenju **20** uočen je i pri snimanju u negativnom modu ESI(-) (Slika 92). Kako bi se dobilo više podataka o građi dimerne molekule proveden je test izmjene protona korištenje deuterija (H/D pokus), pri čemu se detektira signal pri m/z 229 čime se potvrđuje da molekula ima jedan izmjenjivi proton.



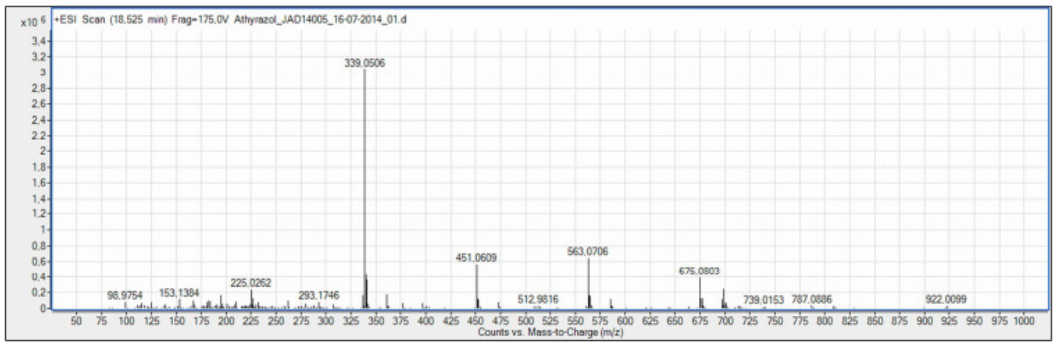
Slika 92. Maseni spektar onečišćenja **21** snimljen u negativnom modu ESI(-).

Temeljem dobivenih podataka može se predložiti struktura dimera (Slika 93) koja odgovara onečišćenju **21**, naziva 1-[metil-(2,3-dihidro-1*H*-imidazol)-2-metilsulfanil]-1*H*-imidazol-2-tiol.



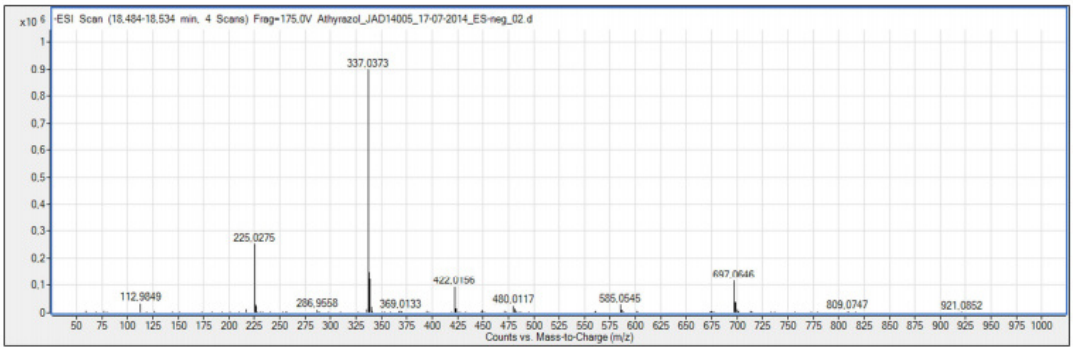
Slika 93. Predložena struktura onečišćenja **21**. Podatak u zagradi odgovara deuteriranom ionu.

Drugo promatrano onečišćenje **22** odgovara signalu pri m/z 339,0506 (Slika 94). HRMS podatak ukazuje da m/z 339,0506 signal odgovara spoju molekulske formule $C_{12}H_{14}N_6S_3$, što upućuje da je riječ o trimeru. Kao i kod masenog spektra dimera i ovdje utvrđeno je postojanje vrsti u masenom spektru koji odgovaraju tetrameru (m/z 451,0609), pentameru (m/z 563,0706) i heksameru (675,0803) s međusobnom razlikom od 112 Da. Proveden je i H/D test te je kao i kod dimera utvrđeno da je molekula ima jedan izmjenjivi proton.



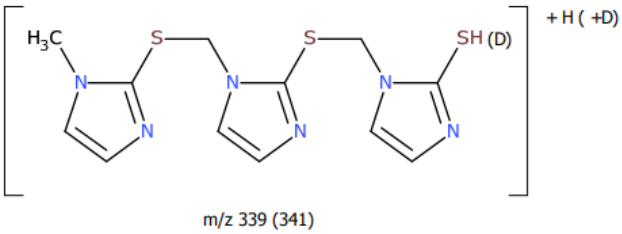
Slika 94. Maseni spektar onečišćenja **22** snimljen u pozitivnom modu ESI (+).

Snimanjem u negativnom modu dobiven je signal pri m/z 337,0373 (Slika 95).



Slika 95. Maseni spektar onečišćenja **22** snimljen u negativnom modu ESI (-).

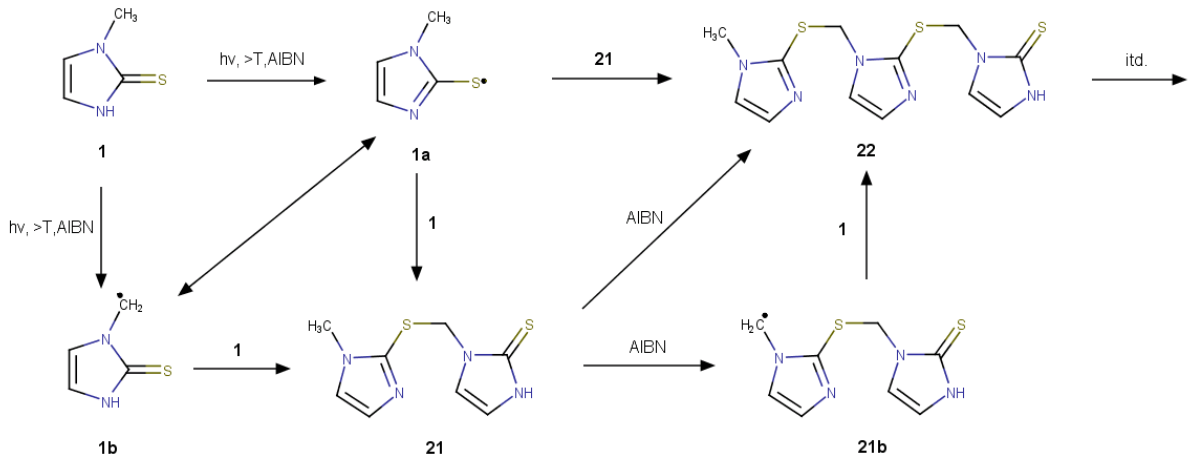
Na kraju temeljem snimljenog masenog spektra, masene formule i provedenog H/D pokusa rezultati ukazuju da je riječ o trimernoj molekuli **22** naziva 1-{2-[2-metil-(2,3-dihidro-1*H*-imidazol)-1-metilsulfanil)-1*H*-imidazol-1-metilsufanil]-1*H*-imidazol-2-tiol koja je prikazana na slici 96.



Slika 96. Predložena struktura trimera **22**. Podatak u zagradi odgovara deuteriranom ionu.

U zaključku, rezultati sugeriraju da onečišćenje **21** odgovara dimeru dok onečišćenje **22** odgovara trimeru. Sumarni podaci o eksperimentalno utvrđenim i izračunatim masama nalaze su dobro usklađeni između eksperimentalnih i računski dobivenih podataka (Poglavlje 3.10. Tablica 18). Nažalost, pokušaji priprave veće količine onečišćenja i izolacije koji bi bili zadovoljavajući za analizu primjenom NMR-a i drugih tehnika s ciljem potvrde strukture nisu bili uspješni.

Iako su količine onečišćenja **21** i **22** nedovoljne za finalnu potvrdu strukture, podaci o predloženim strukturama dobiveni LC-MS i HRMS studijom uz rezultate studije stabilnosti **1** u prisustvu pomoćnih tvari, daju nam okvir na temelju kojih možemo postaviti i kemizam formiranja **21** i **22** (Shema 24) i dodatno postaviti hipotezu o potencijalnom putu razgradnje **1**.



Shema 24. Kemizam formiranja **21** i **22** iz **1**.

Poglavito je za tiole poznato da su prekursori tiilnih radikala, a u prilog tome ide slaba energija disocijacije S-H veze od 365 kJ/mol.[241] Tiilni radikali mogu nastati a) homolitičkim putem primjenom radikalskih inicijatora, zatim b) redoks procesom primjerice korištenjem metala poput manganovih soli[242] ili c) radiolizom ili fotolizom djelovanjem ultraljubičastog (UV) zračenja.[243] U reakciji **1** s izvorom slobodnih radikala primjerice AIBN-om ili reziduom radikala prisutnih u pomoćnim tvarima uz povišenu temperaturu može doći do termolitičkog formiranja tiilnog radikala i/ili pak ako se dodatno djeluje UV zračenjem tada nastaje i fotolitički (Shema 24). Jednom formirani tiilni radikal (**1a**) procesom disproporcioniranja daje (**1b**). Nakon formiranog inicijalnog radikala **1b** slijedi pak reakcija s inicijalnim spojem **1**. Najizgledniji nastavak radikalskog puta je zatim reakcija **21** s fotoinicijatorom pri čemu se

dobiva **22**. Pored toga formirani **1a** može napasti dimer 21 pri čemu pruža alternativni put za dobivanje **22**. Na kraju valja istaknuti da reakcija radikalskim putem može ići i u smjeru dobivanja daljnjih produkata, no isti nisu uočeni tijekom naše studije.

Na kraju, ako promotrimo navedeni sintetski put dobivanja **21** i **22** alternativno, reakcija može ići u smjeru napada tiilnog radikala dobivenog iz **1** na dvostruku vezu imidazolnog prstena, što bi sugeriralo da se reakcija odvija preko tia-Michelove adicije,[244] no takvi produkti nisu detektirani tijekom studije. U svezi s predloženim reakcijskim putem valja napomenuti da su na ovom polju nužne daljnje studije koje uključuje, preparativne, spektroskopske i računalne metode kako bi se predložena onečišćenja finalno determinirala i potvrdio predloženi put njihovog nastanka.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije studirani su metimazolu (**1**) slični strukturni analozi koji se smatraju njegovim srodnim supstancija te su utvrđena njihova fizikalno-kemijskih svojstava, a koja daje detaljan uvid u njihovu, ali i reaktivnost metimazola. Dodatno, u skladu s aktualnim trendovima u farmaceutici poglavito Kvalitete vođene dizajnom (engl. QbD) s naglaskom na detaljno poznavanje onečišćenja, svojstva studiranih analoga su utvrđena novim moćnim analitičkim tehnikama te su snažan poticaj boljem poznavanju kemije metimazola i njegovih srodnih tvari. U tom kontekstu zaključci dobiveni tijekom disertacije navede se kako slijede:

- Metimazol je sveobuhvatno karakteriziran kao farmaceutska djelatna tvar, primjenom trenutno dostupnih analitičkih tehnika poput nuklearne magnetske rezonancije (NMR), termalnih tehnika i rentgenske strukturne analize, a dodatno je sa stajališta njegovih biofarmaceutskih svojstva određena do sada nepoznata njegova BCS klasa te su u tom kontekstu nadopunjeni trenutno dostupni literaturni podaci.
- Ispitana je i utvrđena stabilnost metimazola u sveprisutno korištenih halogenim otapalima (diklormetanu i dikloretanu), a dobiveni premošteni bis metilenski (1,1-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]metan dihidroklorid, **2b**) i bis etilenski derivat (1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan dihidroklorid tetrahidrat, **3b**) i njihove čvrste forme, diklormetanski solvat (**2a**), dihidrat (**3c**) i bezvodna forma (**3a**) potpuno su karakterizirani primjenom spektroskopskih i termalnih tehnika, a struktura im je potvrđena rentgenskom strukturnom analizom na jediničnom kristalu.
- U cilju dobivanja uvida u čvrsto stanje etilenskih derivata **3a** i **3c** proučena je njihova transformacija u čvrstom stanju te je utvrđeno da dehidracija iz dihidata **3c** u bezvodnu formu **3a** pri sniženom i atmosferskom tlaku ide direktno, a ne preko hemihidratne forme.
- Utvrđen je kemizama stvaranja premoštenog bis etilenskog derivata **3a** primjenom sintetskih, spektroskopskih, termalnih, difrakcijskih i računalnih istraživanja. U tom su kontekstu priređeni međuprodukti kloretil spoj (2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol, **6**) te imidazolijum klorid (7-metil-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazol[2,1-*b*]tiazol-4-ijum klorid, **7a**) i njegova tetrafluroboratna sol (**7a**) kao novi trenutno nepoznati i stabilni izomeri tiiranijevog međuprodukta **8**.
- Ujedno je utvrđeno da **3a** nastaje direktno nukleofilnom substitucijom primarno stvorenog međuprodukta klor etil derivata, **6** s metimazolom.

- U reakciji **6** sa srebrnim tetrafluoroboratom dobiven je novi srebrni kompleks (bis-{2-[(kloretil)tio]-1-metil-1*H*-imidazol}-srebro(I)tetrafluoroborat, **10**) čija je struktura potvrđena rentgenskom strukturnom analizom.
- Dodatno, ispitana je reaktivnost kloretilnog spoja **6** u prisustvu drugih nukleofila te je pretpostavljeno da **6** može sudjelovati u supstitucijskom i eliminacijskom putu reakcija.
- Kroz metilacijske studije proučena je reaktivnost onečišćenja C (1-metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol, **4a**) kao procesnog onečišćenja te njegove hidrojodine soli **4b,** zatim 1-metil-(2-metiltio)-1*H*-imidazol hidrojodida (**18**) i 1,3-dimetilimidazol-2-tiona (**19**) te je dobiven uvid u njihova fizička i kemijska svojstva poglavito u kontekstu potencijalne demetilacije, a pri čemu je utvrđena značajna stabilnost soli **4b**
- Oksidacijom **1** dobiven je metimazol disufid (2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol), **5a**), oksidacijsko onečišćenje i metabolit **1** u žutoj formi, čija je struktura tada bila nepoznata i potvrđena rendgenskom strukturnom analizom. Ona je objavljena na Ružičkinim danima.
- Ispitana je pH stabilnosti kroz pH područja te je utvrđeno da je izrazito stabilan u kiselom području (pH 1,2) dok je nestabilan u neutralnom (pH 7), a pak izrazito nestabilan u baznom mediju (pH 9) dok razgradnja prati kinetiku prvoga reda.
- Tijekom kristalizacijskih studija **5a** nije dobivena prije u literaturi navedena bezbojna forma, no studijama je uočena nova, ali ne i finalno determinirana čvrsta forma **5b**. koja sadrži 3,02% acetona.
- Studijom oksidacije **5a** potvrđena je desulfurizacija pri čemu je izoliran i karakteriziran **20** kao derivat onečišćenja B i srodna tvar **1** u formi ionske tekućine pri čemu je zaključeno da je je njegovo prisustvo u mogućim finalnim formulacijama malo izgledno.
- Polimorfnim probirom u različitim polarnim protičnim i aprotičnim otapalima primjenjujući različite tehnike kristalizacije poput kristalizacije pri sobnoj i povišenoj temperaturi, uparavanjem, spontanom difuzijom kontraotapala i karakterizacijom dobivenih kristala prema morfologiji te termalnim i XRPD metodama bilo je naznaka o postojanju novih kristalnih formi **1**, ali prema njihovoj rentgenskoj analizi na monokristalu, njihovo postojanje je isključeno.
- Ispitana je stabilnost metimazola u čvrstom stanju i to u smjesama s opće korištenim farmaceutskim pomoćnim tvarima, pri čemu je utvrđena njegova visoka stabilnost. Izuzetak je primjena mikrokristalinčne celuloze i fotoinicijatora, pri čemu su, primjenom masene spektrometrije visoke razlučivosti identificirana dva razgradna

produkta, dimer i trimer metimazola, tj. 1-[metil-(2,3-dihidro-1*H*-imidazol)-2-metilsulfanil]-1*H*-imidazol-2-tiol (**21**) i 1-{2-[2-metil-(2,3-dihidro-1*H*-imidazol)-1-metilsulfanil)-1*H*-imidazol-1-metilsufanil]-1*H*-imidazol-2-tiol (**22**) i predložen radikalski put njihova nastanka preko tiilnog radikala.

- Stvorena zbirka uzoraka metimazolu strukturno sličnih analoga i njihovih karakteristika, koji predstavljaju podlogu za daljnji studij molekularnog modeliranja i možebitnih daljnjih farmakoloških i/ili toksikoloških studija metimazola i njegovih formulacija.
- Ovom disertacijom postignuta je viša razina znanstvene kompetentnosti doktorskog kandidata.
- U sklopu ove disertacije ostvarena je i uspješna među institucijska suradnja.

6. LITERATURNA VRELA

1. Y. Hassan, A. Aboul-Enein, A. Al-Badr, Analytical Profile of Methimazole. In: K. Florey (Eds), Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 8, Academic Press, New York, 1979, pp 351-370.

2. A. Akmal, J. Kung, Propylthiouracil, and Methimazole, and Carbimazole-related Hepatotoxicity, *Expert. Opin. Drug. Saf.,* **13**(10) (2014) 1397-1406.

3. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, D. Filić, M. Dumić, Synthesis, Crystal Structure and Solid State Transformation of 1,2-Bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane, *Crystals*, **10** (2020) 667.

4. L. Štefan, A. Čikoš, R. Vianello, I. Đilović, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, The Rolle of 7-Methyl-2*H*,3*H*,7*H*-imidazo[2,1-*b*]thiazol-4-ium chloride in the synthesis of 1,2-Bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane, *Molecules,* **26** (2021), in preparation.

5. B. Mošnja, Učestalost bolesti štitnjače kod medicinskih sestara/tehničara, *Glas. Pul. Boln.,* **13** (2017) 29-41.

6. P. Keros, I. Andreis, M. Gamulin, Anatomija i fiziologija, Školska knjiga, Zagreb, 2000, pp. 92-93.

7. N. Carrasco, Iodide transport in the thyroid gland, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1154** (1993) 65-82.

8. D. S. Cooper, Antithyroid Drugs, *N. Engl. J. Med.*, **352** (2005) 905-917.

9. J. W. Little, Thyroid Disorders. Part I: Hyperthyroidism, *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.*, **101** (2006) 276-284.

10. A. P. Weetman, Graves' disease. *N Engl J Med.*, **343**(17) (2000) 1236-1248.

11. H. B. Burch, D. S. Cooper, Antithyroid drug therapy: 70 years later, *Eur. J. Endocrinol.*, **179** (2018) 261–274.

12. E. B. Astwood, W. P. Vanderlaan, Thiouracil derivatives of greater activity for the treatment of hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **5** (1945) 424–430.

13. M. M. Stanley, E. B. Astwood, 1-Methyl-2-mercaptoimidazole; an antithyroid compound highly active in man. *Endocrinology*, **44** (1949) 588.

14. D. Doniach, Treatment of thyrotoxicosis with neo mercazole (2-carbethoxythio-1-methylglyoxaline); report of 120 cases. *Lancet*, **1** (1953) 873–879.

15. B. Solomon, D. Glinoer, R. Lagasse, L. Wartofsky, Current trends in the management of Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70** (1990) 1518–1524.

16. B. Emiliano, L. Governale, M. Parks, D. S. Cooper, *Clin. Endocrinol. Metab.,* 95 (5) (2010) 2227–2233.

17. L. Governale, The Role of Propylthiouracil in the Management of Graves' Disease in Adults: Frequency of PTU and Methimazole Use – Outpatient Prescription Utilization Data, FDA, 2009.

18. Anti-Thyroid Drugs Global Market Report 2020, Business Research Company, 2019.

19. S. D. Leo, L. Y. Sun, L. E. Braverman, Hyperthyroidism, *Lancet*, **388** (10047) (2016) 906-918.

20. D. Cvijanović, V. Damjanović, I. Picek, B. Foretić, Spectroscopic studies of methimazole reactivity toward the aquapentacyanoferrate (II) ion in aqueous solutions, *Spectrosc. Int. J.*, **27** (5-6) (2012) 509-514.

21. Preuzeto iz Spectral Databases for Organic Compounds SDBS http://sdbs.riodb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi datuma 10.8.2015.

22. E. S. Raper, J. R. Creighton, R. E. Oughtred, I. W. Nowell, 1-Methyl-4-imidazoline-2-thione: Structure, Comparison with Related Molecules and a Discussion of Coordination Characteristics, *Acta. Cryst*., **B39** (1983) 355-360.

23. G. Vampa, S. Benvenuti, F. Severi, L. Malmusi, L. Antolini, The methylation, oxidation and crystallographic characterization of imidazole derivatives, *J. Heterocycl. Chem.* **32** (1995) 227–234.

24. G. R. Form, E.S. Raper, T. C. Downie, The crystal and molecular structure of 2-mercaptobenzimidazole, *Acta Cryst*., **B32** (1976) 345-348.

25. Cambridge Structual Database, http://www.ccdc.cam.ac.uk/pages/Home.aspx, datum pretrage 22.02.2013.

26. G. R. Desiraju, On the presence of multiple molecules in the crystal asymmetric unit (Z′> 1), *Cryst. Eng. Comm*., **9**(2007) 91.

27. C. Laurence, M. J. Ghomari, J. Y. Questel, M. Berthelot, R. Mokhlisse, Structure and molecular interactions of anti-thyroid drugs. Part 3.1 Methimazole: a diiodine sponge, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*., **2** (1998) 1545-1552.

28. O. A. Lodochnikova, A. V. Bodrov, A. F. Saifina, L. E. Nikitina, I. A. Litvinov, A new polymorph of methimazole: Single crystal and powder X-ray diffraction study, *J. Struct. Chem*., **54** (2013) 140-147.

29. W. Marckwald, Ein Beitrag zur Kenntniss der Imidazole und der Constitution des Glyoxalins, *Ber. Dtsch. Chem. Ges*., **25** (1892) 2359.

30. B. V. Trzhtsinskaya, N. D. Abramova, Imidazole-2-thiones: Synthesis, structure, properties, *Sulfur Reports* **10**(4) (1991) 389-421.

31. H. Roohi, A. Ebrahimi, S.M. Habibi, Quantum mechanical study of tautomerism of methimazole and the stability of methimazole–I2 complexes, *J. Mol. Struct*., **710** (2004) 77–84.

32. N. Biswas, S. Thomas, A. Sarkar, T. Mukherjee, S. Kapoor, Probing the adsorption mechanism in thiamazole bound to the silver surface with Surface-enhanced Raman Scattering and DFT, *Chem. Phys. Let.* **479** (4-6) (2009) 248-254.

33. M. Garner, D R. Armstrong, J. Reglinski, W. E. Smith, R. Wilson, J. H. McKillop, The structure of methimazole and its consequences for current therapeutic models of graves' disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **4**(11) (1994) 1357-1360.

34. R. S. Balestrero, D. M. Forkey, J. G. Russel, 15N NMR: Iminothiol-thioamide tautomerism of 2-mercaptobenzazoles and 1-methyl-2-mercaptoimidazole, *Mag. Res. Chem*., **24**(8) (1986) 651-655.

35. M. Garner, J. Reglinski, I. Cassidy, M. D. Spicer, A. R. Kennedy, Hydrotris(methimazolyl)borate, a Soft Analouge of Hydrotris(pyrazolyl)borate. Preparation and Crystal Structure of a Novel Zinc Complex, *Chem. Commun.,***16** (1996) 1975–1976.

36. R. Gompper, Beziehungen zwischen Struktur und Reaktivität ambifunktioneller nucleophiler Verbindungen, *Angew. Chem*., **6** (1964) 412-423.

37. K. M. Dawood, B. F. Abdel-Wahab, Synthesis, reactions, and biological activity of 4,5-diarylimidazole-2-thiones, *Chem. Hetero. Comp.,* **46** (2010) 255-278.

38. R. M. Silva, M. D. Smith, J. R. Gardinier, Unexpected New Chemistry of the Bis(thioimidazolyl)methanes. *J. Org. Chem.* **70** (2005) 8755–8763.

39. J. Guoxin, H. Yuanbiao; J.Weiguo, Preparing carbene-nickel catalyst containing S-group elements for norbornane polymerisation. CN101255207A (2008-09-03).

40. L. Qingjian, S. Mingli, J. Chongqiu, L. Fengling, Syntheses and coordination properties of bridged bis(methimazole) compounds. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, **13** (1992) 328–331.

41. L. S. Bark, N. Chedwick, O. Meth-Cohn, N-bridged heterocycles. The synthesis and ligand properties of N, N´-polymethylene-bridged imidazole-2-thiones and benzimidazole-2-thiones, *Tetrahedron*, **48**(37) (1992) 7863-7868.

42. L. Quingijan, S. Daqing, Y. Kabei, X .Jianhua, 1,1´-(1,2-ethanediyl)bis(2,3-dihydro-3-methyl-1H-imidazole-2-thione), *Acta. Cryst. E.* **59**(3) (2003) 356-357.

43. P. Hassanaly, H. J. M. Dou, J. Metzger, G. Assef, J. Kister, S-Alkylation of 2-Thioxo-2,3-dihydroimidazole and its 1-Methyl Derivative under Phase-Transfer Conditions, *Synthesis,* (1997) 253-254.

44. J. Kister, G. Assef, G. Mille, J. Metzger, Synthèse et étude du rearrangement des diazoles-1, 3: alkyl-1 alkylthio-2 (allylthio, arylthio, cycloalkylthio) imidazoles. Partie I. Synthèse et études physicochimiques, *Can. J. Chem.* **57** (1979) 813–821.

45. A. I. Siriwardana, I. R. Crossley, A. A. J. Torriero, I. M. Burgar, N. F. Dunlop, G. B. Deacon, D. R. MacFarlane, Methimazole-based ionic liquids, *J. Org. Chem.*, 73 (2008) 4676-4679.

46. A. Corsaro, V. Pistarà, Conversion of the Thiocarbonyl Group into the Carbonyl Group, *Tetrahedron,* **54** (1998) 15027-15062.

47. C. A. Lipinski, J. L. Lamattina, P. J. Oates, Bioisosteric prototype design of biaryl imidazolyl and triazolyl competitive histamine H2-receptor antagonists, *J. Med. Chem.,* **29** (1986) 2154.

48. M. Nakamura, N. Shishido, H. Akutsu, Reactions of 1-methyl-2-mercaptoimidazole with hypochlorous acid and superoxide, *Jpn. J. Infect. Dis*., **57**(5) (2004) 34-35.

49. M. H. Ali, M. McDermott, Oxidation of thiols to disulfides with molecular bromine on hydrated silica gel support, *Tetrahedron Lett.,* **43** (2002) 6271-6273.

50. H. Eshghi, S. F. Tayyari, Z. Rezvani-Amin, H. Roohi, Methimazole-disulfide as an Anti-thyroid Drug Metabolite Catalyzed the Highly Regioselective Conversion of Epoxides to Halohydrins with Elemental Halogens, *Bull. Korean Chem. Soc.,* **29**(1) (2008) 51-56.

51. M. C. Aragoni, M. Arca, F. Demartin, F. A. Devillanova, A. Garau, F. Isaia, V. Lippolis, G. Verani, Anti-Thyroid Drug Methimazole: X-ray Characterization of Two Novel Ionic Disulfides Obtained from Its Chemical Oxidation by I2 , *J. Am. Chem. Soc*. **124** (2002) 4538-4539.

52. F. Isaia, M.C. Aragoni, M. Arca, F. Demartin, F.A. Devillanova, G. Floris, A. Garau, M.B. Hursthouse, V. Lippolis, R. Medda, F. Oppo, M. Pira, G. Verani, Interaction of methimazole with I2: X-ray crystal structure of the charge transfer complex methimazole-I2. Implications for the mechanism of action of methimazole-based antithyroid drugs, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4050-4053.

53. J. J. Taylor, R. L. Willson, P. Kendall-Taylor, Evidence for direct interactions between methimazole and free radicals, *FEBS Lett*. **176** (2) (1984) 337-340.

54. A. Wohl, W. Marckwald, Uber Condensation producte aus Amidoacetal (I), *Chem. Ber*., **22** (1) (1889) 568-580.

55. A. Wohl, W. Marckwald, Uber Condensation producte aus Amidoacetal (II), *Chem. Ber.* **22** (1) (1889) 1353-1362.

56. R. G. Jones, E. C. Kornfeld, K. C. McLaughlin, R. C. Anderson, Studies on Imidazoles. IV.1 The Synthesis and Antithyroid Activity of Some 1-Substituted-2-mercaptoimidazoles, *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 4000-4002.

57. P. W. Lee, M. J. Gudzinowicz, R. A. Neal, A high yield synthesis of 2-14C-methimazole, *J. Labelled Comp. Radiopharm.,* **14** (1978) 633-636.

58. J. E. Scott, G. Henderson, A new route to the imidazole-2-thiones from 2-hydantoins, *Biochem. J.* **109** (1968) 209 -217.

59. DMF, Applicants part, Methimazole, CU Chemie Ueticon GmbH, Germany.

60. R. Holm, D. Elder, Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling, *Eur. J. Pharm. Sci*., **87** (2016) 118–135.

61. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances, 2006.

62. ICH, Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7 (R1) 2017.

63. European Pharmacopoeia 7.0, Vol 2. Strasbourg, Council of Europe; 2011. Thimazole, p. 3071-3072.

64. A. Martınez, O. Dolgounitcheva, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, Nonconventional hydrogen bonds: a theoretical study of [uracil-L]-1 (L = F, Cl, Br, I, Al, Ga, In) complexes, *J. Phys. Chem. A.,* **112** (2008) 10399–10404.

65. Z. Yang, M. T. Rodgers, Influence of thioketo substitution on the properties of uracil and its noncovalent interactions with alkali metal ions: threshold collision-induced dissociation and theoretical studies, *J. Phys. Chem. A*., **110** (2006) 1455–1468.

66. H. Roohi, E. Zahiri, Thermodynamic and topological investigation of the interaction between methimazole and Mz+ (Na+, Li+, Ca2+ and Mg2+), *Comp. Theor. Chem.,* **984** (2012) 113–118.

67. W. Foye, J. R. Lo, Metal-binding abilities of antibacterial heterocyclic thiones. *J. Pharm. Sci.,* **61** (1972) 1209–1212.

68. T. S. Lobana, R. Sultana, G. Hundal, A. Castineiras, Synthesis and crystal structures of polynuclear complexes of CuI with 1-methyl-1,3-imidazoline-2-thione, *Polyhedron.*, **28** (2009) 1573–1577.

69. S. Bristow, J. A. Harrison, L. J. Farrugia, Preparation and Crystal Structure of Hexakis(1-methylimidazoline 2(3H)-thione) tetrakis(nitrato) dilead(II)., *Polyhedron*. **6** (1987) 2177-2180.

70. A. A. Mohamed, D. Rabinovich, J. P. Fackler, [Bis(2-mercapto-1-methylimidazol-3 yl)borato](triphenylphosphine)gold (I), *Acta. Cryst. E*., **58** (2002) 726-727.

71. Y. Matsunaga, K. Fujisawa, N. Amir, Y. Miyashita, K. I. Okamoto, Group 12 metal(II) complexes with 1-methylimidazoline-2(3H)-thione (mitH): Correlation between crystal structure and physicochemical property, *J. Coord. Chem.* **58** (2005) 1047-1061.

72. E. S. Raper, M. E. O'Neill, J.A. Daniels, Nickel(II) complexes of 1-methylimidazoline-2(3H)-thione, *Inorg. Chim. Acta.,* **41** (1980) 145-149.

73. E. S. Raper, I. W. Nowell, Coordination compounds of 1-methylimidazoline-2-(3H)-thione and metal nitrates [M(II) = Co, Zn and Cd]. A spectroscopic, thermal analysis and X-ray diffraction study, *Inorg. Chim. Acta*., **43** (1980) 165-172.

74. J. R. Creighton, D. J. Gardiner, A. C. Gorvin, C. Gutteridge, A. R. W. Jackson, E. S. Raper, P. M. A. Sherwood, Copper(I) halide complexes of imidazole thiones: Crystal structure of dimeric monochloro bis(1-methylimidazoline-2-thione) copper(I), *Inorg. Chim. Acta*., **103** (1985) 195-205.

75. N. M. Urquiza, S. G. Manca, M. A. Moyano, R. A. Dellmans, L. Lezama, T. Rojo, L. G. Naso, P. A. M. Williams, E. G. Ferrer, Copper(II) complexes of methimazole, an anti Grave's disease drug. Synthesis, characterization and its potential biological behavior as alkaline phosphatase inhibitor, *BioMetals*., **23** (2010) 255-264.

76. Z. Popović, D. Matković-Čalogović, Z. Soldin, G. Pavlović, N. Davidović, D. Vikić-Topić, Mercury(II) compounds with 1,3-imidazole-2-thione and its 1-methyl analogue. Preparative and NMR spectroscopic studies. The crystal structures of di-μ-iodo-bis[iodo(1,3-imidazolium-2-thiolato-S)mercury(II)], bis[bromo(1,3-imidazolium-2-thiolato-S)]mercury(II) and bis[μ-(1-N-methyl-1,3-imidazole-2-thiolato-S)]mercury(II), *Inorg. Chim. Acta.* **294** (1999) 35-46.

77. J. Demand, J. Jordanov, Complexes of Pt(II), Pd(II), Rh(I) and Rh(III) with nitrogen and sulfur-containing heterocyclic ligands of biological interest. Synthesis, characterization and influence of pH, *Inorg. Chim. Acta.,* **17** (1976) 37–44.

78. L. B. Kumbhare, U. Singh, B. G. Singh, A. Wadawale, G. Kedarnath, S. S. Zade, K. I. Priyadarsini, V. K. Jain, Methimazole complexes of platinum(II): Synthesis, characterization and redox behavior, *Inorg. Chim. Acta*., **374** (2011) 69–78.

79. J. Wagler, T. Heine, A. F. Hill, Poly(methimazolyl)silanes: Syntheses and Molecular Structures, *Organometallics.* **29** (2010) 5607–5613.

80. N. M. Urquiza L. G. Naso, S. G. Manca, L. Lezama, T. Rojo, P. A. M. Williams, E. G. Ferrer, Antioxidant activity of methimazole–copper(II) bioactive species and spectroscopic investigations on the mechanism of its interaction with Bovine Serum Albumin. *Polyhedron.* **31** (2012) 530–538.

81. I. Sainis, C. N. Banti, A. M. Owczarzak, L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S. K. Hadjikakou. New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions. *J Inorg Biochem*., **160** (2016) 114-24.

82. D. S. Cooper, Antithyroid drugs for the treatment of hyperthyroidism caused by Graves'disease, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am*., **27** (1998) 225–247.

83. E. Roti, E. Gardini, R. Minelli, M. Salvi, G. Robuschi, L. E. Braverman, Methimazole and serum thyroid hormone concentrations in hyperthyroid patients: Effects of single and multiple daily doses, *Ann. Intern. Med*., **111** (1989) 181–182.

84. F. Azizi, M. Khoshniat, M. Bahrainian, M. Hedayati, Thyroid function and intellectual development of infants nursed by mothers taking methimazole, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **85** (2000) 3233–3238.

85. Ling Chen, Hong-qing Wang, Yan-yan Gao, Jun Liang, Men Wang, Jie Bai, Wen-bo Qi, Jun-sheng Zhang, Jian Zhang, Juan-qing Ren, Hui-qing Li, Comparison of methimazole/hydrocortisone ointment with oral methimazole in patients with graves disease: A prospective, randomized, open-label, parallel-group, 18-month study, *Curr. Therap. Res*. **69** (4) (2008) 305-317.

86. L. D. Kohn, D. Goetz, H. Norikazu, C. Lewis, C. Giuliani, G. Napolitano, N. Dagia, Methimazole derivatives and tautomeric cyclic thiones to inhibit cell adhesion PCT/US2004/007888, WO2005094819A1 (16.03.2004).

87. A. N. Elias, M. M. Goodman, M. K. Rohan, K. Alpern, R. J. Barr, Methimazole (2-mercapto 1-methyl imidazole) in psoriasis--results of an open trial, *Dermatology*, **187** (1) (1993) 26-29.

88. J. F. Lagorce, T. Moulard, A. Rousseau, F. Comby, J. Buxeraud, C. Raby, Anti-Inflammatory Action of Methimazole, *Pharmacology,* **55** (4) (1997) 173–178.

89. A. A Elfarra, Protection against chemically induced kidney damage by methimazole, US5087441A 11.02.1992, 22.12.1989.

90. FelimazoleTM (methimazole), Managing Feline Hyperthyroidism, T e c h n i c a l b r o c h u r e, www.dechra-us.com, datum pretrage 10.01.2016.

91. M. E. Peterson, P. P. Kintzer, A. I. Hurvitz, Methimazole Treatment of 262 Cats With Hyperthyroidism, *J. Vet. Intern. Med*. **2** (1988) 150-157.

92. Methimazole (Veterinary—Systemic), The United States Pharmacopeial Convention (2008) p. 1-18.

93. A. Pignato, M. Pankaskie, C. Birnie, Sability of methimazole in poloxamer lecitin organogel to determine beyond use date, *Int. J. Pharm. Comp.,* **14** (2010) 522-525

94. K. E. Hill, M. A. Gieseg, D. Kingsbury, N. Lopez-Villalobos, J. Bridges, P. Chambers, The Efficacy and Safety of a Novel Lipophilic Formulation of Methimazole for the Once Daily Transdermal Treatment of Cats with Hyperthyroidism, *J. Vet. Intern. Med.* **25** (2011) 1357–1365.

95. ThrivingPets.com, http://www.thrivingpets.com/index.php/methimazole.html datum pretrage 10.05.2017.¶96.

96. P. Ying-Cheng, W. Ying, X. Lu-Yuan, X.Y. Guo, H.F. Yang, Adsorption Behavior of Methimazole Monolayers on a Copper Surface and Its Corrosion Inhibition, *J. Phys. Chem. C* **116** (2012) 3532–3538.

97. R. Zhang, Y. Wen, N. Wang, Y. Wang, Z. Zhang, H. Yang, Insight in the Relationship between the Structure and Property of Methimazole Monolayers on a Silver Surface: Electrochemical and Raman Study, *J. Phys. Chem. B.*, **114** (2010) 2450–2456.

98. Y.C. Pan, Y. Wen, L.Y. Xue, X.Y. Guo, H.F. Yang, Adsorption behavior of methimazole monolayers on a copper surface and Its corrosion inhibition, *J. Phys. Chem. C.*, **116** (2012) 3532-3538.

99. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/P030025S086c.pdf datum pretrage 20.07.2021.

100. A. I. Siriwardana, A. A. J. Torriero, J. M. Reyna-González, I. M. Burgar, N. F. Dunlop, A. M. Bond, G. B. Deacon, D. R. MacFarlane Nitrile Functionalized Methimazole-Based Ionic Liquids, *J. Org. Chem.*, **75** (24) (2010) 8376–8382.

101. H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, D. Morvan, Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications, *General Appl Catal A-Gen.*, **373** (2010) 1–56.

102. B. Davidson, M. Soodak, J. T. Neary, H. V. Strout, J. D. Kieffer, H. Mover, F. Maloof, The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. *Endocrinology*, **103** (1978) 871–782.

103. G. G. Skellern, B. I. Knight, C. K. Low, W. D. Alexander, D. G. McLarty, W. J. Kalk, The pharmacokinetics of methimazole after oral admistration of carbimazole and methimazole in hypertyroid patients, *Br. J. Clin. Pharmacol*. **9** (1980) 137–143.

104. G. G. Skellern, B. I. Knight, F. M. Luman, J. B. Stenlake, D. G. McLarty, M. J. Hooper, Identification of 3-Methyl-2-thiohydantoin, a Metabolite of Carbimazole, in Man, *Xenobiotica.* **7**(4) (1977) 247-253.

105. B. Marchant, W.D. Alexander, The thyroid accumulation, oxidation and metabolic fate of ^{35}S-methimazole in the rat, *Endocrinology,* **91** (1972) 747–756.

106. W. D. Alexander, B. Marchant, P. D. Papapetrou, Relation between thyroid iodine content and the accumulation and oxidation of [35-S] Methimazole in the rat, *Endocrinology*, **97** (1975) 154-161.

107. T. Mizutani, K. Yoshida, M. Murakami, M. Shirai, S. Kawazoe, Evidence for the involvement of N-methylthiourea, a ring cleavage metabolite, in the hepatotoxicity of methimazole in glutathione-depleted mice: structure-toxicity and metabolic studies. *Chem Res. Toxicol.,* **13** (2000) 170–176.

108. F. Huq, Molecular modeling analysis of the metabolism of methimazole, *J Pharmacol Toxicol.,* **3** (2008) 11-19.

109. Y. Mido, H. Okada, N. Fujita, I. Kitagawa, T. Kitahata, H. Hashimoto, The *cis* form of N-methylthiourea in the solid state: Raman spectroscopy, X-ray diffraction and *ab initio* molecular orbital calculations, *J. Mol. Struct.,* **415** (1997) 215-223.

110. R. Twele, W. Kern, G. Spiteller, 2-Mercapto-1-methyl-5-methylmercapto-imidazole: A new metabolite of thiamazole, *Xenobiotica,.* **13** (11) (1983) 661-668.

111. L. Hollosi, A. Kettrup, K.-W. Schramm, MMSPE-RP-HPLC method for the simultaneous determination of methimazole and selected metabolites in fish homogenates, *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **36** (2004) 921–924.

112. M. P. Sárria, J. Soares, M. N. Vieira, L. Filipe C. Castro, M. M. Santos, N. M. Monteiro, Rapid-behaviour responses as a reliable indicator of estrogenic chemicaltoxicity in zebrafish juveniles, *Chemosphere,* **85** (10) (2011) 1543-1547.

113. D.S. Cooper, The side effects of antithyroid drugs, *Endocrinologist.,* **9** (1999) 457-476.

114. R. Heidari H. Babaei, M. A. Eghbal, Cytoprotective Effects of Organosulfur Compounds against Methimazole-Induced Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes, *Adv. Pharm. Bull.* **3** (2013) 135-142.

115. National Technical Information Service. Vol. AD277-689

116. N. Brock, D. Lorentz, Zur Pharmakologie des 1-Methyl-2-merkaptoimidazols, Arzneimittelforschung, **4**(1) (1954) 20-26.

117. Farmaco, Edizione Scientifica **14** (1959) 54.

118. Clinical Endocrinology **51** (1999) 667.

119. N. H. Chut, W. M. Wiersinga, M. H. Van Oers, Methimazole-induced agranulocytosis preceded by transient granulocytopenia. A case report. *Neth J Med*. **43**(1-2) (1993) 71-73.

120. U. Bergmana, E. B. Brittebob, Methimazole Toxicity in Rodents: Covalent Binding in the Olfactory Mucosa and Detection of Glial Fibrillary Acidic Protein in the Olfactory Bulb, *Tox. Appl. Pharm*., **155** (1999) 190–200.

121. T. Mizutani, M. Murakami, M. Shirai, M. Tanaka, K. Nakanishi. Metabolism-dependent hepatotoxicity of methimazole in mice depleted of glutathione, *J. App.l Toxicol*., **19** (1999) 193-198.

122. S. Karras, T. Tzotzas, G. E. Krassas, Toxicological considerations for antithyroid drugs in children, *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.,* **7** (2011) 399-410.

123. J. H. Romaldini, M. C. Werner, N. Bromberg, R. S. Werner, Adverse effects related to antithyroid drugs and their dose regimen. *Exp. Clin. Endocrinol.,* **97** (1991) 261–264.

124. J. Kossakowski, T. Klopocki, T. Kuryl, B. Zbikowski, Assays of 1-methyl-2-thioimidazole. *Acta Pol. Pharm.,* **29** (1972) 473-478.

125. A. L. Hayden, W. L. Brannon, C. A. Yaciw, Infrared spectra of some compounds of pharmaceutical interest, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **50** (1966) 674.

126. Chunhong Dong, Yan Zhang, Li Guo, Quan-min Li, Spectrophotometric determination of methimazole in pharmaceutical, serum and urine samples by reaction with potassium ferricyanide-Fe(III), *J. Anal. Chem*., **65** (2010) 707-712.

127. Jing'e Huo, Quanmin Li, Determination of thiamazole in pharmaceutical samples by phosphorus molybdenum blue spectrophotometry, *Spectrochim. Acta A.,* **87** (2012) 293– 297.

128. S. Pinzauti, V. Dal Piaz, E. La Porta, Potentiometric determination of various thyrostatic drugs in tablets. *Farmaco. Prat.* **28** (1973) 396-402.

129. Z. Fijalek, P. Zuman, Determination of methimazole and carbimazole using polarography and voltammetry. *Anal. Lett*. **23** (1990) 1213-1233.

130. E. G. C. Clarke, Isolation and identification of drugs, Pharmaceutical Press, London, 1986, p. 413.

131. B. Le Bizec, F. Monteau, D. Maume, M. P. Montrade, C. Gade, F. Andre, Detection and identification of thyreostats in the thyroid gland by gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*. **340** (1997) 201–208.

132. S. Floberg, K. Lanbeck, B. Lindström, Determination of methimazole in plasma using gas chromatography-mass spectrometry after extractive alkylation, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl*., **182** (1980) 63-70.

133. J. B. Stenlake, W. D. Williams, G. G. Skellern, Development and comparison of thin-layer chromatographic and gas-liquid chromatographic methods for measurement of methimazole in rat urine, *J. Chromatogr*., **53** (1970) 285–291.

134. Tohoru Tatsuhara, Fumie Tabuchi, Maho Unate, Yukari Okamura, Chiaki Shigemasa, Kyoju Abe, Hiroto Mashiba, Determination of thiamazole in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl*., **339** (1985) 149–156.

135. M. Aletrari, P. Kanari, D. Partassides, E. Loiziu, Study of the British Pharmacopeia method on methimazole (thiamazole) content in carbimazole tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16** (1998) 785-792.

136. C. G. Duarte, A. C. M. Polizello, A. I. Assis-Pandochi, A. C. C. Spadaro, Optimization of HPLC analysis for the determination of propylthiouracil levels in plasma and serum, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23** (2000) 237-241.

137. A. Hashash, D. Lynn Kirkpatrick, M. J. Egorin, L. H. Block, J. S. Lazo, Normal-phase and stability-indicating reversed-phase high-performance liquid chromatographic methods for the determination of the novel antitumor agent: 1-methylpropyl-2-imidazolyldisulfide, *J. Chromatogr. B.,* **768**(2) (2002) 239-246.

138. P. Batjoens, H.F de Brabander, K. de Wasch, Rapid and high-performance analysis of thyreostatic drug residues in urine using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*., **750** (1996) 127-132.

139. H. Kobayashi, O. Matano, S. Goto, Simultaneous quantitation of thioureas in rat plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **207**(2) (1981) 281-285.

140. N. Kobayashi, M. Kadena, S. Teramoto, Identification of 1-methylthiourea as the metabolite of ethylenethiourea in rats by high-performance liquid chromatography, *Tox. Letters.*, 12(1982) 109-113.

141. K. Kuśmierek, E. Bald, Determination of methimazole in urine by liquid chromatography, Talanta, **71**(5) (2007) 2121-2125.

142. R. Zakrzewski, Determination of methimazole in urine with the iodine-azide detection system following its separation by reversed-phase high-performance, liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.,* **869**(1–2) (2008) 67-74.

143. M. Pan, J. Wang, G. Fang, W. Tang, S. Wang, Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer and its application as SPE enrichment sorbent for determination of trace methimazole in pig samples using HPLC-UV, *J. Chromatogr. B.*, **878**(19) (2010) 1531-1536.

144. K. De Wascha, H. F. Be Brabandera, S. Impensa, M. Vandewieleb, D. Courtheyn, Determination of mercaptobenzimidazol and other thyreostat residues in thyroid tissue and meat using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*., **912** (2001) 311–317.

145. H. Ebrahimzadeh, A. A. Asgharinezhad, L. Adlnasab, N. Shekari, Optimization of ion-pair based hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for the determination of methimazole in biological samples and animal feed, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 2040-2047.

146. B. Wozniak, I.M. Zuchowska, J. Zmudzki, P. Jedziniak, B. Korycinska, K. Sielska, S. Witek, A. Klopot, Liquid chromatography tandem mass spectrometry with ion trap and triple quadrupole analyzers for determination of thyreostatic drugs in urine and muscle tissue, *Anal. Chim. Acta.* **700** (2011) 155-166.

147. M. Lõhmus, K. Kallaste, B. Le Bizec, Determination of thyreostats in urine and thyroid gland by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* **1216** (2009) 8080-8089.

148. J. Vanden Bussche, L. Vanhaecke, Y. Deceuninck, K. Verheyden, K. Wille, K. Bekaert, B. Le Bizec, H. F. De Brabander, Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantifying thyreostats in urine without derivatisation, *J. Chromatogr. A.,* **1217** (2010) 4285-4293.

149. CrysAlisPro, Agilent Technologies, Verzija 1.171.37.33 (preuzeto 27. ožujka 2014. god. CrysAlis171.NET).

150. G. M. Sheldrick, A Short History of SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A* **64** (2008) 112–122.

151. A. L. Spek, Single-crystal structure validation with the program PLATON*J. Appl. Crystallogr*., **36** (2003) 7–13.

152. L. J. Farrugia, ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* **30** (1997) 565.

153. C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P. A. Wood, Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.*, **41** (2008) 466–470.

154. A. J. Arduengo, The synthesis, structure and chemistry of substituent perturbated thione S-methylides and S,S-dihalothiones Georgia Institute of Technology, 1976, dissertation.

155. X. L. Tao, M. Lei, Y. G. Wang, Unexpected Microwave Reaction of 1,3- Disubstituted Imidazolium Salts: A Novel Synthesis of 1,3-Disubstituted Imidazole-2-thiones. *Synth. Commun.,* **37** (2007), 399 – 408.

156. G. Lausa, V. Kahlenberg, K. Wurst, T. Muller, H. Kopacka, H. Schottenberger, Synthesis and Crystal Structures of New 1,3-Disubstituted Imidazoline-2-thiones, *Z. Naturforsch.,* **68** (2013) 1239 – 1252.

157. J. S. Figueroa, K. Yurkerwich, J. Melnick, D. Buccella, G. Parkin, Applications of Bis(1-R-imidazol-2-yl)disulfides and Diselenides as Ligands for Main Group and Transition Metals:

κ2-[N,N] Coordination, S-S Bond Cleavage and S-S/E-E (E = S, Se) Bond, *Inorg Chem*. **46** (22) (2007) 9234–9244.

158. H. Arnold, D. Vogelsang, DE 960279. (1957. 21.5).

159. L. Hok, R. Vianello, Direct metal-free transformation of alkynes to nitriles: Computational evidence for the precise reaction mechanism, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 3193.

160. S. Roca, L. Hok, R. Vianello, M. Borovina, M. Đaković, Lj. Karanović, D. Vikić-Topić, Z. Popović, The role ofnon-covalent interactions on dimensionality of the supramolecular structures of silver nitrate complexes with dihalopyridine derivatives and identification of the species in solution, *Cryst. Eng. Comm.,* **22** (2020) 7962-7974.

161. T. Tandarić, R. Vianello, Computational insight into the mechanism of the irreversible inhibition of monoamine oxidase enzymes by the anti-parkinsonian propargylamine inhibitors rasagiline and selegiline, *ACS. Chem. Neurosci.* **10** (2019) 3532-3542.

162. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2016.

163. L. Qingjian, S. Mingli, Synthesis of noncyclic crown ethers with methimazole heterocycle as a terminal group. Youji Huaxue, **12**(5) (1992) 509-513.

164. CDER/FDA. Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System; Rockville, MD, USA, 2017.

165. S. Shugarts, L. Z. Benet, The Role of Transporters in the Pharmacokinetics of Orally Administered Drugs, *Pharm Res* **26** (2009) 2039–2054.

166. R. Jansson, B. Lindstrom and P. A. Dahlberg, Pharmacokinetic Properties and Bioavailability of Methimazole, *Clin. Pharmacokinet*., **10** (1985) 443-450.

167. W. E. Alexander, V. Evans, A. MacAulay, T. F. Gallagher, J. Londono, Metabolism of JIS-labelled antithyroid drugs in man. *Br. Med. J*., **2** (1969) 290-291.

168. E. Buncel, A. R. Norris, S. E. Taylor, W. J. Racz, Metal ion-biomolecule interactions. IV. Methylmercury (II) complexes of 1-methylimidazoline-2-thione (methimazole), a potentially useful protective agent in organomercurial intoxication, *Can. J. Chem.,* **60**(24) (1982) 3033–3038.

169. C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, The Cambridge Structural Database, *Acta Cryst.,* **B72** (2016) 171-179

170. K. Pilaniya, H. K. Chandrawanshi, U. Pilaniya, P. Manchandani, P. Jain, N. Singh, Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals, *J. Adv. Pharm. Technol. Res* **1**(3) (2010) 302–310

171. L. Charles, J. Chiron, JP. Galy, Characterization of ammonium chloride derivatives by salt clustering in electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **17** (2003) 2471–2474

172. S. J. Enoch, C. M. Ellison, T. W. Schultz, M. T. D. Cronin, A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity, *Crit Rev in Toxicol.* **41** (2011) 783–802.

173. D. R. Dohn, J. E. Casida, Thiiranium ion intermediates in the formation and reactions of S-(2-haloethyl)-l-cysteines. *Bioorg. Chem.,* **15**(2) (1987) 115–124.

174. H. Q. Xie, N. Truong, E. Buncel, J. G. Purdon, Basicity, nucleophilicity, and nucleofugality in the elimination–substitution reactions of β-phenylmercaptoethyl phenolates in DMSO–ethanol media. *Can. J. Chem.,* **72**(2) (1994) 448–453.

175. S. E. Denmark, W. R. Collins, M. D. Cullen,Observation of Direct Sulfenium and Selenenium Group Transfer from Thiiranium and Seleniranium Ions to Alkenes, *J.Am.Chem.Soc,* 131 (2009) 3490-3492.

176. G. Pasquato, L. Lucchini, V. Lucchini, Different Approaching Directions of σ and π Nucleophiles to the Sulfur Atom of Thiiranium and Thiirenium Ions, *Chem. Eur. J*., **6** (2000) 589–590.

177. T. I. Sølling, S. B. Wild, L. Radom, Are Pi-Ligand Exchange Reactions of Thiirenium and Thiiranium Ions Feasible? An Ab Initio Investigation, *Chem. Eur. J.*, **5**(2) (1999) 509-514.

178. R. Destro, V. Lucchini, G. Modena, L. Pasquato, X-ray Structures and Anionotropic Rearrangements of Di-tert-butyl-Substituted Thiiranium and Thiirenium Ions. A Structure−Reactivity Relationship, *J. Org Chem*. **65** (2000) 3367-3370.

179. N. E. Alom, Y. A. Rina, W. Li, Intermolecular Regio- and Stereoselective Sulfenoamination of Alkenes with Thioimidazoles, *Org. Lett.*, **19** (2017) 6204–6207.

180. C. H. Bamford, C. F. H. Tipper The theory of kinetics, 1st ed .; Comprehensive Chemical Kinetics, Vol. 2, Elsevier Scientific Publishing: Amsterdam, Netherland, 1969.

181. S. E. Denmark, T. Vogler, Synthesis and Reactivity of Enantiomerically Enriched Thiiranium Ions, *Chem. Eur. J.*, **15**(43) (2009) 11737 – 11745.

182. G. H. Schmid, M. Strukelja, D. Snežana, The products of the reaction of thiiranium ions with competing nucleophiles, Can. J. Chem, **65**(8) (1987) 1945-1950.

183. A. Converso, P. L. Saaidi, K. B. Sharpless, M. G. Finn, Nucleophilic Substitution by Grignard Reagents on Sulfur Mustards, *J. Org. Chem*., **69**(21) (2004) 7336–7339.

184. S. Oae, Y. Yano, 3d-orbital resonance in divalent sulphide—XIII : The E2 reaction of p-substituted β-phenylmercapto chlorides and the corresponding oxygen analogues, *Tetrahedron*, **24**(17) (1968) 5721.

185. G. P. Ellis, T. M. Romney-Alexander, Cyanation of aromatic halides, *Chem. Rev*., **87** (1987) 779-794.

186. L. Friedman, H. Shether, Preparation of Nitriles from Halides and Sodium Cyanide. An Advantageous Nucleophilic Displacement in Dimethyl Sulfoxide, *J. Org. Chem.*, **26**(6) (1960) 877-879.

187. R. Guterman, H. Miao, M. Antonietti, Thioimidazolium Ionic Liquids as Tunable Alkylating Agents, *J. Org. Chem.* **83** (2018) 684−689.

188. Z. Sobol, M. E. Engel, E. Rubitski, W. W. Ku, J. Aubrecht, R. H. Schiestl, Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity. *Mutat Res.,* **633**(2) (2007) 80-94.

189. A. Modro, T. Modro, Solvation and metal ion effects on structure and reactivity of phosphoryl compounds. Part 2.' Alkali metal ion catalysis in the demethylation of methyl di(3-nitropheny1)phosphinate by iodide ion. *Can. J. Chem.,* **71** (1993) 469-472.

190. L. Zuo, Shanyan Yao, W. Wei, Wenhu Duan, An efficient method for demethylation of aryl methyl ethers, Tetrahedron Lett., **49**(25) (2008) 4054-4056.

191. B. A. Marekha, O. N. Kalugin, M. Bria, T. Takamuku, S. Gadžurić, A. Idrissi, Competition between Cation-Solvent and Cation-Anion Interactions in Imidazolium Ionic Liquids with Polar Aprotic Solvents. *Chem. Phys. Chem.,* **18**(7) (2017) 718–721.

192. W. R. Fawcett, P. Brooksby, D. Verbovy, I. Bako´, G. Palinkas, Studies of anion solvation in polar aprotic solvents, *J. Mol. Liq.,* **118** (2005) 171–178.

193. C. Vidovič, F. Belaj, N. C. Mösch-Zanetti, Soft Scorpionate Hydridotris(2-mercapto-1-methylimidazolyl) borate) Tungsten-Oxido and -Sulfido Complexes as Acetylene Hydratase Models. *Chem. Eur. J.,* **26**(54) (2020) 12431–12444.

194. S. G. Kalghatgi, B. M. Bhanage, Green syntheses of levulinate esters using ionic liquid 1-Methyl imidazolium hydrogen sulphate [MIM][HSO4] in solvent free system, *J. Mol. Liq.,* **281** (2019) 70–80.

195. M.A. Zolfigol, V. Khakyzadeh, A.R. Moosavi-Zare, G. Chehardoli, F. Derakhshan-Panah, A. Zare, O. Khaledian, Novel ionic liquid 1,3-disulfonic acid imidazolium hydrogen sulfate {[Dsim] HSO4 } efficiently catalyzed N-boc protection of amines, *Sci. Iran,* **19**(6) (2012) 1584-1590.

196. M. T. Clough, K. Geyer, P. A. Hunt, J. Mertesb and T. Welton, Thermal decomposition of carboxylate ionic liquids: trends and mechanisms, *Phys. Chem.*,**15** (2013) 20480-20495.

197. S. Grivas, E. Ronne, Facile Desulfurisation of cyclic Thioureas by Hydrogen Peroxide in Acetic Acid*, Acta Chem Scand*. **49** (1995) 255-229.

198. A. H. Van Bergen, G. Roos, F. De Proft, From Thiol to Sulfonic Acid: Modeling the Oxidation Pathway of Protein Thiols by Hydrogen Peroxide, *J. Phys. Chem. A*, **118** (2014) 6078–6084.

199. L.L. Poulson, R.M. Hyslop, D.M. Ziegler, S-oksidation of thiouraeyelenes catalyzed y a microsomal flavoprotein mixed function oxidase, *Biochem. Pharm.,* **23** (1974) 3431-3440.

200. K. Chipso, R. H. Simoyi, Kinetics and Mechanism of Oxidation of methimazole by Chlorite in Slighly Acidic Media, *J. Phys. Chem., A.* **120** (2016) 3767-3779.

201. S. R. Byrn, R. Pfeiffer, J. G. Stowell: Solid State Chemistry of Drugs, 2nd ed., SSCI Inc, West Lafayette, 1999.

202. J. Bernstein: Polymorphism in Molecular Crystals, 1st ed. Oxford Univeristy Press, New York, 2002.

203. C. Sudha, K. Srinivasan, Understanding the effect of solvent polarity on the habit modification of monoclinic paracetamol in terms of molecular recognition at the solvent crystal/interface, *Cryst. Res. Technol*., **49**(11) (2014) 865–872.

204. A. L. Da Silva, A. H. De Oliveira, M. L. S. Fernandes, Influence of preferred orientation of minerals in the mineralogical identification process by x-ray diffraction, International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011 Belo Horizonte, MG, Brazil, 2011.

205. https://cms.eas.ualberta.ca/xrd/sample-preparation/ datum pretrage 01.09.2021.

206. C. Lefebvre, A. M. Guyot-Hermann, M. Draguet-Brughmans, R. Bouche, J. C. Guyot, Polymorphic Transitions of Carbamazepine During Grinding and Compression, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **12** (1986) 1913-1927

207. S. Lin, W. Cheng, M. Li, S. Wang, Grinding effect on the thermodynamic and kinetic characterizations of polymorphic transformation of famotidine, International Conference on Biomedical and Pharmaceutical Engineering, 2006, pp. 314-318.

208. P. Yang, C. Qin, S. Du, L. Jia, Y. Qin, J. Gong, S. Wu, Crystal Structure, Stability and Desolvation of the Solvates of Sorafenib Tosylate. *Crystals*, **9** (2019) 367.

209. A. M. Healy, Z. A. Worku, D. Kumar, A. M. Madi, Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. *Adv Drug Deliv Rev*., **117** (2017) 25-46.

210. Haiyan Yang, Yang Yang, Lina Jia, Weiwei Tang, Shijie Xu, Shichao Du, Mingchen Li, Junbo Gong, The Phase Transformation and Formation Mechanism of Isostructural Solvates: A Case Study of Azoxystrobin, *Cryst. Growth Des.*, **19**(3) (2019)1550-1558.

211. Lina Zhou, Qiuxiang Yin, Shichao Du, Hongxun Hao, Yanfeng Li, Mingyan Liu and Baohong Houab, rystal structure, thermal crystal form transformation, desolvation process and desolvation kinetics of two novel solvates of ciclesonide, *RSC Adv*., **6** (2016) 51037.

212. M. Dumić, M. Vinković, M. Orešić, E. Meštrović, A. Danilovski, A. Dumbović, Z. Knežević, G. Lazarevski, F. Filić, D. Cinčić, K. Lazarić, D.K. Bučar, Novel Amorphous 9-Deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerithromycin A, Process for Preparing the Same, and Uses Thereof (PLIVA Ltd.), US 6,936,591 B2 (2005.30.8).

213. L. Infantes, S. Motherwell, Water clusters in organic molecular crystals. *Cryst. Eng. Comm*., **4** (2002) 454–461.

214. J. Aaltonen, M. Allesø, S. Mirza, V. Koradia, K. C. Gordon, J. Rantanen, Solid form screening—A review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71** (2009) 23–37.

215. A. S. Larsen, M. T. Ruggiero, K. E. Johansson, J. A. Zeitler, J. Rantanen, Tracking Dehydration Mechanisms in Crystalline Hydrates with Molecular Dynamics Simulations. *Cryst. Growth Des*. **17** (2017)5017–5022.

216. A.K. Galwey, Structure and order in thermal dehydration of crystalline solids. *Thermochim. Acta*., **355** (2000) 181–238.

217. S. Petit, G. Coquerel, Mechanism of Several Solid−Solid Transformations between Dihydrated and Anhydrous Copper (II) 8-Hydroxyquinolinates. Proposition for a Unified Model for the Dehydration of Molecular Crystals. *Chem. Mater*., **9** (1996), 2247–2258.

218. K. R. Morris, Structural Aspects of Hydrates and Solvates. In *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Brittain, H.G., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, USA, 1999; pp. 125–182

219. M. Dumić, M. Vinković, M. Orešić, E. Meštrović, A. Danilovski, A. Dumbović, Z. Knežević, G. Lazarevski, D. Filić, D. Cinčić, D. Isostructural Pseudopolymorphs of 9-Deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerithromycin A; PLIVA d.d.: Zagreb, Hrvatska, 2009; US 7,569,549 B2 (2009.4.8).

220. M. Dumić, M. Vinković, M, Orešić, E, Meštrović, A. Danilovski, A. Dumbović, Z. Knežević, G. Lazarevski, D. Filić, D Cinčić, D, Novel Amorphous 9-Deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerithromycin A, Process for Preparing the Same, and Uses Thereof; PLIVA d.d.: Zagreb, Hrvatska, 2005; US 6,936,591 B2 (2005.30.8).

221. K. Fujii, H. Uekusa, N. Itoda, E. Yonemochi, K. Terada, Mechanism of Dehydration–Hydration Processes of Lisinopril Dihydrate Investigated by ab Initio Powder X-ray Diffraction Analysis. *Cryst. Growth Des.* **12** (2012) 6165–6172.

222. R. Mizoguchi, H. Uekusa, Elucidating the Dehydration Mechanism of Ondansetron Hydrochloride Dihydrate with a Crystal Structure, *Cryst. Growth Des.* **18** (2018) 6142–6149.

223. L. Cavalca, P. Domiano, A. Musatti, *Cryst. Struct. Commun.* **1** (1972) 345-348.

224.J. Donohue, L. R. Lavine, J. S. Rollett, The crystal structure of histidine hydrochloride monohydrate, *Acta Cryst,* **9** (1956) 655.

225. S. C. Abrahams, The stereochemistry of sub-group VIB of the periodic table, *Quart. Rev*., **10** (1956) 10 407.

226. V. A. Tafenko, H. K. Schenk, A. Paseshnichenko, L.A. Aslanov, 7-Methyl-6-phenylimidazo[2,1-b]thiazolium Iodide, *Acta Cryst., C.* **52** (1996) 729-731.

227. H. Neto, K. Nova, J. Matos, Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. *J. Therm. Anal. Calorim.* 97 (1) (2009) 367– 374.

228. R. Chadha, S. Bhandari, Drug–excipient compatibility screening— role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal*., **87** (2014) 82–97.

229. K. Santos Veras, F. Nathiely Silveira Fachel, V. Pittol, K. Ribeiro Garcia, V. Linck Bassani, V. dos Santos, A. Teresinha Henriques, H. Ferreira Teixeira, L. Scherer Koester, Compatibility study of rosmarinic acid with excipients used in pharmaceutical solid dosage forms using thermal and non-thermal techniques, Saudi. Pharm. J., **27**(8) (2019) 1138-1145.

230. G. G. G. de Oliveira, A. Feitosa, K. Loureiro , A. R. Fernandes, E. B. Souto, P. Severino, Compatibility study of paracetamol, chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in physical mixtures, *Saudi. Pharm. J.,* **25**(2017) 25 99–103

231. N. R. Pani, L. K. Nath, S. Acharya, B. Bhuniya, 2012. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. *J. Therm. Anal. Calorim.* 108 (2012) 219–226.

232. M. Kuzuya, Y. Yamauchi, S. Kondo, Mechanolysis of glucose-based polysaccharides as studied by electron spin resonance. *J. Phy.s Chem. B*., **103** (1999) 8051–8059.

233. W. P. L. Carter, K. R. Darnall, R. A. Graham, A. M. Winer, J. N. Pitts, Reactions of C2 and C4 alpha-hydroxy radicals with oxygen. *J. Phys. Chem. B.* **83** (1979) 2305-2311.

234. A. Miyoshi, H. Matsui, Rates of reaction of hyrdoxyalkyl radicals with molecular oxygen, *J. Phys. Chem. B.,* **94** (1990) 3016–3019.

235. A. M. Polizzi, D. Singhal, Mechanoradical-Induced Degradation in a Pharmaceutical Blend during High-Shear Processing, *Pharm. Dev. Technol.,* **13** (2008) 457–462.

236.http://www.pharmatips.in/Articles/Pharmaceutics/Tablet/Co-Processed-Directly-Compressible-Adjutants.aspx datum pretrage 19.08.2021.

237. A. H. Kibbe, (Ed.), Pharmaceutical Excipient, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, Washington 2000.

238. Y. Wu, J. Levons, A. S. Narang, K. Raghavan, V. M. Rao, Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility, *Pharm. Sci. Tech*, **12**(4) (2011) 1248-1263.

239. K. J. Hartauer, G. N. Arbuthnot, S. W. Baertschi, R. A. Johnson, W. D. Luke, N. G. Pearson, E. C. Rickard, C. A. Tingle, P. K. Tsang, R. E. Wiens, Influence of Peroxide Impurities in Povidone and Crospovidone on the Stability of Raloxifene Hydrochloride in Tablets: Identification and Control of an Oxidative Degradation Product, *Pharm. Dev. Technol*, **5**(3) (2000) 303–310.

240. N. Yu. Study of the Kinetics of Free Radical Polymerization of Styrene in a Three Dimensional Network and Applications for Used Tire Recycling. Food and Nutrition. Université de Lorraine, 2015.

241. Y. R. Luo, Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, USA, 2007 pp. 1–1656.

242. E. L. Tyson, M. S. Ament, T. P. Yoon, Transition Metal Photoredox Catalysis of Radical Thiol-Ene Reactions, *J. Org. Chem.*, **78** (2013) 2046–2050.

243. F. Dénès, M. Pichowicz, G. Povie, P. Renaud, Thiyl Radicals in Organic Synthesis. *Chem. Rev*., **114** (2014) 2587–2693.

244. A. Sharma, P. Wadhwa, A. Kharbanda, Thia-Michael addition: An emerging strategy in organic synthesis, *Asian J. Org. Chem*., **7**(4) (2018) 634-661.

7. ŽIVOTOPIS

Leo Štefan rođen je 09. travnja 1982. godine u Rijeci.

Obrazovanje:

2003.-2008. Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, dipl.ing

1996.-2000. Kemijsko tehnološka škola, Rijeka, kemijski procesni tehničar

Radno iskustvo:

2018.-danas JGL. d.d., Ekspert istraživanja i predformulacija

2016.-2018. JGL. d.d., Predformulator

2014.-2016. JGL. d.d., Voditelj nadzora kvalitete sustava i procesa

2012.-2014. JGL. d.d., Viši specijalist sustava kvalitete

2010.-2011 JGL. d.d., Specijalist osiguranja kvalitete

2008.-2000. Osnovna škola Viktora Cara Emina, Nastavnik kemije

Članstva:

2010.- Hrvatsko kemijsko društvo

Znanstveni radovi u časopisima (3)

1. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, D. Filić, M. Dumić, Synthesis, Crystal Structure and Solid State Transformation of 1,2-Bis[(1-methyl-1H-imidazole-2-yl)thio]ethane, *Crystals,* **10** (8) (2020) 667.

2. R. Pantović, M.Tota, L. Štefan, Č. Milin, Effect of Olive Oil on Brain's Lipid and Calcium Content after Partial Hepatectomy in Mice, *Coll. Antropol.,* **35** (2011) 85-91.

3. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidić, M.Urukalo, D.Tota, R. Domitrović: Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice, *Medicina*, 43 (2007) 84-93.

Priopćenja na znanstvenim skupovima (10)

1. L. Štefan, A. Čikoš, R. Vianello, I. Đilović, M. Dumić, Reactivity and thermal behaviour of 7-methyl-2*H,*3*H*,7*H*-imidazo[2,1-*b*]thiazol-4-ium chloride. 27. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2021. (sažetak recenziran i prihvaćen)

2. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, L. Saftić Martinović, M. Dumić, Sinteza i struktura 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-imidazol hidrojodida. Knjiga sažetaka 18. Ružičkinih dana, Jukić Ante (ur.), 2020. p55, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

3. A. Piškulić, Z. Huljev Badurina, L. Munjas Jurkić, Z. Knežević, M. Safundžić Kučuk, L. Štefan, Optimizacija i karakterizacija D-α – tokoferol nanoemulzije. Knjiga sažetaka 18. Ružičkinih dana 2020. Jukić Ante (ur.). 2020. p133, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

4. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, 1,2-Bis[(1-metil-1-*H*-imidazol-2-il)tio]etan, Sinteza, karakterizacija i transformacija u čvrstom stanju. Knjiga sažetaka 26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Galić Nives (ur), 2019, p108, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

5. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, Solvent mediated alkylation of methimazole with 1,2 dichloroethane. Book of abstacts 18 Blue Danube symposium on heterocyclic chemistry, Brodnik Žugelj, Kranjc, Krištof (ur.), 2019. p80, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

6. F. Mrša, L. Štefan, S. Kraljević Pavelić, Development of in-situ gelling systems based on alginate as a platform for ophtalmic application // Book of abstracts AARC doctoral conference "Inovative technologies in biomedicine" Rijeka; AARC, 2019. (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

7. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, Žuta forma metimazol disulfida. Knjiga sažetaka 16. Ružičkinih dana, Jukić, Ante (ur.), 2016. p29, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

8. L. Štefan, Z. Badurina Huljev, S. Vukoja, V. Saršon Beltrame, I. Valentić Žunić, M. Šimac, K, Vukelić, Z. Knežević, Preformulation approch for novel formulation (oral solution) based on the known active substance. Book of abstracts 5th Croatian Congress on Pharmacy, Hrvatsko farmacutsko društvo (HFD). 2015. p165, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)

9. R. Pantović, L. Štefan, Z. Ciganj, Č. Milin, Olive and Corn-oil Enriched Diets and Mineral Content in the Brain during Liver Regeneration in Mice. Book of abstracts 7th Euro Fed Lipid Congress - Lipids, Fats and Oils – From Knowledge to Application, 2009. p393, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

10. R. Pantović, L. Štefan, M. Sigler, Z. Ciganj, Č. Milin, Effect of Dietary Olive Oil on the Brain Tissue Mineral Concentration and Total Lipid Content in the Mice, 12. Ružičkini dani: Znanost i nove tehnologije u razvoju gospodarstva, Tomas Srećko (ur.) 2008. p132 (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

8. PRILOZI

8.1. Popis oznaka kratica i simbola

PTU 6-propiltiouracil

FDA Food and Drug Administration

MMI Metimazol

MET Metimazol

MTU Metiltiouracil

KARB Karbimazol

TSH Tireoid stimulirući hormon

TRH Tireoliberin

T3 Trijodtreonin

T4 Tiroksin

HPLC Tekućinska kromatografija visoke djelotovornosti

LL Ekstrakcija tekuće-tekuće

SPE Ekstrakcija na čvrstoj fazi;

MEH Metilhidantoin

SHMET 2-merkaptoimidazol

NMR Nuklearna magnetska rezonancija

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence (Heteronuklearna tehnika NMR)

HMBC Heteronuclear Multiple BondCorrelation (Heteronuklearna tehnika NMR)

DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (1D tehnika NMR)

DSC Diferencijalna pretražna kalorimetrija

IR Infrared spectroscopy

DAD Diode array detector

LOD Limit detekcije

LOQ Limit kvantifikacije

S/N Omjer vrijednosti signal/šum

LC-MS Tekućinska kromatografija-spektrometrija masa

m/z Omjer mase i naboja

RRT Relativno vrijeme zadržavanja

ESI Ionizacija elektro raspršenjem

ΔH Promjena entalpije

RV Relativna vlažnost

AIBN Azobisizobutironitril

UV Ultraljučasto zračenje

δ / ppm Kemijski pomak

QbD Kvaliteta vođena dizajnom

BCS Biofarmaceutski sustav klasifikacije

8.2. Osnovni kristalografski podaci za studirane strukture

Tablica 34. Opći kristalografski podaci za strukture **2c, 3b, 3a, 3c, 7a, 7b, 10.**

Spoj	**2c**	**3b**	**3a**	**3c**	**7a**	**7b**	**10**
Formula	$[C_9H_{14}N_4S_2]Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$	$[C_{10}H_{16}N_4S_2]Cl_2 \cdot 4(H_2O)$	$C_{10}H_{14}N_4S_2$	$C_{10}H_{14}N_4S_2 \cdot 2(H_2O)$	$C_6H_9N_2SCl$	$C_6H_9BF_4N_2S$;	$C_{12}H_{18}N_4AgBCl_2F_4S_2$;
M_r	398,03	399,35	254,37	290,40	170,66	228,02	586,00
Kristalni sustav	Monoklinski	Monoklinski	Monoklinski	Trigonski	Ortorombski	Monoklinski	Monoklinski
Prostorna grupa	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$P2_1/c$	*R*-3	*Pnma*	$P2_1/c$	$P2_1/c$
a/Å	6,7755(3)	11,1667(10)	4,7035(7)	19,3142(13)	12,6076(7)	5,56720(10)	7,54590(10)
b/Å	11,0081(5)	7,7629(7)	12,3772(14)	19,3142(13)	6,5062(5)	17,1985(4)	13,5083(2)
c/Å	23,4971(11)	11.8970(13)	10,3316(11)	10,3283(5)	9,9267(6)	10,0040(2)	19,3375(3)
α/°	90	90	90	90	90	90	90
β/°	94,657(5)	109,637(11)	92,772 (14)	90	90	93,848(2)	93,3310(2)
γ/°	90	90	90	180	90	90	90
Z	8	2	2	9	4	4	4
F(000)	369	420	268	1386	369	464	1080
T/K	172	292	150	292	293	170	170
V/ $Å^3$	1746,75(14)	971,32(18)	600,76(13)	3336,75 (5)	814,26(9)	955,70(3)	1967,79(5)
D_x/g.cm^3	1,514	1,365	1,406	1,301	1,441	1,585	1,850
S	0,933	0,900	0,933	1,047	1,053	1,101	1,083
R	0,0359	0,049	0,0493	0,0398	0,0359	0,079	0,026
ωR (F^2)	0,0945	0,1272	0,1063	0,0994	0,1219	0,1856	0,0649
Br. refleksija	20514	2329	972	1448	988	1689	3450
CCDC	nije deponirano	2013659	2013658	2013660	2105605	2105606	2105607

Tablica 34. (Nastavak) Opći kristalografski podaci za strukture **11, 4b, 5a, 5b.**

Spoj	**11**	**4b**	**5a**	**5b**
Formula	$C_{10}H_{14}N_4S_2$	$C_5H_9IN_2S$	$C_8H_{10}N_4S_2$	$C_8H_{10}N_4S_2$
M_r	254,37	256,10	226,32	226,32
Kristalni sustav	Monoklinski	Monoklinski	Monoklinski	Monoklinski
Prostorna grupa	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$C2/c$	$C2/c$
a/Å	12,1442(5)	8,6603(1)	12.5904(6)	12,6009(9)
b/Å	6,9640(3)	7,4999(1)	7.3959(3)	7.4036(5)
c/Å	14,1111(6)	13,7504(2)	11.2869(5)	11.2979(7)
α/°	90	90	90	90
β/°	93,260(4)	94,826(0)	97.886(4)	97.825(7)
γ/°	90	90	90	90
Z	4	4	4	4
F(000)	536	488	472	472
T/K	170	292	292	292
V/ $Å^3$	1191,48(9)	889.94(2)	1041.07(8)	1044.19(12)
D_x/g.cm^3	1,418	1,911	1,444	1,440
S	1,076	1,077	1,051	1,084
R	0,032	0,0138	0,0317	0,0505
ωR (F^2)	0,0803	0,0318	0,0882	0,1263
Br. refleksija	2217	2357	1143	1517
CCDC	2105608	nije deponirano	nije deponirano	Nije deponirano

8.3. Preslike publikacija ostvarenih u sklopu ove doktorske disertacije

1. L. Štefan, D. Matković-Čalogović, D. Filić, M. Dumić, Synthesis, Crystal Structure and Solid State Transformation of 1,2-Bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane, Crystals, 10 (8) (2020) 667, Časopis Crystals - Impact factor 2,589.

crystals MDPI

Article

Synthesis, Crystal Structure and Solid State Transformation of 1,2-Bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane

Leo Štefan [1,*], Dubravka Matković-Čalogović [2], Darko Filić [3] and Miljenko Dumić [4]

1 JGL d.d., Jadran Galenski Laboratorij, 51000 Rijeka, Croatia
2 Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; dubravka@chem.pmf.hr
3 Fidelta d.o.o., 10000 Zagreb, Croatia; darko.filic@fidelta.eu
4 Department of Biotechnology, University of Rijeka, 51000 Rijeka, Croatia; mdumic@biotech.uniri.hr
* Correspondence: leo.stefan@jgl.hr; Tel.: +385-98-214-996

Received: 13 July 2020; Accepted: 28 July 2020; Published: 3 August 2020

check for updates

Abstract: The spontaneous *S*-alkylation of the thyreostatic drug methimazole (1-methyl-1,3-dihydro-1*H*-imidazole-2-thione, **1**) with 1,2-dichloroethane at room temperature, in dark or light conditions, led to the formation of its related substance 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane, $C_{10}H_{14}N_4S_2$ (**2a**), primarily isolated in the form of dihydrochloride tetrahydrate $[C_{10}H_{16}N_4S_2]Cl_2{\cdot}4(H_2O)$ (**2b**), which crystallized in the monoclinic $P2_1/c$ space group. Neutralization of **2b**, followed by crystallization from the acetone/water mixture, produced dihydrate $C_{10}H_{14}N_4S_2{\cdot}2(H_2O)$ (**2c**), which crystallized in the trigonal *R*-3 space group. Six water molecules in **2c** are H-bonded mutually and to the nitrogen atoms of six molecules of **2a**. DSC and TGA showed that **2c** melts at 65 °C and loses water up to 120 °C. By cooling to room temperature, anhydrous **2a** was obtained. Single crystals of **2a** that are suitable for X-ray structure analysis were obtained by neutralization of **2b**, followed by crystallization from dry dichloromethane. Anhydrous **2a** crystallizes in the monoclinic $P2_1/c$ space group. The dehydration of **2c** led to the formation of the anhydrous product **2a**, which is identical to the one obtained by crystallization, as was found by complementary solid-state techniques. No intermediate monohydrate or hemihydrate phases were detected. Powder diffraction showed the same pattern of **2c** via both preparation procedures. The structures of all the forms were elucidated by spectroscopy, microscopy and thermal methods and confirmed by single crystal X-ray analysis.

Keywords: methimazole; 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane; solid-state forms; hydrates; dehydration

---

1. Introduction

Methimazole (1-methyl-1,3-dihydro-1*H*-imidazole-2-thione, **1**), a well-known commercially available thyreostatic drug [1], has an ambidentate heterocyclic anion of the type [N-C-S] and was used as the terminal group in the synthesis of noncyclic crown ethers as scorpionate ligands in diverse aspects of the coordination chemistry [2,3].

Among the bridged bis(methimazole) compounds, 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]methane (**A**) and an analogous ethane derivative 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane (**2a**) were synthesized from **1** and dichloromethane or 1,2-dibromoethane. Synthesis was performed in the presence of a strong base, without or under phase-transfer conditions at an elevated temperature [4,5]. In the context of the pharmaceutical purity profile, these compounds are considered as potential methimazole related substances [6], especially if common solvents, e.g., dichloromethane (DCM) and 1,2-dichloroethane (DCE), are used in the synthetic transformations, isolation, purification and methimazole analytics.

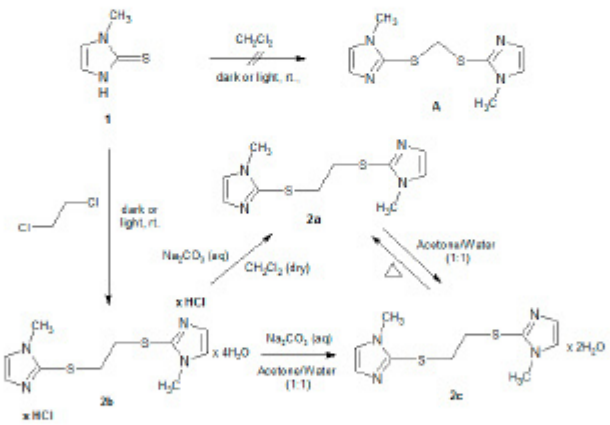
Therefore, it was important to understand their behaviour from a chemical, structural and solid-state point of view. To evaluate these factors, we carried out a preliminary stability study of **1** in DCM and DCE in daylight or dark, at ambient humidity and room temperature.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of Bis Derivative 2

Solutions of **1** in DCM or DCE were left without stirring in daylight or dark, at ambient humidity and at room temperature for 15 days. According to the TLC analysis, no changes of **1** were observed in DCM solutions. However, in both DCE solutions (i.e., in light and dark) spontaneous S-bis alkylation of **1** by 1,2-dichloroethane led to the formation of colourless plate shaped crystals of 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane in the form of dihydrochloride tetrahydrate (**2b**) with a 30% yield; mp. (DSC, onset): 208 °C. Purity by HPLC: 98%. Upon its neutralization, extraction, evaporation of the solvent and crystallization of the crude residue from the dry dichloromethane under low humidity conditions of the anhydrous 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane **2a** was obtained with an 84% yield, mp. (DSC, onset): 89 °C (lit: 88–90 °C, [5]).

However, if crystallization of the crude residue is attempted from the acetone/water (1/1) mixture, 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane dihydrate (**2c**) is obtained with a 78% yield; mp. (DSC, onset): 65 °C. The same product was obtained by the crystallization of pure **2a** from the acetone/water (1/1) mixture. Anhydrous from **2a** was also prepared by drying the dihydrate **2c** (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]—derivatives **A** and **2** (**2a**–**2c**).

2.2. Characterization of 1,2-Bis[(1-methyl-1H-imidazole-2-yl)thio]ethane Forms 2a–2c

All the studied forms, **2a**–**2c**, were elucidated using spectroscopy, microscopy, thermal and complementary analytical methods. Their structures were confirmed by the single crystal X-ray diffraction analysis.

Proton chemical shifts of dihydrochloride tetrahydrate **2b**, recorded in D_2O, were different in comparison to the previously reported data for **2a** in $CHCl_3$-C_6H_6 [5], while relative integrations indicated protonation of the imidazole ring and confirmed the proposed structure (Figure 1). Mass spectra recorded in the positive mode indicated the most abundant ion at 255.0743 m/z, which was attributed to the base peak of **2a**, corresponding to $[M+H-2HCl]^+$. Additionally, two formed fragments at 141.0486 m/z and 114.0249 m/z indicated cleavage of the thioethyl group. However, DSC showed an endothermic loss of volatile solvents between 35 and 70 °C. In addition, mass loss by TGA of 3.8% and chloride content of 18%, determined by ionic chromatography, indicated that

the product crystallized as a dihydrochloride tetrahydrate. The hypothesis was confirmed by single crystal X-ray diffraction analysis.

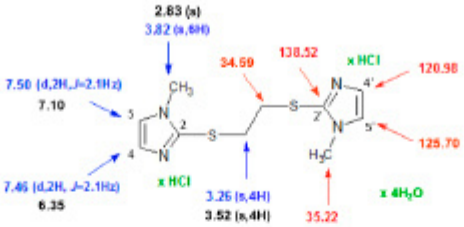
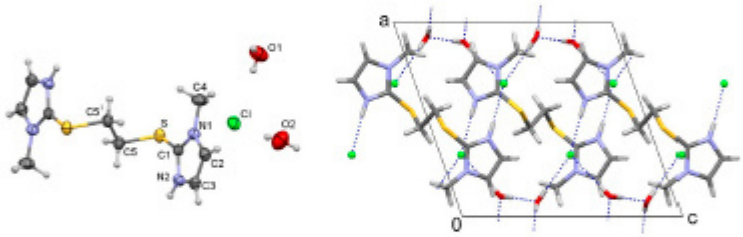


Figure 1. ^{1}H (600 MHz) (blue), ^{13}C (151 MHz) (red) NMR in D_2O of **2b** and ^{1}H (black) NMR in $CDCl_3$-C_6D_6 of **2a** [5].

The molecular structure of **2b** consisted of two cationic imidazolyl groups bounded to the *S*-atoms of the dithioethyl group (Figure 2a). Each chloride anion was a hydrogen bond acceptor from the protonated imidazole nitrogen atom N2 and two water molecules (Figure 2b, Table 1). The two water molecules were also connected by hydrogen bonds. Through these hydrogen bonds, the cations, chloride anions and water molecules were interconnected into a 3D network.



(**a**) (**b**)

Figure 2. (**a**) Molecular structure of **2b** with the atomic numbering scheme; symmetry code (i) 1 − x, −y, −z, and (**b**) packing diagram of **2b** viewed along the *b*-axis. Hydrogen bounds are marked by dashed blue lines.

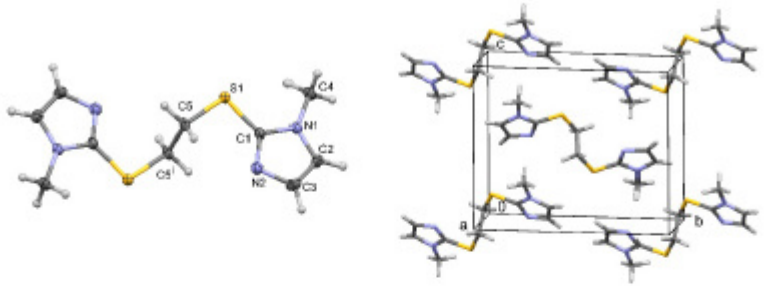
Table 1. Distances and angles of the hydrogen bonds in **2b** and **2c**.

Form	Donor-H···Acceptor	*d*(D-H)/Å	*d*(H-A)/Å	*d*(D···A)/Å	<*d*(D-H···A)/°
2b	N2-H2···Cl [a]	0.86	2.26	3.112 (2)	172
	O1-H11···O2 [b]	0.78 (4)	1.98 (4)	2.749 (5)	169 (5)
	O1-H12···Cl [c]	0.75 (5)	2.44 (5)	3.190 (4)	178 (6)
	O2-H21···Cl	0.78 (6)	2.42 (6)	3.198 (4)	174 (5)
	O2-H22···O1	0.83 (3)	1.93 (3)	2.756 (5)	172 (3)
2c	O1-H1···N2 [d]	0.81 (3)	2.03 (3)	2.827 (3)	167 (4)
	O1-H12···O1 [e]	0.87 (4)	1.92 (4)	2.787 (4)	176 (4)
	C4-4B···O1 [f]	0.96	2.58	3.489 (4)	157

Transformation of the asymmetric unit: (**a**) 1 − x, −1/2 + y, 1/2 − z; (**b**) −x, 1/2 + y, 1/2 −z; (**c**) x, 3/2 − y, 1/2 + z; (**d**) −x + y, −x, z; (**e**) y, −x + y, −z; (**f**) 1/3 − x + y, 2/3 −x, −1/3 + z.

Proton and carbon chemical shifts in the NMR spectra of **2a** in DMSO-d6 exhibited similar values to those in **2b**, and experimental MS data matched the theoretical data. After several attempts, we obtained good quality, single crystals by crystallisation from dry dichloromethane at dry conditions (see experimental section) that allowed us to confirm the anhydrous structure of **2a**, which crystallized in the monoclinic $P2_1/c$ space group.

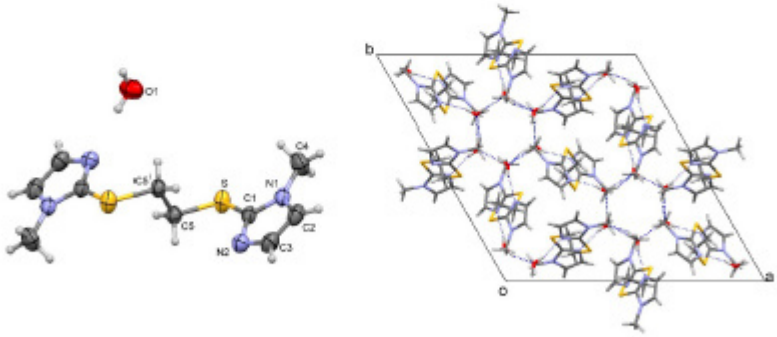
There are no hydrogen bounds in the structure of **2a**, only van der Waals forces connect the molecules (Figure 3).



(**a**) (**b**)

Figure 3. (**a**) Molecular structure of **2a** with the atomic numbering scheme; symmetry code (i) 1 − x, −y, −z, and (**b**) packing diagram of **2a**.

Crystals of **2c** showed the TLC Rf value of 0.59, which was the same as **2a** and **2b**, and a TGA volatile content of 11.31%, indicating the solvated form of the same substance. The structure was solved by the single crystal X-ray diffraction analysis, showing that the dihydrate **2c** crystallizes in the trigonal *R* -3 space group. Six water molecules were mutually interconnected by hydrogen bonds, forming a hexagon in the chair conformation, which is the most common conformation for a cluster of six water molecules. The R6 motif is usually formed by water molecules related by a centre of symmetry [7]. In **2c**, one water molecule formed the R6 pattern by the -3 symmetry element ($R_6^6(12)$ by the graph-set notation). The water molecule was an acceptor of a hydrogen bond from N2 and a weak one from C4, thus forming a 3D network (Figure 4, Table 1).



(**a**) (**b**)

Figure 4. (**a**) Molecular structure with the atomic numbering scheme; symmetry code (i) 2/3 − x, 1/3 − y, 4/3 − z, and (**b**) packing diagram of **2c** viewed along the *c*-axis. Hydrogen bonds are marked with blue dashed lines.

The molecular structure of 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane consisted of two imidazole groups bounded to the S-atoms of the dithioethyl group (**2a**, **2c**). The imidazole groups were protonated in **2b**. In all three structures, the ethane moiety lied at the centre of symmetry, and thus only half of the molecule was in the asymmetric unit. Therefore, the imidazole groups were parallel. The difference in the three structures was found in the orientation of the imidazole group, i.e., rotation

about the S-C1 bond resulting in different C5-S-C1-N1 torsion angles (−173.8(2)°, −113.4(2)° and 151.8(2)°, in **2a**, **2b** and **2c**, respectively (Figure 5).

Figure 5. Molecule overlay of **2a** (blue), **2b** (magenta) and **2c** (red). Atoms C5 and S and their pairs related by the inversion centre were used for the overlay. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

2.3. *Dehydration Behaviour of Dihydrate 2c and Its Transformation to the Anhydrous Form 2a*

Hydrates are the most common type of solvated organic compounds [8], and understanding their dehydration pathways, as a widespread but not properly understood phenomenon, is critical for designing optimal properties for materials, particularly in the case of pharmaceutical solids [9]. Several schemes for the classification of hydrates have been proposed [10–13], but in general, dehydration results in three types of crystallographic behaviour: a) material where the crystal structure changes (different powder pattern) after dehydration, i.e., as in the present study, contrary to b) material that undergoes only a slight change in crystal structure (related XRPD pattern) after dehydration, like some azithromycin solvates [14], or c) material that becomes amorphous after dehydration, like some other azithromycin solvates [15].

The dehydration process of **2c** had a markedly different crystal structure of the anhydrous form **2a** and has been studied using different experimental techniques. The dihydrate **2c** was heated below the melting point, at around 55 °C and at reduced pressure of 200 mbar to a constant mass. A significant rate of the dehydration process was detected after 30 min by the formation of opaque crystals. The process was completed after 60 min.

DSC measurement of the selected samples showed, after 30 min, endothermic events belonging to the melting of **2c** and **2a**, indicating the coexistence of both forms in the sample (Figure 6, iii), and finally, after 60 min, only a single endothermic event at 90 °C, belonging to the melting of the anhydrous form **2a** (Figure 6, iv). Unfortunately, no sign of recrystallization was detected.

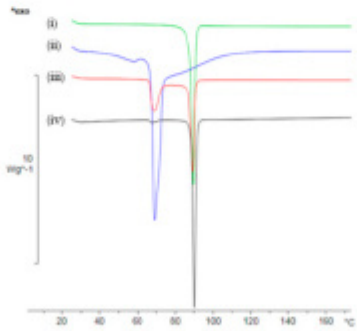


Figure 6. Selected DSC thermograms showing solid state transformation of the dihydrate **2c** to the anhydrous form **2a** recorded under a heating rate of 10 °C/min and N_2 purge in a pierced lid crucible; (i) anhydrous form **2a**; (ii) dihydrate **2c**; (iii) product after heating **2c** at 55 °C/200 mbar for 30 min, and (iv) product after heating **2c** at 55 °C/200 mbar for 60 min.

Finally, the XRPD powder pattern of the dried sample was different from the powder pattern of dihydrate **2c** and identical to the calculated powder pattern of anhydrous **2a** prepared by crystallization (Figure 7), confirming that **2a** is also the final product of dihydrate **2c** dehydration.

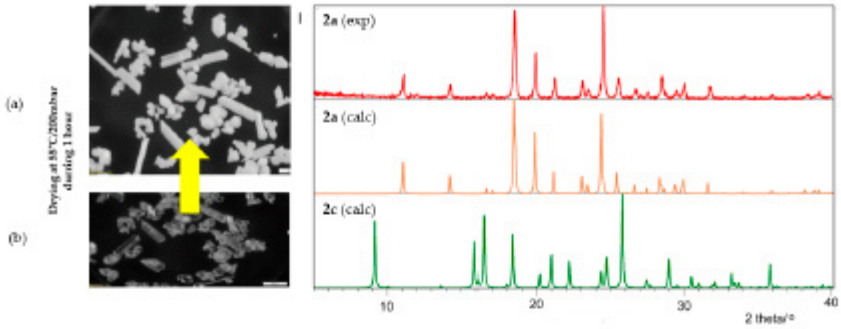


Figure 7. Photomicrographs of: (**a**) anhydrous **2a** after drying of **2c** during 60 min at 55 °C/200mbar; (**b**) starting dihydrate **2c** and the related PXRD patterns.

Additional studies were performed under atmospheric pressure to determine whether dehydration of **2c** to **2a** proceeds via a metastable monohydrate intermediate, as in lisinopril dihydrate [16], or as a hemihydrate, such as ondansetron hydrochloride dihydrate [17].

The TGA thermogram of **2c** showed a single thermal event in the range 40–110 °C with a mass loss of 11.31%, corresponding to the loss of two water molecules. This was in agreement with the DSC thermogram showing only a sharp endothermic event with an onset at 65 °C, corresponding to the melting of **2c**. Additional exothermic processes of recrystallization and endothermic of melting were not detected (Figure 8).

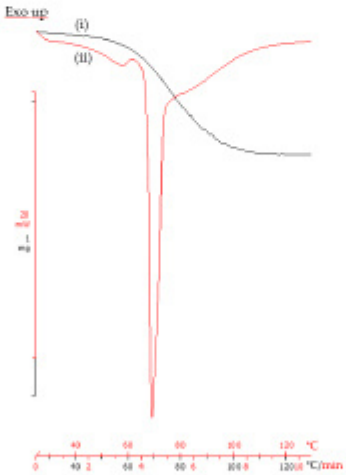


Figure 8. TGA (i) and DSC (ii) analysis of dihydrate **2c** in perforated crucibles under a heating rate of 10 °C/min and N_2 purge.

The changes upon dehydration of **2c** were monitored by the combination of hot stage microscopy (HSM) with DSC at a heating/cooling rate of 10 °C/min (Figure 9). Melting started at 40 °C until completed at around 65 °C (step i). Immediately after the melting point, the melt of **2c** was cooled to room temperature, resulting in a glassy product, and no further crystallisation was observed after prolonged standing. However, if **2c** was heated to 80 °C and immersed in oil during the HSM experiment, followed by cooling, recrystallization of the dihydrate **2c** was observed due to the conditions that inhibited efficient water removal. However, if the sample was heated over melting,

up to 95 °C, in an open pan followed by cooling to room temperature, spontaneous crystallisation occurred, and according to XRPD, the obtained product was a mixture of the dihydrate **2c** and the anhydrous form **2a**.

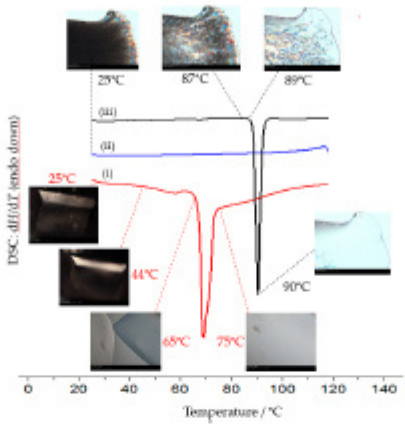


Figure 9. Selected DSC thermograms and HSM micrographs of dihydrate **2c**, recorded using a heating/cooling rate of 10 °C/min with perforated DSC crucibles: (i) dihydrate **2c** heating step up to 120 °C; (ii) cooling step to room temperature, and (iii) heating step of the recrystallized anhydrous form **2a**, i.e., re-run (re-heating) of the sample in the bottom thermogram.

In contrast, when the melt of **2c** was heated to 120 °C and cooled to room temperature, according to the XRPD slow nucleation and growth process of the anhydrous form **2a** occurred after prolonged standing indicating complete dehydration (step ii). In the re-run the sample melting started at 89 °C until completed at around 90 °C (step iii), i.e., at the melting point of the anhydrous form **2a**. However, no additional exothermic and endothermic events or changes in XRPD, which could indicate the formation of potential intermediary monohydrate or hemihydrate phases, were observed.

Dehydration of **2c** in vacuo favours rapid water removal below the melting point, without the appearance of a liquid or melt phase. Removal of water molecules from **2c** under these conditions resulted in the solid-solid rearrangement of the molecules in the crystal lattice, leading to anhydrous **2a**. On the contrary, crystallization of **2a** from the melt of dihydrate **2c** under atmospheric pressure only occurred when all the residual water was removed from the sample (at 120 °C). When a sample of melted **2c** was only heated to 95 °C, concomitant crystallization of **2a** and **2c** was observed, and this was identical to the partial dehydration of **2c** after 30 min under reduced pressure.

Finally, we can conclude that the dehydration at both conditions, i.e., under reduced and atmospheric pressure, proceeds to the anhydrous form **2a** and it is in accordance with the well-known fact that dehydration processes are greatly dependent on the atmospheric environment [11,18].

3. Materials and Methods

3.1. General

Methimazole **1** 99%, Ph Eur quality, was purchased from CU Chemie Ueticon, Lahr, Germany (water content 0.4%), 1,2-dichloroethane (Fisher, Hampton, NH, USA) (water content, 0.02%), dichloromethane (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) acetone (Sigma, St. Louis, MO, USA) (water content, 0.2%), methanol dried (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), water was purified in a house system (Thornton 2000CRS, Mettler Toledo, Colombus, OH, USA) and was of HPLC grade. Dichloromethane was dried under anhydrous sodium sulphate and distilled prior to use. All other used chemicals were of analytical grade. pH measurements were performed using Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)

Seven Multi pH meter, and prior to measurement, it was calibrated in six points. Ionic chromatography measurements were performed on Thermo (Waltham, MA, USA) ionic chromatography using LC chlorine standard. HPLC analysis was performed on an Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) HPLC instrument under gradient elution at a flow rate of 0.6 mL/min using mobile phase A (ammonium acetate, Merck KGaA, Darmstadt, Germany buffer) and mobile phase B (acetonitrile, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at the Zorbax C18 column. The effluent was monitored using the Agilent DAD/UV detector. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker (Billerica, MA, USA) Advance 600 and 150, respectively, with DMSO-*d6* or D_2O as a solvent. Mass spectra were recorded on an Agilent 6550 iFunnel quadrupole time-of-flight mass spectrometer equipped with dual AJS ESI source (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Hot stage microscopy was carried out using an Olympus (Shinjuku City, Tokyo, Japan) BX51 microscope combined with a Linkam THMS 600 hot stage (Linkam Scientific Instruments, Waterfield, UK) and a digital camera (QImaging, Surrey, Canada) for image capture. A small amount of the sample was placed onto a glass slide and viewed with 100x magnification and partially polarised light. It was simultaneously being heated from ambient temperature at a rate of 10 °C/min. Thermal analysis was performed using a Mettler DSC 1 instrument (Mettler Toledo, Greifensee, Swizerland) in aluminium pans with a pierced lid at a heating rate of 10 °C/min under the inert nitrogen atmosphere with a flow rate of 55 mL/min. Temperature calibration was performed using the indium metal standard. TGA data were collected on a Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland)) TGA/SDTA 851e system. The sample was loaded onto a pre-tared alumina crucible and was heated at a heating rate 10 °C/min over the temperature range 25–300 °C. A nitrogen purge at 50 mL/min was maintained over the sample. The instrument was temperature calibrated using certified $NiMn_3Al$ and nickel. All weighing operations were carried using Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland)) balance, daily calibrated according to the internal program.

3.2. Synthesis of 1,2-Bis[(1-methyl-1H-imidazole-2-yl)thio]ethane Dihydrochloride Tetrahydrate (2b)

Method (A) Methimazole (100 mg, 0.87 mmol) was dissolved in 10 mL of 1,2-dichloroethane. The solution was left without stirring for 15 days in the dark at room temperature in a humidity non-controlled environment. The precipitated product was collected using vacuum suction and rinsed few times with cold 1,2-dichloroethane, yielding 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane dihydrochloride tetrahydrate (**2b**, 53 mg, 31%) in the form of colourless plate shape crystals. Melting point (DSC, onset): 208 °C, MS-QTOF: $[M+H-2HCl]^+$ 255.0743, [M-2HCl] 254.066, $C_{10}H_{14}N_4S_2$. ^{1}H NMR (D_2O, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H), 3.82, H-C4 (d, 2H) 7.46, J = 2.1 Hz, H-C5 (d, 2H) 7.50, J = 2.1 Hz, S-CH_2 (s, 4H) 3.26. ^{13}C NMR (D_2O, 151 MHz/ppm): N-CH_3 35.22, C4 120.98, C5 125.70, C2 138.52, S-CH_2 34.59, Purity (HPLC): 98%, RRT: 20.518. Ionic chromatography: experimentally determined percentage of Cl ions (19%) corresponded to the theoretical value (18%) within the experimental error. The structure of **2b** was confirmed by single crystal X-ray diffraction analysis.

Method (B) Methimazole (100 mg, 0.87 mmol) was dissolved in 10 mL of 1,2-dichloroethane. The solution was left without stirring for 15 days in daylight and room temperature in a humidity non-controlled environment. The precipitated product was collected using vacuum suction and rinsed a few times with cold 1,2-dichloroethane, yielding dihydrochloride tetrahydrate **2b** (52 mg, 30%) in the form of colourless plate shaped crystals. Melting point (DSC, onset): 208 °C. The NMR spectra and XRPD diffractogram of the prepared sample were identical to the spectra and diffractogram of the **2b** sample obtained by Method A.

3.3. Synthesis of Anhydrous 1,2-Bis[(1-methyl-1H-imidazole-2-yl)thio]ethane (2a)

Method (A) Dihydrochloride tetrahydrate **2b** (300 mg) was dissolved in 30 mL of water and neutralized with 1M Na_2CO_3 to pH 7.0, followed by extraction with dichloromethane (3 × 10 mL), washed with brine and dried with anhydrous Na_2SO_4. Evaporation of the solvent in vacuo to dryness yielded crude 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane (**2a**, 160 mg, 84%) in a form of white powder. Recrystallization of dry crude **2a** from dry dichloromethane under low humidity conditions

gave pure anhydrous **2a**. Melting point (DSC, onset): 89 °C (lit: 88-90 °C) [5], ^{1}H NMR (DMSO-*d6*, 600 MHz/ppm): N-CH_3 (s, 6H) 3.57, H-C4 (d, 2H) 7.24 J = 1.2 Hz, H-C5 (d, 2H) 6.94 J = 1.2 Hz, S-CH_2 (s, 4H) 3.21; ^{13}C NMR (DMSO-*d6*, 151 MHz/ppm): N-CH_3 32.79, C4 123.29, C5 128.53, C2 139.23, S-CH_2 33.30. The structure of **2a** was confirmed by single crystal X-ray diffraction analysis.

Method (B) Dihydrate **2c** (100 mg) was dried under reduced pressure of 200 mbar at 55 °C for 60 min and anhydrous form **2a** (71 mg, 81%) was obtained. DSC thermogram and XRPD diffractogram of the obtained sample were identical to the thermogram and diffractogram of the **2a** sample obtained by Method A.

3.4. Synthesis of 1,2-Bis[(1-methyl-1H-imidazole-2-yl)thio]ethane Dihydrate (2c)

Method (A) Crude **2a** obtained by neutralization of dihydrochloride tetrahydrate **2b** (160 mg) was dissolved in an acetone/water mixture (1:1). After prolonged standing of the solution without stirring at room temperature, crystals of the pure dihydrate form **2c** (133 mg, 73%) were obtained. Melting point (DSC, onset, 65 °C). Structure of **2c** was confirmed by the single crystal X-ray diffraction analysis.

Method (B) Pure anhydrous form **2a** (300 mg) was dissolved in an acetone/water mixture (1:1). After prolonged standing of the solution without stirring at room temperature, pure crystals of the dihydrate form **2c** (238 mg, 70%) were obtained. DSC thermogram and XRPD diffractogram of the so obtained sample were identical to the thermogram and diffractogram of the **2c** sample obtained by Method A.

3.5. Powder X-ray Diffraction

X-ray powder diffraction (XRPD) data were collected at room temperature using copper Kα radiation on a PANalytical X'Pert Pro powder diffractometer model PW3050/60 (PANalytical, Almelo, The Netherland) in Bragg-Brentano geometry equipped with a X'celerator detector. The sample was prepared by mounting a sample on a wafer (zero background) plate and scanned from 3 to 40° 2θ using the following acquisition parameters: generator tension 45 kV, generator current 40 mA, step size 0.0167°, scan speed 0.011°/second, number of steps 2214 and total collection time 60 min, scan speed 0.05°/second, number of steps 2214 and total collection time 13 min.

3.6. Single Crystal X-ray Diffraction Analysis and Structure Determination

Suitable single crystals were selected and mounted in air onto thin glass fibres. Diffraction data of **2b** and **2c** were collected at room temperature, while data from the anhydrous form **2a** were collected at 150 K on an Oxford Diffraction Xcalibur four-circle kappa geometry diffractometer with Xcalibur Sapphire 3 CCD detector, using graphite monochromated MoKα (λ = 0.71073 Å) radiation.

The essential crystallographic data from the solid forms **2a**, **2b** and **2c** are presented in Table 2.

Data reduction, correction for the Lorentz-polarization factor, scaling and multi-scan absorption correction was performed using the CrysAlisPro software package [19]. Solution, refinement and analysis of the structures were done using the programs integrated in the WinGX system [20]. The structures were solved by direct methods implemented in SHELXS [21,22]. Refinement by the full-matrix least-squares methods, based on F^2 against all reflections, was performed by SHELXL [21,22], including anisotropic displacement parameters for all non-H atoms. Hydrogen atoms bound to C and N (in **2b**) atoms were modelled by the riding model using the AFIX routine, while those bound to water oxygen atoms were located in the difference Fourier maps and refined isotropically. Analysis of the molecular geometry and hydrogen bonds was performed by PLATON [23]. The molecular graphics were done with MERCURY (Version 4.1.0) [24]. The crystal parameters, data collection and refinement results are summarized in Table 2. CCDC deposition numbers 2013658 (**2a**), 2013659 (**2b**) and 2013660 (**2c**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; Fax: +44 1223 336033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)

Table 2. Essential crystallographic data for **2a**, **2b** and **2c**.

Compound	2a	2b	2c
Chemical formula	$C_{10}H_{14}N_4S_2$	$[C_{10}H_{16}N_4S_2]Cl_2{\cdot}4(H_2O)$	$C_{10}H_{14}N_4S_2{\cdot}2(H_2O)$
Formula weight	254.37	399.35	290.40
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Trigonal
Space group	$P\,2_1/c$	$P\,2_1/c$	R–3
a/Å	4.7035 (7)	11.1667 (10)	19.3142 (13)
b/Å	12.3772 (14)	7.7629 (7)	19.3142 (13)
c/Å	10.3316 (11)	11.8970 (13)	10.3283 (5)
α/°	90	90	90
β/°	92.772 (14)	109.637 (11)	90
γ/°	90	90	180
Z	2	2	9
F (000)	268	420	1386
T/K	150	292	292
V/Å^3	600.76 (13)	971.32 (18)	3336.75 (5)
D_x /g.cm^3	1.406	1.365	1.301
S	0.933	0.900	1.047
R	0.0493	0.049	0.0398
wR (F^2)	0.1063	0.1272	0.0994
No. of reflections	972	2329	1448
CCDC	2013658	2013659	2013660

4. Conclusions

The presented research confirmed the great reactivity of methimazole in the 1,2-dichloroethane solution under mild conditions, leading to its spontaneous *S*-bis alkylation to 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane in the form of dihydrochloride tetrahydrate (**2b**). Therefore, the use of 1,2-dichloroetane should be avoided when working with methimazole. Dihydrochloride tetrahydrate 2b, anhydrous **2a**, and dihydrate **2c** crystal forms were prepared and their structures were confirmed by the single crystal X-ray diffraction analysis. Dehydration process of the dihydrate **2c**, studied using complementary solid-state techniques, led to the formation of the anhydrous product **2a**, which was identical to the one obtained by crystallization. No intermediate monohydrate or hemihydrate phases were detected.

Author Contributions: Conceptualization, L.Š. and M.D.; investigation, L.Š., D.M.-Č., D.F.; data curation, L.Š., D.M.-Č., and M.D.; writing—original draft preparation L.Š. and M.D.; writing-review and editing L.Š., D.M.-Č., D.F. and M.D.; supervision M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors appreciate Lara Saftić Martinović (U. of Rijeka, Department for Biotechnology) for recording HR-MS spectra and deep discussion, Ivica Đilović (U. of Zagreb, Faculty of Science, Department of Chemistry) for single crystal data collection of 2a and Ana Čikoš (Institute Ruđer Bošković, Center for NMR, Zagreb) for recording NMR spectra and deep discussion.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

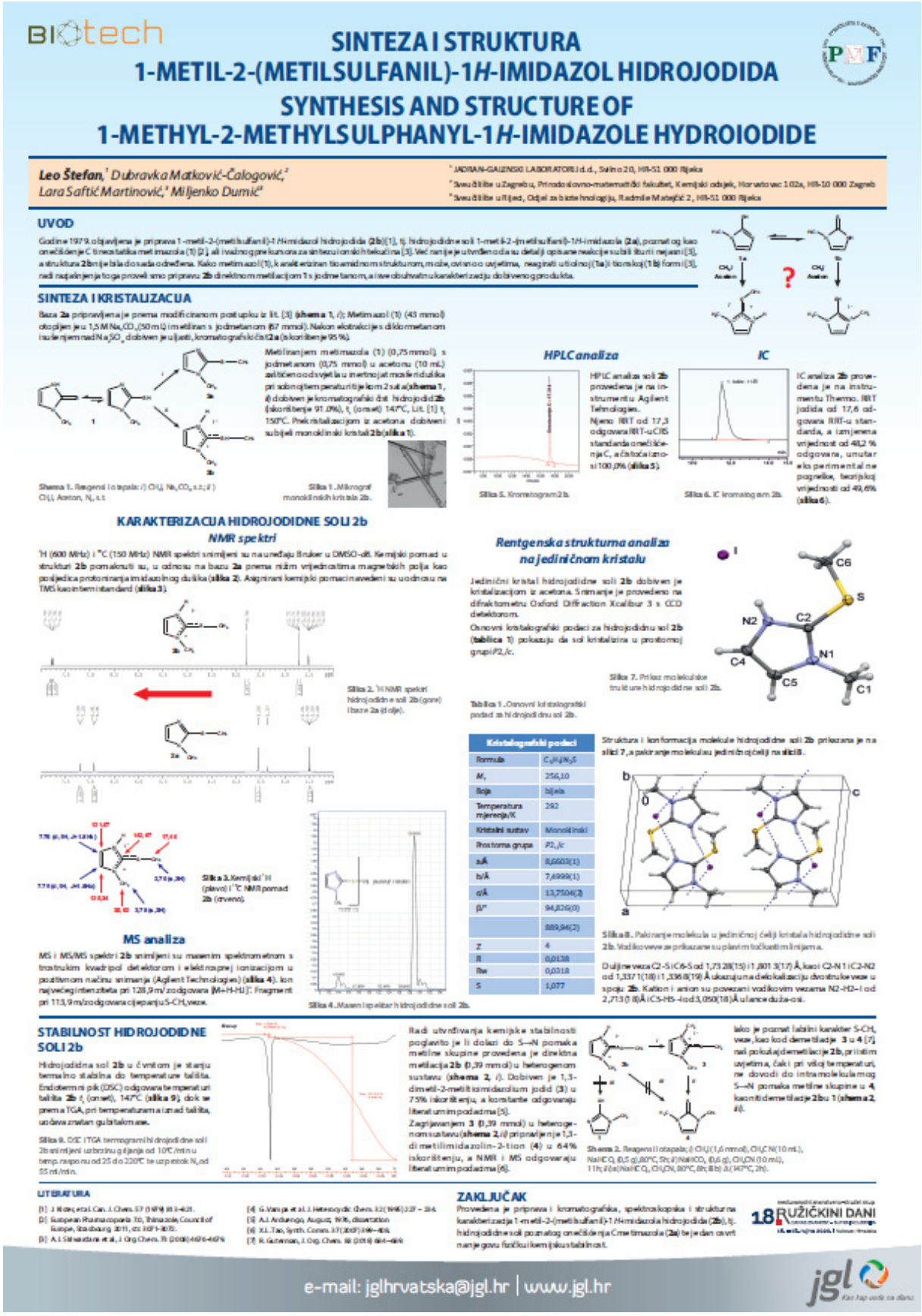
References

1. Aboul-Enein, H.Y.; Al-Badr, A.A. Analytical Profile of Methimazole. In *Analytical Profiles of Drug Substances*; Florey, K., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1979; Volume 8, pp. 351–370.
2. Qingjian, L.; Mingli, S. Synthesis of noncyclic crown ethers with methimazole heterocycle as a terminal group. *Youji Huaxue* **1992**, *12*, 509–513.
3. Qingjian, L.; Mingli, S.; Chongqiu, J.; Fengling, L. Syntheses and coordination properties of bridged bis(methimazole) compounds. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* **1992**, *13*, 328–331.
4. Silva, R.M.; Smith, M.D.; Gardinier, J.R. Unexpected New Chemistry of the Bis(thioimidazolyl)methanes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8755–8763. [CrossRef] [PubMed]

5. Hassanaly, P.; Dou, H.J.M.; Metzger, J.; Assef, G.; Kister, J.S. Alkylation of 2-Thioxo-2,3-dihydroimidazole and its 1-Methyl Derivative under Phase-Transfer Conditions. *Synthesis* **1997**, *4*, 253–254.
6. Pilaniya, K.; Chandrawanshi, H.K.; Pilaniya, U.; Manchandani, P.; Jain, P.; Singh, N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2010**, *1*, 302–310.
7. Infantes, L.; Motherwell, S. Water clusters in organic molecular crystals. *Cryst. Eng. Comm.* **2002**, *4*, 454–461. [CrossRef]
8. Aaltonen, J.; Allesø, M.; Mirza, S.; Koradia, V.; Gordon, K.C.; Rantanen, J. Solid form screening—A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 23–37. [CrossRef]
9. Larsen, A.S.; Ruggiero, M.T.; Johansson, K.E.; Zeitler, J.A.; Rantanen, J. Tracking Dehydration Mechanisms in Crystalline Hydrates with Molecular Dynamics Simulations. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 5017–5022. [CrossRef]
10. Galwey, A.K. Structure and order in thermal dehydration of crystalline solids. *Thermochim. Acta* **2000**, *355*, 181–238. [CrossRef]
11. Petit, S.; Coquerel, G. Mechanism of Several Solid–Solid Transformations between Dihydrated and Anhydrous Copper (II) 8-Hydroxyquinolinates. Proposition for a Unified Model for the Dehydration of Molecular Crystals. *Chem. Mater.* **1996**, 2247–2258. [CrossRef]
12. Morris, K.R. Structural Aspects of Hydrates and Solvates. In *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Brittain, H.G., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, USA, 1999; pp. 125–182.
13. Mimura, H.; Kitamura, S.; Kitagawa, T.; Kohda, S. Characterization of the non-stoichiometric and isomorphic hydration and solvation in FK041 clathrate. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *26*, 397–406. [CrossRef]
14. Dumić, M.; Vinković, M.; Orešić, M.; Meštrović, E.; Danilovski, A.; Dumbović, A.; Kneževič, Z.; Lazarevski, G.; Filič, D.; Cinčič, D.; et al. Isostructural Pseudopolymorphs of 9-Deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerithromycin A. U.S. 7,569,549 B2, 4 August 2009.
15. Dumić, M.; Vinković, M.; Orešić, M.; Meštrović, E.; Danilovski, A.; Dumbović, A.; Kneževič, Z.; Lazarevski, G.; Filič, D.; Cinčič, D.; et al. Novel Amorphous 9-Deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerithromycin A, Process for Preparing the Same, and Uses Thereof. U.S. 6,936,591 B2, 30 August 2005.
16. Fujii, K.; Uekusa, H.; Itoda, N.; Yonemochi, E.; Terada, K. Mechanism of Dehydration–Hydration Processes of Lisinopril Dihydrate Investigated by ab Initio Powder X-ray Diffraction Analysis. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 6165–6172. [CrossRef]
17. Mizoguchi, R.; Uekusa, H. Elucidating the Dehydration Mechanism of Ondansetron Hydrochloride Dihydrate with a Crystal Structure. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18*, 6142–6149. [CrossRef]
18. Byrn, S.R.; Pfeiffer, R.R.; Stowell, J.G. *Solid-State Chemistry of Drugs*, 2nd ed.; SSCI Inc.: West Lafayette, IN, USA, 1999; p. 292.
19. *CrysAlisPro Software System*, version 1.171.39.46; Rigaku Oxford Diffraction: Oxford, UK, 2018.
20. Farrugia, L.J. WinGX and ORTEP for Windows: An update. *J. Appl. Cryst.* **2012**, *45*, 849–854. [CrossRef]
21. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst.* **2008**, *64*, 112–122. [CrossRef] [PubMed]
22. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Cryst.* **2015**, *71*, 3–8.
23. Spek, A.L. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Cryst.* **2009**, *65*, 148–155. [CrossRef] [PubMed]
24. Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; Van De Streek, J.; Wood, P.A. *Mercury CSD 2.0*—New features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Cryst.* **2008**, *41*, 466–470. [CrossRef]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

L. Štefan, D. Matković-Čalogović, L. Saftić Martinović, M. Dumić, Sinteza i struktura 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-imidazol hidrojodida. Knjiga sažetaka 18. Ružičkinih dana, Jukić Ante (ur.), 2020. p55, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).



BIOtech

SINTEZA I STRUKTURA 1-METIL-2-(METILSULFANIL)-1*H*-IMIDAZOL HIDROJODIDA

SYNTHESIS AND STRUCTURE OF 1-METHYL-2-METHYLSULPHANYL-1*H*-IMIDAZOLE HYDROIODIDE

PMF

Leo Štefan,[1] Dubravka Matković-Čalogović,[2] Lara Saftić Martinović,[3] Miljenko Dumić[4]

[1] JADRAN-GALENSKI LABORATORIJ d.d., Svilno 20, HR-51 000 Rijeka
[2] Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Horvatovac 102a, HR-10 000 Zagreb
[3] Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Radmile Matejčić 2, HR-51 000 Rijeka

UVOD

Godine 1979. objavljena je priprava 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-imidazol hidrojodida (**2b**) ([1]), tj. hidrojodidne soli 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-imidazola (**2a**), poznatog kao onečišćenje C tiroastatika metimazola (**1**) ([2]), ali i vrlo upotrebljivog za sintezu ionskih tekućina ([3]). Već ranije je utvrđeno da su detalji opisane reakcije sublimiti nejasni ([3]), a struktura **2b** nije bila do sada određena. Kako metimazol (**1**), kao ekvivalentan tioamidnom strukturom, može, ovisno o uvjetima, reagirati u tiolnoj (**1a**) i tionskoj (**1b**) formi ([3]), nad navedenim je toga proveli smo pripravu **2b** direktnom metilacijom **1** s jodmetanom, a i sve obuhvatnu karakterizaciju dobivenog produkta.

SINTEZA I KRISTALIZACIJA

Baza **2a** pripravljena je prema modificiranom postupku iz lit. ([3]) (**shema 1**, *i*); Metimazol (**1**) (43 mmol) otopljen je u 1,5 M Na_2CO_3 (50 mL) i metilan s jodmetanom (67 mmol). Nakon ekstakcije s diklormetanom i sušenjem nad Na_2SO_4 dobiven je uljasti, kromatografski čist **2a** (iskorištenje 95 %).

Metilanjem metimazola (**1**) (0,75 mmol), s jodmetanom (0,75 mmol) u acetonu (10 mL) zaštićen od svjetla u inertnoj atmosferi dušika pri sobnoj temperaturi tijekom 2 sata (**shema 1**, *ii*) dobiven je kromatografski čist hidrojodid **2b** (iskorištenje 91,0%), t$_r$ (onset) 147°C, Lit. [1] t$_r$ 150°C. Prekristalizacijom iz acetona dobiveni su bijeli monokliniski kristali **2b** (**slika 1**).

Shema 1. Reagensi i otapala: *i*) CH_3I, Na_2CO_3, s.t.; *ii*) CH_3I, Aceton, N_2, s.t.

Slika 1. Mikrograf monokliniskih kristala **2b**.

HPLC analiza

Slika 5. Kromatogram **2b**.

HPLC analiza soli **2b** provedena je na instrumentu Agilent Technologies. Njeno RRT od 17,3 odgovara RRT-u CRS standarda onečišćenja C, a čistoća iznosi 100,0% (**slika 5**).

IC

Slika 6. IC kromatogram **2b**.

IC analiza **2b** provedena je na instrumentu Thermo. RRT jodida od 17,6 odgovara RRT-u standarda, a izmjerena vrijednost od 48,2 % odgovara, unutar eksperimentalne pogreške, teorijskoj vrijednosti od 49,6% (**slika 6**).

KARAKTERIZACIJA HIDROJODIDNE SOLI 2b

NMR spektri

^{1}H (600 MHz) i ^{13}C (150 MHz) NMR spektri snimljeni su na uređaju Bruker u DMSO-d_6. Kemijski pomak u strukturi **2b** pomaknuti su, u odnosu na bazu **2a** prema nižim vrijednostima magnetskog polja kao posljedica protoniranja imidazolnog dušika (**slika 2**). Asignirani kemijski pomaci navedeni su u odnosu na TMS kao internistandard (**slika 3**).

Slika 2. ^{1}H NMR spektri hidrojodidne soli **2b** (gore) i baze **2a** (dolje).

Slika 3. Kemijski ^{1}H (plavo) i ^{13}C NMR pomak **2b** (crveno).

MS analiza

MS i MS/MS spektri **2b** snimljeni su masenim spektrometrom s trostrukim kvadripol detektorom i elektrosprej ionizacijom u pozitivnom načinu snimanja (Agilent Technologies) (**slika 4**). Ion najvećeg intenziteta pri 128,9 m/z odgovara $[M+H-HI]^+$. Fragment pri 113,9 m/z odgovara cijepanju S-CH_3 veze.

Slika 4. Maseni spektar hidrojodidne soli **2b**.

Rentgenska strukturna analiza na jediničnom kristalu

Jedinični kristal hidrojodidne soli **2b** dobiven je kristalizacijom iz acetona. Snimanje je provedeno na difraktometru Oxford Diffraction Xcalibur 3 s CCD detektorom.

Osnovni kristalografski podaci za hidrojodidnu sol **2b** (**tablica 1**) pokazuju da sol kristalizira u prostornoj grupi *P*2$_1$/*c*.

Slika 7. Prikaz molekulske strukture hidrojodidne soli **2b**.

Tablica 1. Osnovni kristalografski podaci za hidrojodidnu sol **2b**.

Kristalografski podaci	
Formula	$C_6H_9N_2S$
M_r	256,10
Boja	bijela
Temperatura mjerenja/K	292
Kristalni sustav	Monokliniski
Prostorna grupa	$P2_1/c$
a/Å	8,6603(1)
b/Å	7,4999(1)
c/Å	13,7504(2)
β/°	94,826(0)
	889,94(2)
Z	4
R	0,0138
Rw	0,0318
S	1,077

Struktura i konformacija molekule hidrojodidne soli **2b** prikazana je na slici 7, a pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji na slici 8.

Slika 8. Pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji kristala hidrojodidne soli **2b**. Vodikove veze prikazane su plavim točkastim linijama.

Duljine veza C2–S i C6–S od 1,7328(15) i 1,8013(17) Å, kao i C2–N1 i C2–N2 od 1,3371(18) i 1,3368(19) Å ukazuju na delokalizaciju dvostrukih veza u spoju **2b**. Kation i anion su povezani vodikovim vezama N2–H2···I od 2,7130(8) Å i C5–H5···I od 3,050(18) Å u lance duž *a*-osi.

STABILNOST HIDROJODIDNE SOLI 2b

Hidrojodidna sol **2b** u čvrstom je stanju termalno stabilna do temperature tališta. Endotermni pik (DSC) odgovara temperaturi tališta **2b** t$_r$ (onset), 147°C (**slika 9**), dok se prema TGA, pri temperaturama iznad tališta, uočava znatan gubitak mase.

Slika 9. DSC i TGA termogrami hidrojodidne soli **2b** snimljeni uz brzinu grijanja od 10°C/min u temp. rasponu od 25 do 220°C te uz protok N_2 od 55 mL/min.

Radi utvrđivanja kemijske stabilnosti poglavito je li dolazi do S→N pomaka metilne skupine provedena je direktna metilacija **2b** (0,39 mmol) u heterogenom sustavu (**shema 2**, *i*). Dobiven je 1,3-dimetil-2-metiliskimidazolium jodid (**3**) u 75% iskorištenju, a konstante odgovarajuću literaturnim podacima ([5]).

Zagrijavanjem **3** (0,39 mmol) u heterogenom sustavu (**shema 2**, *ii*) pripravljeno je 1,3-dimetilimidazolin-2-tion (**4**) u 64% iskorištenju, a NMR i MS odgovarajuću literaturnim podacima ([6]).

Shema 2. Reagensi i otapala: *i*) CH_3I (1,6 mmol), CH_3CN (10 mL), $NaHCO_3$ (0,5 g), 80°C, 5h; *ii*) $NaHCO_3$ (0,6 g), CH_3CN (10 mL), 11h; *iii*) a) $NaHCO_3$, CH_3CN, 80°C, 8h; b) Δ (147°C, 2h).

Iako je poznat labilni karakter S-CH_3 veze, kao kod demetilacije **3** u **4** ([7]), nisi pokušaj demetilacije **2b**, pri istim uvjetima, čak i pri višoj temperaturi, ne dovodi do intramolekularnog S→N pomaka metilne skupine u **4**, kao u slučaju demetilacije **2b** u **1** (**shema 2**, *ii*).

LITERATURA

[1] J. Klose, et al. Can. J. Chem. 57 (1979) 1613–1621.
[2] European Pharmacopoeia 7.0, 7th ed. 2010, Council of Europe, Strasbourg, 2011, str. 1677–1678.
[3] A. L. Simeonov et al., J. Org. Chem. 73 (2008) 4676–4679.
[4] G. Vasiljeva et al. J. Heterocyclic Chem. 33 (1996) 227 – 234.
[5] A.J. Arduengo, August, 1996, dissertation.
[6] X.L. Tao, Synth. Comm. 37 (2007) 399–406.
[7] R. Gutzman, J. Org. Chem. 80 (2015) 6147–6151.

ZAKLJUČAK

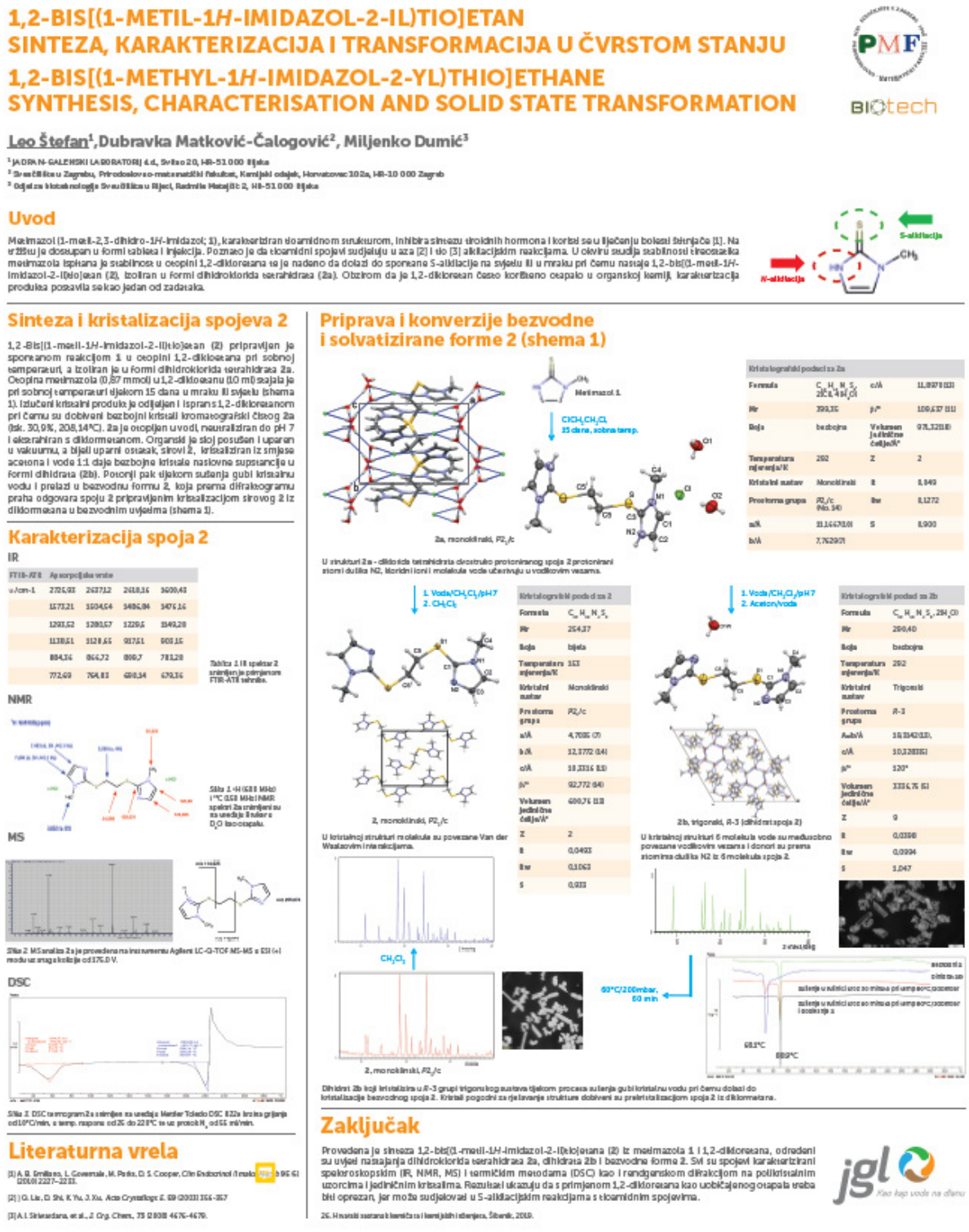
Provedena je priprava i kromatografska, spektroskopska i strukturna karakterizacija 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-imidazola hidrojodida (**2b**), tj. hidrojodidne soli poznatog onečišćenja C metimazola (**2a**) te je dan osvrt na njegovu fizičku i kemijsku stabilnost.

18. RUŽIČKINI DANI

e-mail: jglhrvatska@jgl.hr | www.jgl.hr

jgl

L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, 1,2-Bis[(1-metil-1-*H*-imidazol-2-il)tio]etan Sinteza, karakterizacija i transformacija u čvrstom stanju. Knjiga sažetaka 26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Galić Nives (ur), 2019, p108, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).



1,2-BIS[(1-METIL-1*H*-IMIDAZOL-2-IL)TIO]ETAN
SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I TRANSFORMACIJA U ČVRSTOM STANJU
1,2-BIS[(1-METHYL-1*H*-IMIDAZOL-2-YL)THIO]ETHANE
SYNTHESIS, CHARACTERISATION AND SOLID STATE TRANSFORMATION

Leo Štefan[1], Dubravka Matković-Čalogović[2], Miljenko Dumić[3]

[1] JADRAN-GALENSKI LABORATORIJ d.d., Svilno 20, HR-51 000 Rijeka
[2] Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odjelk, Horvatovac 102a, HR-10 000 Zagreb
[3] Odjel za biotehnologije Sveučilišta u Rijeci, Radmile Matejčić 2, HR-51 000 Rijeka

Uvod

Metimazol (1-metil-2,3-dihidro-1*H*-imidazol; 1), karakteriziran sloamidnom strukturom, inhibira sintezu tiroidnih hormona i koristi se u liječenju bolesti štitnjače [1]. Na tržištu je dostupan u formi tableta i injekcija. Poznato je da sloamidni spojevi sudjeluju u aza [2] i dio [3] alkilacijskim reakcijama. U okviru studija stabilnosti tioostaklo metimazola ispitana je stabilnost u otopini 1,2-dikloretana te je nađeno da dolazi do spontane S-alkilacije na svjetlu ili u mraku pri čemu nastaje 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (2), izoliran u formi dihidrokloridda serahidrata (2a). Otkrićem da je 1,2-dikloretan često korišteno otapalo u organskoj kemiji, karakterizacija produkta postavila se kao jedan od zadataka.

S-alkilacija
N-alkilacija

Sinteza i kristalizacija spojeva 2

1,2-Bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etan (2) pripravljen je spontanom reakcijom 1 u otopini 1,2-dikloretana pri sobnoj temperaturi, a izoliran je u formi dihidrokloridda serahidrata 2a. Otopina metimazola (0,87 mmol) u 1,2-dikloretanu (10 ml) stajala je pri sobnoj temperaturi tijekom 15 dana u mraku ili svjetlu (shema 1). Izučeni kristalni produkt je odijeljen i isprani 1,2-dikloretanom pri čemu su dobiveni bezbojni kristali kromatografski čistog 2a (tsk. 30,9%, 208,14°C). 2a je otopljen u vodi, neutraliziran do pH 7 i ekstrahiran s diklormetanom. Organski je sloj posušen i uparen u vakuumu, a bijeli uparni ostatak, sirovi 2, kristaliziran iz smjese acetona i vode 1:1 daje bezbojne kristale naslovne supstancije u formi dihidrata (2b). Poznati pak tijekom sušenja gubi kristalnu vodu i prelazi u bezvodnu formu 2, koja prema difrakogramu praha odgovara spoju 2 pripravljenim kristalizacijom sirovog 2 iz diklormetana u bezvodnim uvjetima (shema 1).

Karakterizacija spoja 2

IR

FTIR-ATR	Apsorpcijske vrpce			
ν/cm-1	2726,93	2637,12	2418,16	3600,43
	1573,21	1504,64	1486,84	1476,16
	1293,52	1280,57	1229,6	1149,28
	1138,61	1128,66	917,51	903,16
	884,16	866,72	809,7	783,28
	772,69	764,83	698,34	679,34

Tablica 2. IR spektar 2 snimljen je pomoću FTIR-ATR tehnike.

NMR

Slika 1. ^{1}H (600 MHz) i ^{13}C (150 MHz) NMR spektri 2a snimljeni su na uređaju Bruker u D_2O kao otapalu.

MS

Slika 2. MS analiza 2a je provedena na instrumentu Agilent LC-Q-TOF MS-MS u ESI (+) modu uz snagu kolizije od 175.0 V.

DSC

Slika 3. DSC termogram 2a snimljen na uređaju Mettler Toledo DSC 822e kroz kroz grijanje od 10°C/min. u temp. rasponu od 25 do 220°C u uz protok N_2 od 50 ml/min.

Literaturna vrela

[1] A. B. Emiliano, L. Governale, M. Parks, D. S. Cooper, Clin Endocrinol (Oxford) 2006 (6) 2227–2233.

[2] Q. Liu, D. Shi, K. Yu, J. Xia, Acta Crystallogr. E. 69 (2013) 356–357

[3] A. I. Stiteodara, et al., J. Org. Chem. 78 (2013) 4676–4679.

Priprava i konverzije bezvodne i solvatizirane forme 2 (shema 1)

Metimazol 1.

$CHCl_3/CH_2Cl_2$
35 dana, sobna temp.

2a, monoklinski, $P2_1/c$

U strukturi 2a - dihidrida tetrahidrata dicetrukto protoniranog spoja 2 protonirani atomi dušika N2, kloridni ioni i molekule vode učestvuju u vodikovim vezama.

Kristalografski podaci za 2a			
Formula	$C_{10}H_{18}N_4S_2$ $2Cl, 4H_2O$	c/Å	11,8978(13)
Mr	399,35	β/°	109,637 (11)
Boja	bezbojna	Volumen jedinične ćelije/Å³	976,32(18)
Temperatura mjerenja/K	292	Z	2
Kristalni sustav	Monoklinski	R	0,049
Prostorna grupa	$P2_1/c$ (No. 14)	Rw	0,1272
a/Å	11,1447(10)	S	0,900
b/Å	7,7629(7)		

1. Voda/CH_2Cl_2/pH7
2. CH_2Cl_2

2, monoklinski, $P2_1/c$

U kristalnoj strukturi molekule su povezane Van der Waalsovim interakcijama.

Kristalografski podaci za 2	
Formula	$C_{10}H_{18}N_4S_2$
Mr	254,37
Boja	bijela
Temperatura mjerenja/K	153
Kristalni sustav	Monoklinski
Prostorna grupa	$P2_1/c$
a/Å	4,7035 (7)
b/Å	12,7772 (14)
c/Å	18,2336 (13)
β/°	92,772 (14)
Volumen jedinične ćelije/Å³	690,76 (13)
Z	2
R	0,0493
Rw	0,1063
S	0,933

1. Voda/CH_2Cl_2/pH7
2. Aceton/voda

2b, trigonski, *R*-3 (dihidrat spoja 2)

U kristalnoj strukturi 6 molekula vode su međusobno povezane vodikovim vezama i donori su prema simetrijama dušika N2 iz 6 molekula spoja 2.

Kristalografski podaci za 2b	
Formula	$C_{10}H_{18}N_4S_2 \cdot 2H_2O$
Mr	290,40
Boja	bezbojna
Temperatura mjerenja/K	292
Kristalni sustav	Trigonski
Prostorna grupa	*R*-3
a=b/Å	18,3342(13),
c/Å	10,2281(6)
γ/°	120°
Volumen jedinične ćelije/Å³	3336,75 (5)
Z	9
R	0,0358
Rw	0,0994
S	1,047

CH_2Cl_2

2, monoklinski, $P2_1/c$

60°C/200mbar, 60 min

Dihidrat 2b koji kristalizira u *R*-3 grupi trigonalnog sustava tijekom procesa sušenja gubi kristalnu vodu pri čemu dolazi do kristalizacije bezvodnog spoja 2. Kristali pogodni za rješavanje strukture dobiveni su prekristalizacijom spoja 2 iz diklormetana.

Zaključak

Provedena je sinteza 1,2-bis[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tio]etana (2) iz metimazola 1 i 1,2-dikloretana, određeni su uvjeti nastajanja dihidrokloridda serahidrata 2a, dihidrata 2b i bezvodne forme 2. Svi su spojevi karakterizirani spektroskopskim (IR, NMR, MS) i termičkim metodama (DSC) kao i rendgenskom difrakcijom na polikristalnim uzorcima i jediničnim kristalima. Rezultati ukazuju da s primjenom 1,2-dikloretana kao uobičajenog otapala treba biti oprezan, jer može sudjelovati u S-alkilacijskim reakcijama s sloamidnim spojevima.

26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, 2019.

L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, Solvent mediated alkylation of methimazole with 1,2 dichloroethane. Book of abstacts 18 Blue Danube symposium on heterocyclic chemistry, Brodnik Žugelj, Kranjc, Krištof (ur.), 2019. p80, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

SOLVENT MEDIATED ALKYLATION OF METHIMAZOLE WITH 1,2-DICHLOROETHANE

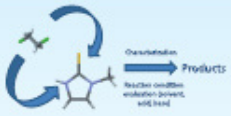
Leo Štefan,[1] Dubravka Matković-Čalogović,[2] Miljenko Dumić[3]

[1] JGL d.d., Jadran Galenski Laboratorij, Svilno 20, 51000 Rijeka, Croatia
[2] U. of Zagreb, Faculty of Science, Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Croatia
[3] Department of Biotechnology, U. of Rijeka, Ulica Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Croatia

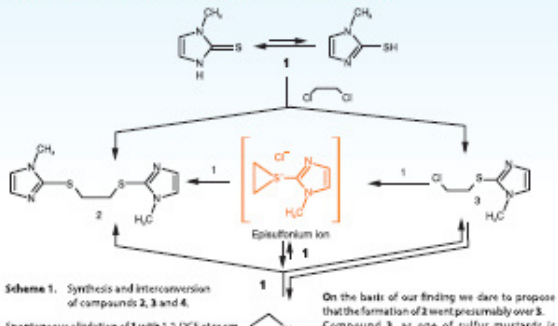
INTRODUCTION

In the course of thyreostatic methimazole (1-methyl-2,3-dihydro-*1H*-imidazole, **1**)[1] stability study we recently reported its spontaneous *S*-alkylation with 1,2-dichloroethane (1,2-DCE) under mild condition (15 days at room temperature in dark or light) and formation of 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazole-2-yl)thio]ethane (**2**) and its salt and hydrated forms. [2]

With the aim to get more detail about the above reaction, especially in the light of well known *S*- and *N*- alkylation's of imidazolthione skeleton compounds [3,4] we are hereby reporting preliminary results of the reactions between **1** and 1,2-DCE at different condition, as well as the mutual interconversion of the formed products.



ALKYLATION OF 1 MEDIATED BY REACTION CONDITION



Scheme 1. Synthesis and interconversion of compounds **2**, **3** and **4**.

Spontaneous alkylation of **1** with 1,2-DCE at room temperature during 28 days led to the formation of **2**. [2] In the present study, under the similar conditions and addition of equal quantity of DMF 2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]-1-methylimidazol (**3**) is isolated in yield of 66 %. However, heating the same reaction mixture at 131°C during 8 hours led to the formation of 7-methyl-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazo[2,1-b]thiazol-4-ium chloride (**4**), also obtained quantitatively, by the spontaneous cyclization of **3** to **4** at room temperature.

By the reaction of **3** with **1** in refluxed ACN, **2** and **4** are obtained in about equal yields of about 45 %.

In addition, the reaction of **4** with **1** in refluxed ACN yielded **2** and **3** in the ratio of about 3 : 1.

On the basis of our finding we dare to propose that the formation of **2** went presumably over **3**. Compound **3**, as one of sulfur mustards is decomposed to the famous, typically fleeting episulfonium ion as intermediate, [5] which followed by nucleophilic attack of **1** yields **2** (Scheme 1 and Table 1).

Additionally, dimeric **2** is formed from bicyclic **4**, the structure which was confirmed by the single crystal X-ray structure analysis. It is an isomer of **3** and the corresponding episulfonium ion. Indirectly by that, the existance of episulfonium intermediate seems to be real.

To the our best knowledge this is among first example of direct confirmation of the episulfonium ion isomer by the single crystal X-ray structure analysis.

Table 1. Transformation of **1** in 1,2-DCE (5 ml, 0.06 mol) & co-solvent (5 ml) and **3** and **4** in ACN.

Entry	Reactant(s)	Co-solvent	Acid/Base/Salt	T/°C	Time/ h or (days)	Yield /%		
						2	3	4
1*	1 0.1 g, 0.9 mmol	-	-	rt./light or dark	(30)	91	0	0
2		ACN	-	reflux	8	20	34	0
3		-	Formic acid, 0.12 ml	reflux	8	13	44	0
4		-	TEA, 0.12ml	reflux	8	0	0	68
5		DCM	-	80	8	traces	0	0
6		Acetone	-	reflux	8	6	80	0
7		DMF	-	131	4	traces	traces	43
8		DMF	TEA, 0.12ml	131	1	0	0	70
9		DMF	Na_2CO_3, 0.8g	131	8	0	10	25
10		DMF	-	rt./light or dark	(30)	traces	86	traces
11	1 (0.01g, 0.09 mmol) & 3 (0.05g, 0.28 mmol)	ACN	-	reflux	8	45	-	43
12	1 (0.02g, 0.14 mmol) & 4 (0.04g, 0.2 mmol)	ACN	-	reflux	6	37	11	-
13	3 (0.05g, 0.56mmol)	-	-	rt./light or	(21)	0	-	98

*The DCE solvent is in molar excess

CRYSTAL STRUCTURE OF COMPOUND 4

Single crystal of compound **4** was separated from 1,2-DCE and the data collection was performed on an Oxford Diffraction Xcalibur 3 diffractometer with CCD detector. Basic crystallographic data are presented in Table 2 while the data shows that **4** crystallizes in the orthorhombic crystal system, space group Pnma.

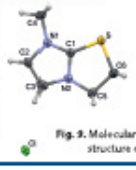


Fig. 9. Molecular structure of **4**.

Table 2. Basic crystallographic data of compound **4**.

Basic crystallographic data			
Mol. formula	$C_6H_8N_2SCl$	$\alpha=\beta=\gamma$ / °	90
Mol. mass	176.66	V/Å³	814.26(9)
Crystal system	Orthorhombic	Z	4
Space group	*Pnma*	F(000)	368
T/K	292	μ	0.0959
a/Å	12.6676(7)	Rint	0.0847
b/Å	6.5063(5)	λ	1.189
c/Å	9.9207(6)		

Bond lengths C1-N1 of 1.327(3) Å, C1-N2 of 1.339(3) Å and S-C1 of 1.725(2) Å in **4** (Fig. 9) suggest significant delocalization of electron density and are in correspondence with literature data [6]. In the crystal structure of **4** the planar heterocyclic cations and chloride anions lie in the crystallographic mirror plane, Fig. 10.

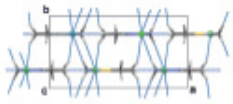


Fig. 10. Projection of **4** down the c-axis with hydrogen bonds shown by blue dotted lines.

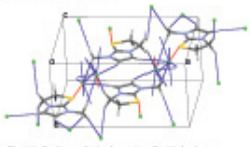


Fig. 11. Packing of **4** in the unit cell with hydrogen bonds shown by blue dotted lines and the Cl–S electrostatic interaction by red lines.

Interatomic distance Cl···S of 3.2125(9) Å is attributed to a short contact suggesting an electrostatic interaction, Fig. 11.

There are weak hydrogen bonds of the C-H···Cl type in the range 3.484(2) to 3.7855(12) Å inter-connecting the ions into a 3D structure.

EXPERIMENTAL

Metimazole **1** (0.02-0.1 mmol) was dissolved in 1,2-DCE (5–10 ml, 0.06–0.013 mmol) with or without other solvent (5 ml), with or without acid/base/salt and exposed reaction conditions according to Table 1. Products **2**, **3** and **4** has been isolated by filtration and solvent wash or extraction using (1M NaOH, following by water wash) or purified by column chromatography using silica gel (mesh size 0.063–0.2), and dichlormethane:acetone 8:2 as eluent. After evaporation in vacuo pure products are obtained as following: 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazol-2-il)thio]ethane in form of HCl salt **2** in a form of white solid (Mp.208°C, yield from 6–45%), 2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]-1-metilimidazol **3** in a form of viscous oil (30–44%), and 7-methyl-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazo[2,1-b]thiazolinum chloride **4** in a form of white crystals (Mp.241°C, 25–68%).Reaction progress was monitored using thin layer chromatography (NH_3:propanol:toluen=0.5:2.5:7) on silica gel plates (Kieselgel G60 F_{254}).

CHARACTERIZATION OF PRODUCTS

NMR spectra, ^{1}H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz). Have been recorded on instrument Bruker. MS analysis is performed on Agilent LC-Q-TOF MS-MS using ESI (+) mode at 175.0 V collision force. DSC is recorded on Mettler Toledo DSC 822° at speed 10°C/min, from 25–300°C under N_2 flow 55 ml/min. Ion chromatography was performed on Thermo apparatus using chloride IC standard.

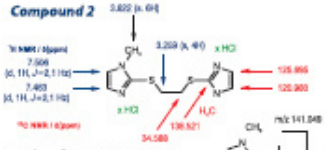


Fig. 1. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of **2** in D_2O.

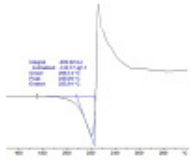


Fig. 2. DSC thermogram of **2**.

Fig. 3. MS spectrum of **2**.

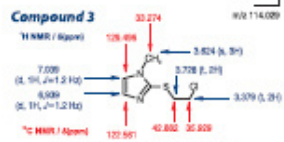


Fig. 4. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of **3** in $CDCl_3$.

Fig. 5. MS spectrum of **3**.

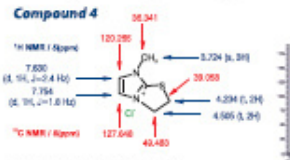


Fig. 6. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of **4** in $CDCl_3$.

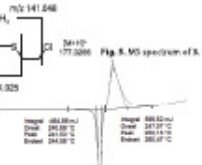


Fig. 7. DSC thermogram of **4**.

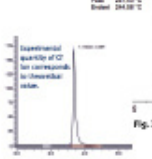


Fig. 8. Ion chromatogram of **4**.

REFERENCES

[1] A. B. Emiliano, et al., Clin. Endocrinol. Metab., 88 (2010) 2327–2335.
[2] L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, Book of Abstracts: 26th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Šibenik, April 9-12, 2019, p. 108.
[3] A. L. Shkurdova, et al., Journal of Organic Chemistry 73 (2008) 4676–4679.
[4] Q. Liu, D. Shi, K. Yu, J. Xia, Acta Crystallographica Section E 69 (2013) 356-357.
[5] a) W. A. Smit et al., Acc. Chem. Res. 13(8) (1970) 282-288; b) M. S. Platz, R. A. Moss, M. Jones Jr., Review of Reactive Intermediate Chemistry, Wiley, 2007, p. 344.
[6] V. A. Talnikov, H. Schwerk, E. A. Pasechnikova, L. A. Adianov, Acta Cryst. C, 52 (1996) 719-721.

CONCLUSION

In the reaction between **1** and 1,2-DCE three product has been characterized and presented as following: 1,2-bis[(1-methyl-1*H*-imidazol-2-il)thio]ethane in form of HCl salt, **2**, 2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]-1-metilimidazol **3** and 7-methyl-2*H*, 3*H*, 7*H*-imidazo[2,1-b]thiazol-4-ium chloride **4**. Episulfonium ion is proposed as key intermediate in the formation of **2**. The structure of episulfonium ion isomer **4** is directly confirmed by the single crystal x-ray structure analysis.

e-mail: jglhrvatska@jgl.hr | www.jgl.hr

L. Štefan, D. Matković-Čalogović, M. Dumić, Žuta forma metimazol disulfida. Knjiga sažetaka 16. Ružičkinih dana, Jukić, Ante (ur.), 2016. p29, (poster, recenziran, sažetak, znanstveni).

ŽUTA FORMA METIMAZOL DISULFIDA
THE YELLOW FORM OF METHIMAZOLE DISULFIDE

Leo Štefan,[1] Dubravka Matković-Čalogović,[2] Miljenko Dumić[3]

[1] JADRAN-GALENSKI LABORATORIJ d.d., Svilno 20, HR-51 000 Rijeka
[2] Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Horvatovac 102a, HR-10 000 Zagreb
[3] Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Radmile Matejčić 2, HR-51 000 Rijeka

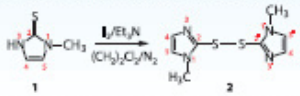
UVOD

Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima posljedica su međudjelovanja djelatnih tvari, pomoćnih tvari i ambalaže pri uvjetima izlaganja formulacije. Njihova izolacija te kemijska, strukturna i farmakološka karakterizacija predstavljaju regulatornu obavezu.

Metimazol (1-metil-2,3-dihidro-1*H*-imidazol; **1**), karakteriziran tioamidnom strukturom, inhibira sintezu tiroidnih hormona i koristi se u liječenju bolesti štitnjače [1]. Na tržištu je dostupan u formi injekcija i tableta. Njegov primarni metabolit [2] kao i primarni produkt procesa oksidacije [3] je metimazol disulfid [2,2'-disulfandiilbis(1-metil-1*H*-imidazol); **2**]. Prema literaturnim podacima disulfid **2** je opisan u žutoj [4] i bezbojnoj formi [5] no niti jednoj formi nije bila do sada poznata struktura. Zbog regulatorne važnosti karakterizacije onečišćenja u ljekovitim pripravcima, priprava i svekolika karakterizacija obje forme metimazol disulfida (**2**) nametnula se kao jedan od zadataka.

SINTEZA I KRISTALIZACIJA

Disulfid **2** pripravljen je oksidacijom metimazola **1** s jodom, za razliku od literaturno poznate oksidacije s vrlo otrovnim fozgenom [4]. Metimazol (18,0 mmol) je oksidiran jodom (9,0 mmol) u 1,2-dikloretanu (130 ml) uz trietilamin (2,8 ml) u inertnoj atmosferi dušika tijekom 3 sata (**Shema 1**).



Shema 1.

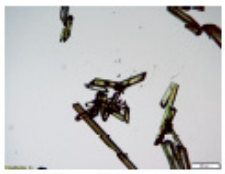
Reakcijska je smjesa razdijeljena između dikloretana i vode, organski je sloj osušen i uparen do suha. Sirovi produkt je prekristaliziran iz etilnog-acetata pri čemu se je dobiven kromatografski čisti disulfid **2** (isk. 57,6 %, t, 131 °C; Lit.[4] t, 127-128 °C) u formi žutih monoklinskih kristala (**Slika 1**).

Tijek reakcije i utvrđivanje čistoće produkta provedeno je tankoslojnom kromatografijom (Kieselgel 60) uz 1,2-dikloretan:metanol = 9:1 kao mobilnu fazu i vizualizaciju parama joda.

Prema literaturi kristalizacijom **2** iz diklormetana dobivena je bezbojna forma disulfida **2** (t, 138 °C) [5]. Naši pokušaji reprodukcije pokusa, ali i primjene drugih otapala bili su neuspješni (**Tablica 1**).

Tablica 1. Neuspjeli pokušaji priprave bezbojne forme **2**.

Kristalizacijske probe				
Otapalo	Otapalo/2	Temp./°C	Tehnika	Rezultat
Diklormetan (DM)	3 : 1	40	Hlađenje otapala	Žuti kristali
	4 : 1	40		Žuti kristali
	5 : 1	40		Žuti kristali
Aceton	33 : 1	56		Žuti kristali
Etil-acetat	83 : 1	77		Žuti kristali

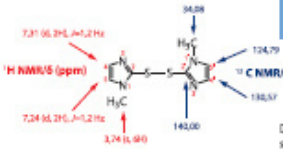


Slika 1. Žuti monoklinski kristali **2** iz EtOAc.

KARAKTERIZACIJA ŽUTE FORME DISULFIDA 2

NMR spektri

^{1}H (600 MHz) i ^{13}C (150 MHz) NMR spektri snimljeni su na uređaju Bruker u $CDCl_3$. Kemijski pomaci navedeni su u odnosu na TMS kao interni standard (**Slika 2**). Signal C2 ugljikovog atoma nije uočen nakon dugotrajnog snimanja zbog elektronskih ili konformacijskih efekata susjedne disulfidne veze, no njegovo prisustvo utvrđeno je HSQC, COSY, HMBC korelacijskim pokusima.



Slika 2. Kemijski ^{1}H i ^{13}C NMR pomaci žute forme **2** u $CDCl_3$.

IR spektar

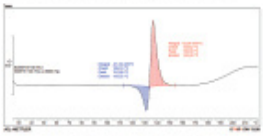
IR spektar žute forme **2** snimljen je primjenom FTIR-ATR tehnike (**Tablica 2**).

Tablica 2. FTIR-ATR vrpce.

FTIR-ATR	Apsorpcijske vrpce			
ν/cm^{-1}	3109.84,	3093.10,	2950.83,	2626.39,
	2210.27,	1736.51,	1655.41,	1591.15,
	1500.25,	1450.49,	1407.88,	1370.25,
	1345.41,	1313.46,	1282.72,	1161.56,
	1128.95	1074.23,	1041.21,	981.98,
	790.70,	683,16		

DSC termogram

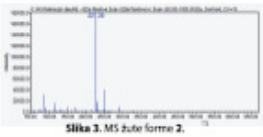
DSC termogram žute forme **2** (**Slika 4**) je snimljen na uređaju Mettler Toledo DSC 822^e u aluminijskoj posudici s otvorom i poklopcem, brzinom grijanja od 10°C/min, u temp. rasponu od 25 do 220°C te uz protok N_2 od 55 ml/min.



Slika 4. Termogram žute forme **2**.

MS

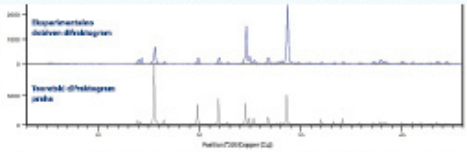
MS analiza žute forme **2** je provedena na instrumentu Waters UPLC s QDA detektorom u ESI (+) modu u rasponu od 50 do 1000 Da (**Slika 3**).



Slika 3. MS žute forme **2**.

XRPD

Difraktogrami praha žute forme **2** (kristalizirani iz različitih otapala) uspoređeni su sa teoretskim difraktogramom riješene strukture te je potvrđeno da je uvijek dobivena ista forma (**Slika 5**).



Slika 5. Usporedni prikaz teoretskog i eksperimentalnog difraktograma praha žute forme **2**.

Rentgenska strukturna analiza jediničnih kristala

Jedinični kristal žute forme **2** pripravljen je iz EtOAc, a snimanje je provedeno na difraktometru Oxford Diffraction Xcalibur 3 sa CCD detektorom.

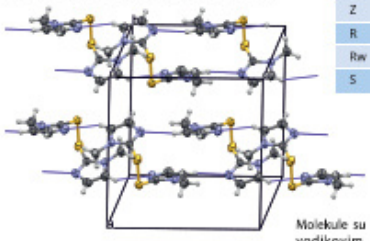
Osnovni kristalografski podaci za žutu formu **2** (**Tablica 3**) pokazuju da ta forma kristalizira u prostornoj grupi C2/c monoklinskog kristalnog sustava.

Tablica 3. Osnovni kristalografski podaci za žutu formu **2**.

Kristalografski podaci	
Formula	$C_8H_{10}N_4S_2$
M_r	226,32
Boja	žuta
Temperatura mjerenja/K	292
Kristalni sustav	Monoklinski
Prostorna grupa	C2/c
a/Å	12.5904(6)
b/Å	7.3959(3)
c/Å	11.2869(5)
β/°	97.886(4)
Volumen jedinične ćelije/Å^3	1041.07(8)
Z	4
R	0,0317
Rw	0,0882
S	1.051

Slika 6. Prikaz molekulske strukture žute forme metimazol disulfida (**2**).

Struktura i konformacija molekule metimazol disulfida u kristalu žute forme **2** prikazana je na **Slici 6**, a pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji na **Slici 7**.



Slika 7. Pakiranje molekula u jediničnoj ćeliji kristala žute forme **2**. Vodikove veze prikazane su plavim točkastim linijama.

Molekule su u strukturi povezane slabim vodikovim vezama tipa C-H···N od 3.4227(18) Å u dvostruke beskonačne lance. Među lancima su samo slabe van der Waalsove sile. Duljina disulfidne veze iznosi 2.0927(5) Å.

LITERATURNA VRELA

(1) A. B. Emiliano, L. Governale, M. Parks, D. S. Cooper, *Clin. Endocrinol. Metab.* **95** (3) (2010) 2227–2235.
(2) A. Taurog, M. L. Dorris, F. S. Guziec, *Endocrinology* **124** (1989) 30–39, and references therein.
(3) M. Nakamura, N. Shishido, H. Akutsu, *Jpn. J. Infect. Dis.* **57** (5) (2004) 54–55.
(4) H. Arnold, D. Vogelsang, **DE 960279** (Mar. 21, 1957).
(5) H. Eshghi, S. F. Tayyari, Z. Rezvani-Amin, M. Rooki, *Bull. Korean Chem. Soc.* **29** (1) (2008) 51–56.

ZAKLJUČAK

Provedena je priprava te spektroskopska, termička i strukturna karakterizacija žute forme metimazol disulfida (**2**), primarnog oksidacijskog onečišćenja metimazola (**1**). Pokušaji dobivanja bezbojne forme **2**, koja je također opisana u literaturi nisu bili uspješni.

e-mail: jglhrvatska@jgl.hr | www.jgl.hr