Izolacija i karakterizacija razgradnih produkata lifitegrasta dobivenih prisilnom razgradnjom

Buljević, Jadranka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:193:480461

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-24**

Repository / Repozitorij:

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

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Jadranka Buljević

Izolacija i karakterizacija razgradnih produkata lifitegrasta dobivenih prisilnom razgradnjom

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Jadranka Buljević

Izolacija i karakterizacija razgradnih produkata lifitegrasta dobivenih prisilnom razgradnjom

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Dean Marković

Komentor rada: Dr.sc. Leo Štefan

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Graduate programme

Medicinal chemistry

Jadranka Buljević

Isolation and characterization of degradation products of lifitegrast obtained by forced degradation

Graduate thesis

Rijeka, 2023

Diplomski rad obranjen je dana 12.09.2023.

Pod povjerenstvom:

1. Doc.dr.sc. Ivan Gudelj
2. Izv.prof.dr.sc. Ivana Ratkaj
3. Prof.dr.sc. Dean Marković

Rad ima 66 stranica, 39 slika, 13 tablica i 23 literaturna navoda.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jadran Galenskom Laboratoriju (JGL) d.d. i predan Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

Zahvala

Veliko hvala mojem mentoru, prof. Deanu Markoviću, na svemu naučenom, svim danim savjetima tijekom studija, suradnji i ukazanom povjerenju! Hvala na uloženom vremenu, podršci i pomoći kada god mi je trebala!

Najveće hvala mojem komentoru, dr.sc. Leu Štefanu, na prilici, vođenju, strpljenju, uloženom vremenu unutar i izvan svojeg radnog vremena, znanju i motivaciji. Bilo mi je zadovoljstvo surađivati s osobom vedrog i entuzijastičnog duha koja mi je prenijela želju za daljnji uspjeh.

Hvala Jadran Galenskom Laboratoriju na omogućenoj prilici izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada i svim omogućenim sredstvima! Ujedno hvala i JGL timu na suradnji i pomoći.

Jedno veliko hvala zaslužuje i dr.sc. Ana Čikoš sa Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu zahvaljujući kojoj su određene moje strukture onečišćenja. Bila je to vrlo kratka, ali kvalitetna praksa! Hvala na edukaciji, strpljenju i uloženom vremenu.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima, tati Mati i mami Kati, bez kojih ne bi došla do kraja ovog putovanja. Nema riječi kojima im se mogu zahvaliti na potpori u svakome smislu, na svemu što su mi omogućili kao osobi i studentu. Bez njih i njihove žrtve ne bi bilo ni svega ovoga. Hvala na ljubavi, strpljenju i razumijevanju.

Hvala mojim sestrama, Jeleni i Ivani, i bratu Petru, što su bili tu kada je bilo najteže! Bili su mi motivacija i podrška jer su i sami prošli kroz isto.

Hvala i mojim najslađim nećacima što su mi svojim postojanjem uljepšali svih 5 godina studija.

Hvala svim prijateljima i poznanicima na podršci i uljepšanim studentskim danima ispunjenim prekrasnim uspomenama! Uz vas je sve bilo lakše.

Jadranka

Sažetak:

Ovaj rad bavi se prisilnim studijama onečišćenja lifitegrasta, djelatne tvari protuupalnog lijeka Xiidra koji se upotrebljava za liječenje sindroma suhog oka. Lifitegrast je izlagan različitim ekstremnim uvjetima te je pri tome praćena njegova stabilnost i razgradnja na pojedina onečišćenja. Provedene su reakcije termolize, fotolize, hidrolize i oksidacije. Samim time, pomoću kromatografskih i spektroskopskih tehnika, izolirani su i identificirani produkti raspada lifitegrasta. U ovom će radu biti opisana kemijska svojstva lifitegrasta, način provođenja stres testiranja te karakterizacija dobivenih razgradnih produkata.

Ključne riječi: lifitegrast, onečišćenja, prisilne studije

Summary:

Forced degradation studies of lifitegrast, the active ingredient in the anti-inflammatory drug Xiidra, which is used to treat dry eye syndrome are described. Lifitegrast was exposed to various extreme conditions in which its stability and degradation impurities were monitored. Thermolysis, photolysis, hydrolysis and oxidation reactions were carried out. By using chromatographic and spectroscopic techniques, the degradation products of lifitegrast were isolated, identified and characterized. In this work the chemical properties of lifitegrast, the methods of stress tests as well as the characterization of the obtained degradation products are discussed.

Key words: forced degradation studies, impurities, lifitegrast

Sadržaj:

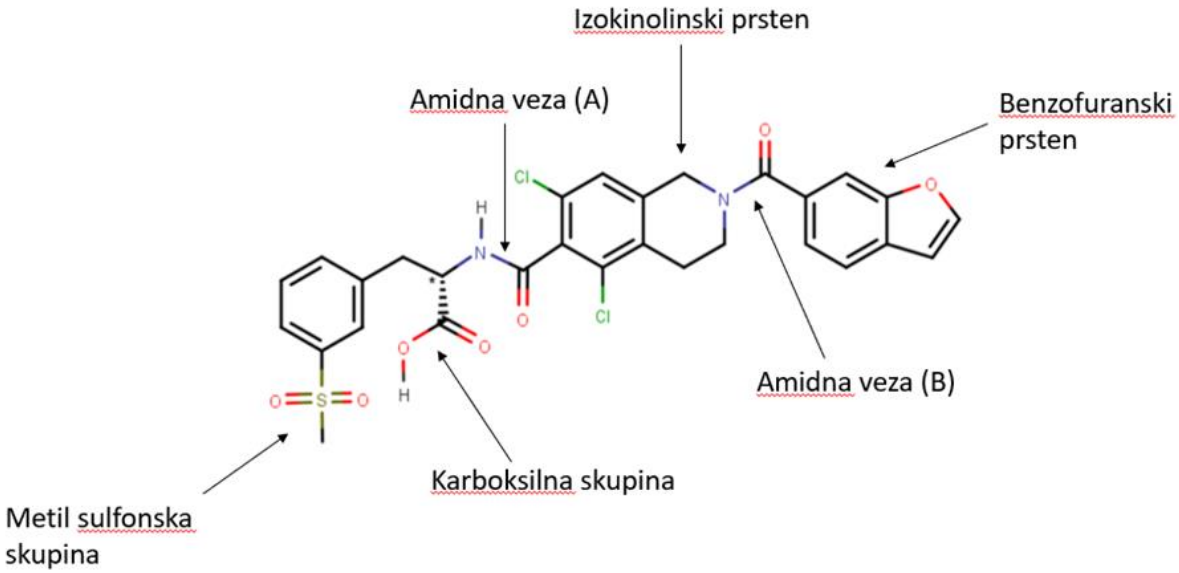
1. UVOD.....1
   1.1. Lifitegrast.....1
   1.2. Onečišćenja u lijekovima.....3
   1.3. Studije prisilne razgradnje lijekova.....5
   1.4. Izolacija i karakterizacija onečišćenja.....8
   1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....10
   1.6. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR).....11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....15
3. MATERIJALI I METODE.....16
   3.1. Materijali.....16
   3.2. Instrumenti.....16
      3.2.1. HPLC.....16
      3.2.2. NMR.....17
   3.3. Metode.....18
      3.3.1. Priprema uzoraka.....18
         3.3.1.1. Inicijalna studija.....18
         3.3.1.2. Glavna studija.....20
      3.3.2. Izolacija nepoznatih onečišćenja.....21
         3.3.2.1. Kolonska kromatografija.....21
         3.3.2.2. Preparativna tankoslojna kromatografija.....22
4. REZULTATI 23
5. RASPRAVA.....47
6. ZAKLJUČAK.....48
7. LITERATURA.....49
8. ŽIVOTOPIS.....52

1. UVOD

1.1. Lifitegrast

Lifitegrast (*S*)-2-(2-(benzofuran-6-karbonil)-5,7-dikloro-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-karboksamido)(3(metilsulfonil)fenil)propanska kiselina (**1**) molekularne formule $C_{29}H_{24}Cl_2N_2O_7S$ je aktivna tvar protuupalnog lijeka Xiidra®. Mala je molekula molekularne mase 615,5 g/mol i primjenjuje se u obliku kapi za oči [1]. Odobrena je od američke Agencije za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) 2016. godine za liječenje sindroma suhog oka (keratokonjuktivitis sicca)[2]. Lifitegrast je kristalna krutina, bijele do blago žute boje, ljepljiv, higroskopan, netopljiv u vodi, ali topljiv u organskim otapalima poput diklormetana i acetonitrila (ACN) te djelomično topljiv u acetonu i dobro topljiv u anorganskom otapalu metanolu. pH otopine lifitegrasta je 7,0-8,0 i u tome rasponu se smatra njegova dobra topivost [3]. Ima jedan kiralni centar i postoji kao *S*-i *R* stereoizomer [1]. Kao djelatna tvar primjenjuje se *S* izomer dok se *R* izomer prati kao onečišćenje. Po strukturnoj formuli, lifitegrast je aromatski heteropoliciklički spoj. Pripada skupini organskih spojeva poznatih kao fenilalaninski derivati. To su spojevi koji sadrže fenilalanin ili njegov derivat koji nastaje reakcijom fenilalanina na amino skupini, karboksi skupini ili zamjenom bilo kojeg vodika glicina heteroatomom [4]. Struktura lifitegrasta prikazana je na slici 1 i može se raščlaniti na metil-sulfonil-fenil propansku kiselinu, diklor-tetrahidro izokinolin karboksamid te benzofuran karbonil. Lifitegrast je pokazao određen postotak onečišćenja koja nastaju razgradnjom molekule. Promatrajući potencijalna reaktivna mjesta na kojima bi moglo doći do razgradnje u molekuli lifitegrasta može se zaključiti da su to metil-sulfonska skupina koja je podložna demetilaciji, karboksilna skupina koja zbog elektrofilnog karbonilnog ugljika podliježe dekarboksilaciji i formiranju soli, dvije amidne veze

na kojima su moguće hidrolize te izokinolinski i benzofuranski prsten na kojima je moguća oksidacija (slika 1).



Slika 1. *Struktura* **1** (Izvor: MarvinSketch)

Sindrom suhog oka opisuje se kao multifaktorijalna bolest oka i očne površine koja rezultira simptomima nelagode, poremećajem vida i nestabilnosti suznog filma s mogućim oštećenjem površine oka. To je praćeno povećanom osmolarnošću suznog filma i upalom očne površine. U suzama pacijenata sa sindromom suhog oka javljaju se povećane razine citokina izražene CD4 T-pomoćničkim stanicama kao rezultat kronične upale [5]. Lifitegrast je dizajniran kao antagonist molekule integrina na način da inhibira interakciju između integrin antigena 1 povezan s funkcijom limfocita (*engl. Lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1)* i međustanične adhezijske molekule (*engl. Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)*[1]. LFA-1 je heterodimerni integrin sastavljen od α_L i β_2 podjedinice. Izražen je na staničnim površinama T i B limfocita [6] te posreduje u aktivaciji i proliferaciji istih. ICAM-1 olakšava većinu imunoloških funkcija ovisnih o T-stanicama kroz njegovu interakciju s LFA-1, uključujući adheziju T-stanica na endotelne i epitelne stanice, proliferaciju T-stanica i otpuštanje upalnih citokina [5]. Uloga LFA-1/ICAM-1 interakcije u

aktivaciji i migraciji T-stanica očituje se u formiranju imunoloških sinapsi između T- i dendritičkih stanica [3]. Ciljanjem interakcije LFA-1/ICAM-1 smanjuju se komponente upale i imunološke aktivacije koje su povezane s razvojem i održavanjem sindroma suhog oka [1]. Prema tome, izdvajaju se ključni mehanizmi lifitegrasta, a to su inhibicija adhezije, migracije, aktivacije i regrutiranje T stanica [5]. Pokazalo se da na taj način lifitegrast štiti površinu rožnice i ublažava simptome sindroma suhog oka s brzim početkom djelovanja i dobro podnošljivim profilom, kako u lokalnom tako i u sustavnom okruženju [2]. Dobro se apsorbira u očna tkiva i brzo se sistemski eliminira iz organizma [3]. Najučinkovitiji je kada se nanosi izravno na površinu oka. Dostupan je kao 5,0%-tna oftamološka otopina bez konzervansa [7]. Uz aktivni sastojak lifitegrast, u Xiidri® (Shire) javljaju se i pomoćne tvari poput natrijeva klorida (NaCl), dvobaznog bezvodnog natrijeva fosfata (Na_2HPO_4), natrijeva tiosulfata pentahidrata ($Na_2S_2O_3$ x $5H_2O$), natrijeva hidroksida (NaOH), klorovodične kiseline (HCl) i vode za injekcije [8]. Iz registracijske dokumentacije lijeka vidljivo je da je proizvođač Shire proveo studije stabilnosti u skladu sa smjernicama Međunarodnog vijeća o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu u ljudi (*engl. International Council on Harmonisation, ICH*). Time se prihvaća predloženi rok trajanja od 2 godine. Lijek je osjetljiv na svjetlost pa se sve do primjene treba čuvati u jednodoznim spremnicima u originalnoj aluminijskoj vrećici [1]. Za učinkovito liječenje suhoga oka primjenjuje se po jedna kap u svako oko, dva puta dnevno [7].

1.2. Onečišćenja u lijekovima

Sigurnost lijeka određena je njegovim farmakološko-toksikološkim profilom te nije ovisna samo o toksikološkim svojstvima same djelatne tvari lijeka već i o onečišćenjima koje sadrži. Prema ICH smjernicama, onečišćenja ili razgradni produkti u lijekovima predstavljaju bilo koje komponente koje nisu kemijski entitet

definiran kao aktivni farmaceutski sastojak (API) ili pomoćne tvari. U farmaceutskim proizvodima onečišćenja su povezana s kvalitetom proizvoda jer mogu smanjiti njegovu učinkovitost i rezultirati sigurnosnim problemima. Onečišćenja se dijele na organska i anorganska onečišćenja i ostatna otapala [9]. Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje ili skladištenja djelatne tvari ili finalnog farmaceutskog proizvoda. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva. Mogu uključivati početni materijal, međuprodukte, razgradne produkte, reagense, ligande i katalizatore. Anorganska onečišćenja također mogu nastati u procesu proizvodnje te uključuju reagense, ligande, katalizatore, teške metale ili druge zaostale metale i anorganske soli. Treća kategorija su ostatna otapala [10]. Općenito, otapala su anorganske ili organske tekućine koje se koriste u pripremi otopina ili suspenzija te u sintezi novih supstanci lijekova [11], dok su ostatna otapala zaostaci primijenjenih otapala u finalnom proizvodu. Navedene tvari često nisu potpuno uklonjene tijekom procesa proizvodnje te zbog toga mogu sudjelovati u razgradnji određenog proizvoda i generirati dodatna onečišćenja [12]. Zbog različitih postupaka sinteze lijekova, može se dogoditi da isti proizvod, ali iz različitih sintetskih postupaka daje različita onečišćenja [9]. Porijeklo onečišćenja može biti iz bilo kojeg koraka sinteze: posljednji međuprodukt sinteze, produkti nepotpune reakcije tijekom sinteze, onečišćenja u polaznim materijalima sinteze, onečišćenja koja potječu iz otapala reakcije, onečišćenja koja potječu iz katalizatora - proizvodi sporednih reakcija, razgradni produkti kao onečišćenja i enantiomerna onečišćenja [10]. Dakle, svaki dodatni materijal prisutan u djelatnoj tvari ili finalnom farmaceutskom proizvodu, a bez farmakološke aktivnosti, smatra se onečišćenjem. Izraz „onečišćenja" se često upotrebljava kao sinonim za razgradne produkte te se uz to koristi i naziv srodni spojevi za glavne produkte razgradnje i onečišćenja iz sinteze.

Stabilnost djelatne tvari je ključni parametar za razvoj lijekova i njihovu upotrebu. Treba biti uzeta u obzir pri odabiru formulacije, analitičkih metoda, pakiranju, skladištenju, određivanju roka trajanja, sigurnosti i toksikološkim studijama. Onečišćenja se moraju kontrolirati i sama kontrola je uspostavljena s ICH Q3A i Q3B smjernicama koje se odnose na registracijske zahtjeve o sadržaju i kvalifikaciji onečišćenja klasificiranih kao produkti razgradnje koji se uočavaju tijekom proizvodnje ili studija stabilnosti farmaceutskog proizvoda. Prijava za registraciju treba sadržavati validirani analitički postupak prikladan za detekciju i kvantifikaciju proizvoda razgradnje. To bi trebalo uključivati dokaze za specifičnost metode za specificirane i nespecificirane produkte razgradnje [11]. Formulacija lijeka treba biti stabilna tijekom razdoblja skladištenja s obzirom na njegovu čistoću, kvalitetu, identitet i snagu. Studije stabilnosti potvrđuju rok trajanja lijeka i njegov stabilitet je definiran unutar tih uvjeta. Kvalitetu lijekova potrebno je pratiti od same sirovine pa do gotovog proizvoda, uključujući post marketinški nadzor. Samim time obavezno je identificirati i karakterizirati onečišćenja farmaceutskog proizvoda iznad prihvaćenih granica od 0,1%, a ovisno o maksimalnoj dnevnoj dozi [9]. Nakon otkrivanja onečišćenja, a ukoliko je to nužno slijedi njihova izolacija i karakterizacija [10].

1.3. Studije prisilne razgradnje lijekova

Studije prisilne razgradnje lijekova ili stres studije su procesi koji uključuju razgradnju lijekova pri ekstremnim uvjetima da bi se odredili produkti razgradnje određenog farmaceutskog proizvoda [11]. Predstavljaju glavni alat koji se koristi za predviđanje stabilnosti proizvoda, razvoja analitičkih metoda i identificiranja razgradnih produkata. Koriste se za određivanje intrinzične stabilnosti molekule koja se odnosi na uvjete koji dovode do razgradnje, određivanje kinetike i puteva razgradnje. Govoreći o putevima razgradnje, to mogu biti npr. termoliza, fotoliza, hidroliza i oksidacija. Time se

definiraju uvjeti skladištenja i uvjeti u kojima su API ili proizvod lijeka osjetljiviji na razgradnju kako bi se osigurala kvaliteta konačnog proizvoda i kompatibilnost pomoćnih tvari. Pri tome treba dobro poznavati supstancu - njezinu molekularnu strukturu, topljivost, kemijsku (ne)stabilnost, higroskopnost i enantiomernu čistoću. Stres studije su prepoznate kao važan dio procesa razvoja lijeka jer je ICH povećala regulatorna ispitivanja onečišćenja, zahtijevajući njihovu identifikaciju i toksikološku kvalifikaciju na vrlo niskoj razini [12]. ICH smjernice koje su primjenjive na stres studije su ICH Q1A – preporuča uvjete temperature za ispitivanje stabilnosti novih supstanci lijeka, dok ICH Q1B – preporuča uvjete za ispitivanje fotostabilnosti novih supstanci lijeka i ICH Q2B – odnosi se na validaciju analitičkih postupaka [13]. Prisilne studije se izvode izlaganjem djelatne tvari ili proizvoda ekstremnim uvjetima na nekoliko sati ili dana jer takvi uvjeti mogu pružiti znatnu razgradnju djelatne tvari (od 10% do 30%) [11]. U krutom stanju se ispituju uvjeti temperature, relativne vlažnosti (RV) i UV-VIS zračenje (fotostabilnost), dok u otopinama ispitivanje mora uključivati učinak temperature, relativnu vlažnost, oksidaciju, UV-VIS zračenje, prisutnost metalnih iona te hidrolizu kroz širok raspon pH vrijednosti u otopini ili suspenziji [12].

Evaluacija temperatura se obično provodi između 40°C i 80°C, ali po potrebi može biti i viša [11].

Vlažnost je jedan od čimbenika koji može utjecati na stvaranje razgradnih produkata u finalnom proizvodu ili API-u i stoga se preporučuje uvjet od 75%RV [13].

Za oksidaciju literatura preporučuje korištenje vodikovog peroksida (H_2O_2) pri koncentraciji od 0,1% do 0,3% pri sobnoj temperaturi (25°C) i upotrebu radikalnog inicijatora azobisizobutironitrila (AIBN) da bi se ispitala osjetljivost supstance na oksidaciju [11].

Fotolitička razgradnja se najčešće izvodi pod UV-VIS svjetlom koje ne smije biti manje od 1,2 milijuna lx/h, snage 200 Wh/m^2 i valne duljine 300-800 nm. Maksimalno preporučeno osvjetljenje je 6 milijuna lx/h [14]. Izlaganje zračenju na valnoj duljini manjoj od 300 nm nije potrebno jer se lijek neće naći u tim uvjetima tijekom njegovog životnog ciklusa. Reakcije poput fotolitičkih potiču molekulu do pobuđenog stanja i mogu povećati njezinu reaktivnost na reaktivnim mjestima u strukturi pri čemu dolazi do cijepanja kemijskih veza i nastanka novih molekula [11]. Fotooksidacija može biti uzrokovana mehanizmom slobodnih radikala. U fotoosjetljive skupine ubrajaju se karbonili, nitroaromatski prsteni, *N*-oksidi, alkeni, aril kloridi, slabe C–H i O–H veze, sulfidi i polieni [13].

Ispitivanje utjecaja metalnih iona provodi se sa Fe^{3+} i Cu^{2+} i omogućava određivanje supstanci s niskim redoks potencijalom jer se one smatraju vrlo osjetljivima na oksidaciju. Takva saznanja uzimaju se u obzir prilikom preformulacije lijeka (upotreba antioksidansa) [12].

U konačnici, utjecaj pH procjenjuje se korištenjem kiseline ili baze, najčešće HCl i NaOH. U ovisnosti o kemijskoj strukturi i reaktivnosti djelatne tvari i finalni proizvodi mogu imati nisku stabilnost u vodenom mediju te se zbog toga mora procijeniti sposobnost hidrolize. U kiseloj ili bazičnoj hidrolizi javlja se kataliza ionizirajućih funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli. Razgradnja se javlja kada lijek uđe u interakciju sa kiselinom ili bazom.

Dodatna varijabla koja se može uzeti u obzir za ispitivanje stabilnosti farmaceutskog proizvoda je mikrobiološka stabilnost [11].

Bitno je napomenuti da ne postoje smjernice koje objašnjavaju kako provesti prisilne studije, stoga one ovise o iskustvu kompanije i pojedinca koji će ih provoditi. Poznavajući uvjete koji dovode do

razgradnje, mogu se dizajnirati kontrole i uvjeti za uspješan proces proizvodnje.

Problemi povezani sa stabilnosti utječu na puno područja, a najviše na razvoj analitičkih metoda, formulacije i razvoj pakiranja, prikladne uvjete skladištenja i određivanje roka trajanja, sigurnosna i toksikološka pitanja, parametre proizvodnje i obrade, studije farmakokinetike te procjenu utjecaja na okoliš [12]. Iz tih razloga se prisilne studije smatraju od izuzetne važnosti.

1.4. Izolacija i karakterizacija onečišćenja

Za otkrivanje, identifikaciju, kvantificiranje i karakterizaciju onečišćenja prisutnih u lijekovima upotrebljavaju se analitičke metode s visokom osjetljivosti i specifičnosti [10]. Određivanje onečišćenja u lijekovima je multidisciplinarni zadatak jer zahtijeva upotrebu nekoliko analitičkih metoda da bi se potvrdila poznata i otkrila nepoznata onečišćenja koja nastaju tijekom procesa proizvodnje djelatne tvari ili tijekom procesa razvoja lijeka [9]. Odgovarajuća tehnika odabire se na temelju prirode onečišćenja i dostupnih informacija potrebnih za analizu. Najčešći instrumentalni pristupi za izolaciju i identifikaciju razgradnih produkata dijele se na kromatografske i spektroskopske tehnike. Od kromatografskih tehnika, izdvajaju se kolonska kromatografija, tankoslojna kromatografija (*engl. Thin Layer Chromatography*, TLC), preparativna tankoslojna kromatografija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), a od spektroskopskih tehnika ultravioletna spektroskopija (UV), masena spektrometrija (MS) i spektrometrija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) [15].

Kolonska kromatografija je povoljna za pročišćavanje i izolaciju komponenti. Tekuća mobilna faza (otapalo) koja sadrži uzorak od interesa putuje kroz krutu stacionarnu fazu i bira se na temelju

prirode spojeva koje treba izolirati. Postoji nekoliko mogućnosti izbora stacionarne faze, a to su silikagel, aluminijev oksid, kalcijev fosfat, kalcijev karbonat, škrob i magnezij. Za pripremu kolone koriste se dvije metode: suha i mokra. Za suhu metodu, kolona se puni mobilnom fazom u koju se lagano dodaje prah suhe stacionarne faze sve dok se kolona ne upakira. Za mokru metodu, priprema se smjesa praha suhe stacionarne faze i mobilne faze i kao takva ulijeva se u kolonu. Spojevi se kreću kroz kolonu i odvajaju na temelju različitih polariteta [16].

TLC je široko rasprostranjena tehnika zbog jednostavnosti korištenja, financijske isplativosti, visoke osjetljivosti te brzine i kapaciteta odvajanja višestrukih uzoraka. Koristi se za odvajanje, izolaciju i kvantifikaciju komponenti u smjesi. Uzorak se obično nanosi na silikagel pločicu sa UV indikatorom F_{254}, a da bi se razvio kromatogram, pločica se unosi u komoru s odgovarajućim otapalom. Komponente putuju različitim brzinama i zaustavljaju se na različitim mjestima na pločici i time se omogućuje njihova identifikacija.

Preparativna tankoslojna kromatografija također pomaže u izolaciji onečišćenja i to u dovoljnim količinama za provođenje strukturne analize [10]. Kao i kod TLC-a, uzorak se najčešće nanosi na silikagel pločicu, ali bez UV indikatora F_{254}. Nakon vizualizacije i određivanja pozicije željene supstancije, odstrani se silikagel da bi se otapanjem istoga odvojila određena supstancija.

Za vizualizaciju onečišćenja u UV području elektromagnetskog spektra praktična je primjena UV metode, prilikom koje se mogu odrediti koncentracije molekula koje apsorbiraju u području 200 – 400 nm.

Za konačnu potvrdu strukture putem njezine mase provodi se MS analiza. MS omogućava dobivanje strukturnih informacija s obzirom na molekularnu masu molekule [15].

O HPLC i NMR tehnici detaljnije slijedi u nastavku rada.

1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je tehnika koja se koristi za odvajanje, identifikaciju i kvantificiranje komponenti smjese. To uključuje razdvajanje kemijskih spojeva, identifikaciju sastojaka biološkog uzorka, određivanje sadržaja i onečišćenja lijekova. Time se omogućuje kvalitativna i kvantitativna analiza tražene komponente [14]. Instrument koji se koristi za provođenje kromatografije je kromatograf, a rezultat analize je kromatogram [17]. Sustav HPLC-a sastoji se od stacionarne i mobilne faze te detektora. Stacionarna faza je najčešće čvrsta kolona duljine kućišta od nekoliko centimetara u kojem se nalaze potporne čestice silicijevog dioksida i na njih je vezana tvar koja utječe na razdvajanje komponenti analita na temelju njihovih relativnih polariteta. Mobilna faza je otapalo na temelju kojeg se razdvajaju komponente. Različiti spojevi međusobno djeluju sa stacionarnom fazom u različitim stupnjevima [14]. Veći polaritet mobilne faze dovodi do duljeg vremena zadržavanja, a kraće vrijeme zadržavanja zahtijeva mobilnu fazu nižeg polariteta za spojeve veće polarnosti [17]. Određena količina uzorka se ubrizgava u kolonu i spojevi sadržani u uzorku se odvajaju. Spojevi odvojeni na koloni detektiraju se te se svaki spoj identificira i kvantificira. Najčešći detektor je UV detektor jer većina farmaceutskih komponenti sadrži određeni tip kromofora. Često se upotrebljava i detektor niza foto dioda (*engl. Photodiode Array Detector, PDA*) u kombinaciji s masenim spektrometrom jer se na taj način dobivaju UV i spektralne informacije o onečišćenjima. Za komponente koje ne apsorbiraju UV zračenje, najkorisniji detektor je s evaporativnim raspršenjem svjetlosti. Kao univerzalni detektor koristi se za isparljive i neisparljive komponente pri čemu odražava ukupnu masu koja prolazi kroz detektor. Detekcija pomoću fluorescencije nije poželjna jer nemaju

sve molekule sposobnost fluorescencije što znači da se razgradni produkti neće moći odrediti [12].

Razlikujemo nekoliko najčešćih vrsta tekućinske kromatografije. To su kromatografija normalnih faza, kromatografija obrnutih faza, ionsko-izmjenjivačka kromatografija i kromatografija isključenjem.

Kromatografiju normalnih faza karakterizira polarna stacionarna faza i nepolarna ili umjereno polarna mobilna faza kao otapalo. Najmanje polarna otopljena tvar provodi proporcionalno manje vremena u polarnoj stacionarnoj fazi i prva se eluira iz kolone.

U kromatografiji obrnutih faza, stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza je polarna. Većina reverzno faznih odvajanja provodi se korištenjem puferirane vodene otopine kao polarne mobilne faze. S obzirom da se kao supstrat koristi derivat silicijevog dioksida koji je podložan hidrolizi u bazičnim otopinama, pH mobilne faze mora biti manji od 7,5. Najpolarnija otopljena tvar se prva eluira.

Ionsko-izmenjivačka kromatografija uključuje umreženu polimernu smolu koja predstavlja stacionarnu fazu, a mobilna faza je vodeni pufer čiji pH i ionski sastav određuju vrijeme zadržavanja otopljene tvari. Dakle, razdvajanje se temelji na naboju analita koji se analizira.

Posljednja vrsta je kromatografija isključenjem koja se naziva još i gel kromatografija. Stacionarna faza je porozni materijal u kojoj se odvajanje temelji na veličini otopljene tvari i njenoj sposobnosti da uđe u pore kolone. Otopljene tvari manje veličine provode proporcionalno više vremena unutar pore pa im je potrebno više vremena za eluiranje iz kolone [17].

1.6. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Spektroskopija NMR je neinvazivna i nedestruktivna analitička tehnika koja se primjenjuje kroz cijeli proces istraživanja, razvoja i proizvodnje farmaceutskih proizvoda. Najrasprostranjenija uloga

NMR spektroskopije je u strukturnim studijama organskih molekula. Koristi se i za identifikaciju nepoznatih spojeva (prirodni produkti, onečišćenja, razgradni produkti i slično) te otkrivanju njihove strukture (uključujući stereokemiju i dinamiku) kao i kvalitativnu i kvantitativnu analizu prirodnih i sintetskih spojeva u kompleksnim smjesama. Jedna od primjena NMR spektroskopije je strukturna analiza razgradnih produkata, čime se omogućava razumijevanje temeljnih mehanizama procesa razgradnje. Spektroskopija NMR pruža kvalitativne informacije bez potrebe za standardima nepoznatih uzoraka te se višestruke komponente mogu kvantificirati u kompleksu uzoraka bez prethodnog odvajanja [18]. Kao analitička tehnika NMR spektroskopija pripada u manje osjetljive tehnike i ne koristi se kao prvi izbor za analizu kompleksnih smjesa ili spojeva u tragovima, ali ukoliko se kombinira s tehnikama odvajanja i pročišćavanja (TLC, kromatografija na silikagelu), količina dobivenog uzorka je najčešće dovoljna za određivanje niskih razina onečišćenja. Smatra se univerzalnim detektorom za vodik i ugljik, ali i za druge magnetski aktivne jezgre. Prvi korak u NMR karakterizaciji je određivanje čistoće uzorka, topljivosti i količine. Za pripremu uzoraka koriste se deuterirana otapala kao što su dimetil sulfoksid (DMSO-d_6), kloroform ($CDCl_3$), metanol (CD_3OD), voda (D_2O), aceton-d_6 i acetonitril-d_3. Uzorci se najčešće otapaju u cjevčicama promjera 5 mm, no kod malih količina uzorka mogu se koristiti i cjevčice sa smanjenim volumenom. Gotovo univerzalnim otapalom smatra se DMSO-d_6 jer omogućava najveću topljivost komponenti i ima visoko vrelište što ga čini pogodnim za pokuse pri povišenim temperaturama (primjerice za analizu kemijskih vrsta koje su u izmjeni – tautomeri i rotameri). Njegov glavni nedostatak je talište na 18°C što ga čini nepogodnim za analize na nižim temperaturama kao i izuzetna higroskopnost. Deuterirana voda i metanol se smatraju protičnim otapalima koji osiguravaju izvore protona za brzu izmjenu s labilnim protonima. Komponente poput peroksida mogu disocirati u takvim otapalima pa

se u tim slučajevima ne preporučuje njihova upotreba. Kod pripreme uzorka bitno je izabrati odgovarajuće otapalo u kojem će topivost spoja biti dobra te koje neće izazvati kemijsku reakciju za vrijeme trajanja analize. Uz to, uzorak je potrebno otopiti u dovoljno otapala kako bi visina otopine uzorka pokrivala cijelo područje najveće snage i homogenosti magnetskog polja u samom središtu magneta. Osnovni NMR eksperiment je jednodimenzijski (1D) ^{1}H NMR spektar, koji se još naziva i protonski eksperiment [15]. Od svih NMR aktivnih jezgara, proton je najčešće snimana jezgra i to zbog svoje visoke prirodne izotopne zastupljenosti kao i velikog žiromagnetskog omjera te prisustva u svim organskim spojevima. Drugi dostupni NMR-aktivni izotopi pojedinih elemenata periodnog sustava su ^{13}C, ^{11}B, ^{15}N, ^{17}O, ^{19}F i ^{31}P [18]. Uz informaciju kemijskog pomaka koji ovisi o magnetskoj okolini protona u nekoj organskoj molekuli, ^{1}H NMR spektar sadrži i kvantitativne informacije jer je odziv signala direktno ovisan o broju protona koji daju taj signal. Također, integrali signala u ^{1}H NMR spektru smjese mogu se koristiti i za kvantitativnu analizu uzorka jer se iz njih mogu izračunati omjeri komponenata smjese. Jednako tako, usporedbom integralnih vrijednosti različitih rezonancija može se procijeniti čistoća uzorka i odrediti da li je potrebno daljnje pročišćavanje ili odvajanje. Druga najčešće korištena jezgra u spektroskopiji NMR je ugljikova ^{13}C. Ona je vrlo zastupljena u organskim spojevima, ali njen NMR-aktivan izotop ^{13}C ima izuzetno nisku prirodnu zastupljenost te manji žiromagnetski omjer pa se prilikom snimanja ove jezgre često mora provoditi rasprezanje s protonima kako bi se povećala osjetljivost. 1D najosjetljivija ^{13}C tehnika naziva se *engl. Distortionless Enhanced Polarization Transfer quaternary* (DEPTq) pomoću koje se mogu promatrati različiti tipovi ugljika, ovisno o broju pripojenih protona. U dvodimenzijske (2D) tehnike ubrajaju se homonuklearne tehnike kao što je ^{1}H-^{1}H *engl. Correlated Spectroscopy (COSY*) i heteronuklearne tehnike kao što je ^{1}H-^{13}C *engl. Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy*

edited (HSQCe) i ^{1}H-^{13}C *engl. Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC*). ^{1}H-^{1}H COSY se koristi za otkrivanje proton-proton skalarnih sprezanja, odnosno otkriva parove protona koji su vezani ili na istom ugljikovom atomu (CH_2 skupina) ili na ugljikovim atomima koji su direktni susjedi. ^{1}H-^{1}H COSY (slika 28 u dodatku) se može zamisliti kao kvadrat koji na svojim stranicama ima 1D protonski spektar, dok se na dijagonali mogu vidjeti signali koji predstavljaju interakciju svakog protonskog signala sa samim sobom. Najbitniji ^{1}H-^{1}H COSY signali koji se koriste u analizi parova susjednih protona nalaze se u poljima iznad i ispod dijagonale. ^{1}H-^{13}C HSQCe i ^{1}H-^{13}C HMBC, kao heteronuklearne tehnike, imaju dvije dimenzije od kojih jedna predstavlja protonsku os (vodoravna), a druga ugljikovu os (okomita) (slike 29 i 30 u dodatku). 1D ^{1}H-^{13}C HSQCe prikazuje interakcije između ugljika i protona koji su vezani na taj ugljik, dok ^{1}H-^{13}C HMBC prikazuje skalarna sprezanja između protona i ugljika koji su odvojeni višestrukim vezama [15]. Uzrok postojanja različitih signala za istu, npr. protonsku jezgru u NMR spektrima je interakcija magnetskih momenata jezgri raznih atoma s magnetskim poljima. Drugim riječima, svaki proton „osjeća" svoju jedinstvenu magnetsku okolinu koja se sastoji od drugih jezgara iz molekule, elektrona iz kemijskih veza ili heteroatoma (npr. kisik, sumpor), otapala i sličnog. Ta magnetska okolina svakom protonu u molekuli daje jedinstveni kemijski pomak u NMR spektru. Osnovni uvjet da bi se taj fenomen dogodio jest da jezgra ima magnetski moment. Magnetski moment jezgri povezan je s nuklearnim spinom. Vrijednost nuklearnog spina definirana je spinskim brojem. Nuklearni magnetski moment povezan s nuklearnim spinom ovisi o svojstvima jezgre i njenom spinskom broju. Jezgre sa parnim brojem protona i neutrona imaju nuklearni spin nula i magnetski moment, dok oni s neparnim brojem protona ili neutrona posjeduju spin različit od nule i magnetski moment. Među tim jezgrama s neparnim brojem protona ili neutrona, neke jezgre

kao što su ^{1}H, ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P imaju broj okretaja ½, što je povoljno za praktičnu primjenu magnetske rezonancije [19].

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Lifitegrast nalazi svoju primjenu kao farmaceutska djelatna tvar [20], djeluje protuupalno kao LFA-1 antagonist, a na tržištu se nalazi u formi kapi za oko pod nazivom Xiidra®[21]. U farmaceutici djelatne farmaceutske tvari moraju biti višestruko karakterizirane u skladu s primjenjivim smjernicama i farmaceutskom regulativom (EMA/454576/2016)[22]. Karakterizacija s fizikalnog i kemijskog aspekta doprinosi definiranju inicijalne kvalitete sirovine, kao i definiranju kvalitete finalnog proizvoda. Najnovije smjernice u farmaceutskoj industriji poput „Kvalitete vođene dizajnom", definiraju šire poznavanje djelatne tvari poglavito u kontekstu njezine intrinzične stabilnosti koja omogućava predviđanje reaktivnosti u uvjetima pri kojima djelatna tvar i finalni proizvod mogu biti izloženi tijekom životnog ciklusa, a u konačnici mogu imati učinak na učinkovitost i sigurnost finalnog proizvoda (EMA/CHMP/ICH/167068/2004)[23]. S tim u svezi zbog nepostojanja literaturnih podataka o stabilnosti lifitegrasta kao i zbog svekolike važnosti u farmaceutskoj industriji u okviru ovoga diplomskog rada istražit će se utjecaj stres uvjeta na fizikalnu i kemijsku stabilnost lifitegrasta. Rad će uključivati inicijalnu karakterizaciju lifitegrasta te njegovo izlaganje uvjetima povišene i snižene temperature i vlažnosti, kiselina i baza, oksidansima, radikalskim inicijatorima, teškim metalima te svjetlosti u krutom stanju i u otopini. Praćenjem stabilnosti lifitegrasta i analizom kritičnih parametara poput sadržaja i razgradnih/srodnih tvari utvrdit će se stabilnost i inicijalni profil razgradnje. U nastavku rada provest će se fokusirano istraživanje kako bi se pojedini predstavnici razgradnih produkata izolirali, a zatim i strukturno karakterizirali.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Lifitegrast (Glenmark Pharmaceuticals, Maharashtra – Indija, ID uzorka 74762, ID materijala 110000307, serijski broj 82190138)

Onečišćenje A (TLC Pharmaceuticals Standards, 4410-072A 12) (**2**)

Onečišćenje C (TLC Pharmaceuticals Standards, 4487-011A1) (**3**)

3.2. Instrumenti

3.2.1. HPLC

Tablica 1. LC aparatura i uvjeti rada za analizu sadržaja

Tekućinski kromatograf	Waters
Protok	0,34 mL/min
Detektor	Waters: PDA (rezolucija 4,8 nm) γ = 259 nm
Volumen injektiranja	3 µL
Temperatura autosamplera	20°C
Kolona	ACQUITY UPLC® BEH C8 2,1 x 100 mm, 1,7 µm Oznaka: RA-K-C8-BEH-99 Serijski broj: 01633117228392 Lot br. 0163311722 Proizvođač: Waters
Temperatura kolone	59,5°C
Mobilna faza	Mobilna faza A: 20 mM amonij formijat : acetonitril R1 = 89 : 11 (V/V%) Mobilna faza B : 20 mM amonij formijat : acetonitril R1 = 30 : 70 (V/V%)
Vrijeme kromatografiranja	13 minuta

Tablica 2. LC aparatura i uvjeti rada za analizu onečišćenja

Tekućinski kromatograf	Waters
Protok	0,4 mL/min
Detektor	Waters: PDA (rezolucija 4,8 nm) γ = 210 nm
Volumen injektiranja	3 µL
Temperatura autosamplera	20°C
Kolona	ACQUITY UPLC HSS T3 2,1 x 100 mm, 1,8 µm Oznaka: RA-KT3-HSS-98(4) PART br. 186003539 S/N: 02783220915115 Lot br. 0278322091 Proizvođač: Waters
Temperatura	40°C
Mobilna faza	Mobilna faza A: 20 mM amonij formijat : acetonitril R1 = 99 : 1 (V/V%) Mobilna faza B: 20 mM amonij formijat : acetonitril R1 = 20 : 80 (V/V%)
Vrijeme kromatografiranja	30 minuta

3.2.2. NMR

Svi 1D i 2D NMR spektri snimljeni su na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu u Centru za NMR. Za potpunu asignaciju ^{1}H i ^{13}C signala, usporedbu kemijskih pomaka i konstanti sprezanja snimljeni su ^{1}H, DEPTq, ^{1}H-^{13}C-HSQCe, ^{1}H-^{13}C-HMBC i ^{1}H-^{1}H-COSY spektri. Snimani su na NMR spektrometru Bruker Avance AV600 opremljenom sa direktnom dvokanalnom probom i Z-gradijentima. Eksperimenti su provedeni snimanjem uzoraka pri 25°C i 80°C u NMR cjevčicama promjera 3.0 mm. Uzorci su otopljeni u DMSO-d_6 otapalu. Spektri su dobiveni korištenjem standardnih Brukerovih pulsnih sljedova, a dobiveni podaci su obrađivani pomoću programskog paketa Bruker

TopSpin. Detaljni eksperimentalni parametri nalaze se na kraju rada pod naslovom „DODACI".

3.3. Metode

3.3.1. Priprema uzoraka

3.3.1.1. Inicijalna studija

Tablica 3. Priprema uzoraka inicijalne studije

Oznaka uzoraka	**Uvjet**	**Masa (lifitegrast)**	**Volumen (otapalo)**
1	50°C	0,1 g	/
2	50°C/75%RV	0,1 g	/
3	25°C/45%RV (foto)	0,1 g	/
4	Vodena otopina pH=7; fotokomora	0,05 g	17 mL (9 mL vodene otopine i 8 mL ACN-a)
5	0,1 N HCl; 50°C/75%RV	0,05 g	17 mL (9 ml HCl-a i 8 mL ACN-a)
6	Vodena otopina; 50°C/75%RV	0,05 g	17 mL (9 mL vodene otopine i 8 mL ACN-a)
7	0,1 N NaOH; 50°C/75%RV	0,05 g	17 mL (9 mL NaOH i 8 mL ACN-a)
8	3% H_2O_2; 50°C/75%RV	0,05 g	17 mL (9 mL 3% H_2O_2 i 8 mL ACN-a)
9	Vodena otopina pH=7 i AIBN; 50°C/75%RV	0,05 g	17 mL (9 mL vodene otopine i 8 mL ACN-a)
10	50°C/75%RV (kontrola)	0,05 g	17 mL (ACN)

U svrhu određivanja sadržaja i srodnih tvari te ispitivanja uvjeta pri kojima supstancija lifitegrast pokazuje najveći potencijal razgradnje, provedena je inicijalna studija s deset uzoraka u trajanju od sedam dana na definiranim uvjetima. Ispitani su uzorci u krutom stanju i u otopini. Koristeći analitičku vagu (Mettler Toledo) odvagnuto je po 0,1 g lifitegrasta u tri posudice za vaganje za ispitivanje stabilnosti u čvrstom stanju te sedam uzoraka po 0,05 g u tamne bočice s plastičnim čepom za ispitivanje stabilnosti u otopini. Za krute uzorke, ispitivao se utjecaj temperature, relativne vlažnosti i fotostabilnost. Za otopine uzoraka, uz utjecaj temperature i relativne vlažnosti, ispitivala se stabilnost u vodenoj otopini i vodenoj otopini pH = 7, fotostabilnost, kisela i alkalna hidroliza te je provedena i oksidacijska studija sa H_2O_2 i radikalnim inicijatorom AIBN. Za uzorak 4, provjera pH vodene otopine izvršena je pH metrom (Mettler Toledo) te je pH iznosio 5,43. Stoga je bilo potrebno dodati par µL 0,1 M NaOH nakon čega se pH povisio na 7,26 (ista vodena otopina korištena je i za uzorak 9). Za uzorak 5, 0,1 N HCl pripremljena je iz 37% HCl (Merck KgaA). Odmjereno je 0,83 mL 37% HCl i razrijeđeno ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Za uzorak 7, 0,1 N NaOH pripremljena je otapanjem 0,4 g krutog NaOH (Kefo) ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Za uzorak 8, 3% H_2O_2 pripremljen je razrjeđivanjem 10 mL 30% H_2O_2 (CARLO ERBA S.A.S) u odmjernoj tikvici od 100 mL. Za uzorak 9, bilo je potrebno odvagnuti 0,013 g AIBN-a (ACROS ORGANICS). S obzirom da se lifitegrast nije odmah otopio u uzorcima 4-10, otapanje je potpomognuto s ultrazvučnom kupelji (Iskra Pio d.o.o, Sonis 4). Uzorci su izvađeni iz komora nakon sedam dana. Prema analitičkom protokolu morala se prilagoditi koncentracija otopina uzoraka koncentraciji metode koja je bila postavljena na 5%. Za sadržaj su rađene dvije pripreme (priprema 1 i priprema 2). Za svaku je odmjereno 1,7 mL otopine uzorka u odmjernu tikvicu od 100 mL te razrijeđeno otapalom do oznake i dobro promućkano. Korišteno otapalo je voda za

kromatografiju R : acetonitril R1 = 90:10 (V/V%). Za prilagodbu krutih uzoraka, od početnih 0,1 g lifitegrasta odvagnuto je 0,05 g i otopljeno u 17 mL čistog ACN-a (J.T.Baker). Otapanje lifitegrasta potpomognuto je s ultrazvučnom kupelji. Potrebno je bilo pripremiti i dvije poredbene otopine. U odmjernu tikvicu od 20 mL izvagano je 12,5 mg lifitegrasta i otopljeno u 5 mL acetonitrila R1 uz pomoć ultrazvučne kupelji, razrijeđeno vodom za kromatografiju R i dobro promućkano. Od dobivene otopine, 4 mL je razrijeđeno do 50 mL otapalom i promućkano. Uzorci i poredbene otopine su profiltrirani kroz membranski filter papir veličine pora 0,2 µm (Macherey-Nagel), raspunjeni u vijale i analizirani.

Za analizu onečišćenja, odmjereno je po 2,7 mL otopine uzoraka u odmjerne tikvice od 20 mL te razrijeđeno otapalom do oznake i dobro promućkano. Korišteno otapalo je voda za kromatografiju R : acetonitril R1 = 99:1 (V/V%). Analitički protokol zahtijevao je jednu poredbenu otopinu. Potrebno je bilo razrijediti 0,5 mL filtrirane otopine uzorka do 100 mL otapalom i dobro promućkati. Uzorci i poredbena otopina su profiltrirani kroz membranski filter papir veličine pora 0,2 µm, raspunjeni u vijale i analizirani.

3.3.1.2. Glavna studija

Tablica 4. Priprema uzoraka glavne studije

Oznaka uzoraka	**Uvjet (25°C/60%RV, 40°C/75%RV i 50°C/75%RV; T_0, T_{15} i T_{30})**	**Masa (lifitegrast)**	**Volumen (otapalo)**
1	0,1 N HCl	0,05 g	17 mL (9 mL HCl-a i 8 mL ACN-a)
2	0,1 N NaOH	0,05 g	17 mL (9 mL NaOH i 8 mL ACN-a)

3	3% H_2O_2	0,05 g	17 mL (9 mL H_2O_2 i 8 mL ACN-a)
4	Vodena otopina pH=7 i AIBN	0,05 g	17 mL (9 ml vodene otopine pH = 7 i 8 mL ACN-a)
5	ACN (kontrola)	0,05 g	17 mL
6	Vodena otopina pH = 7	0,05 g	17 mL (9 mL vodene otopine pH = 7 i 8 mL ACN-a)
7	Vodena otopina pH = 7	0,05 g	17 mL

Cilj glavne studije bio je sagledati uvjete iz inicijalne studije pri kojima supstancija lifitegrast pokazuje najveći potencijal razgradnje. Studija je napravljena pri različitim temperaturama u različitim vremenskim periodima. Pripremljene su otopine uzoraka i ispitan je utjecaj kisele i bazne hidrolize, oksidativne razgradnje i utjecaj AIBN-a na stabilnost lifitegrasta pri uvjetima 25°C/60%RV, 40°C/75%RV i 50°C/75%RV pri točkama T_0, T_{15} i T_{30}. Za uzorak 4, pH vodene otopine provjeren je pH metrom i iznosio je 6,24. Povišen je sa 0,1 N NaOH na 7,40 (ista vodena otopina korištena je i za uzorak 6 i 7). Kontrola 5 pripremljena je za sve uvjete, kontrola 6 za uvjet 25°C/60%RV, 40°C/75%RV i 50°C/75%RV na T_{30}, a kontrola 7 samo za uvjet 50°C/75%RV na T_{30}. Koncentracije otopine uzoraka iz tablice 4, prilagođene su koncentraciji metode (kao i uzorci iz inicijalne studije) te pripremljeni za HPLC analize sadržaja i onečišćenja.

3.3.2. Izolacija nepoznatih onečišćenja

3.3.2.1. Kolonska kromatografija

Paralelno s glavnom studijom pripremljena je otopina lifitegrasta u H_2O_2 u omjeru 1:6 pri čemu je odvagnuto 1 g lifitegrasta i otopljeno u 18 mL 30% H_2O_2. Otopina je stavljena u komoru stabilnosti na uvjet

50°C/75%RV na vremenski period od tri mjeseca. Potom je provedena vakuum filtracija prilikom koje je lifitegrast ispran s vodom i posušen u eksikatoru, a dobivena konačna masa produkta iznosila je 0,231 g. Od toga, odvagnuto je 0,015 g i obrađeno kolonskom kromatografijom. Kolona je upakirana po uzoru na suhu metodu. Pripremljeno je 200 mL mobilne faze u omjeru etil acetat (EtOAc): etanol (EtOH)= 4 : 6 te odvagnuto 10 g suhe stacionarne faze (Kieselgel 60, 0,063 – 0,2 mm). Nakon pakiranja kolone, dodan je pijesak i mobilnom fazom su isprane stijenke kolone. Ostatak mobilne faze je propušten u pijesak. Potom je dodan odvagnuti uzorak koji je prethodno otopljen u svega 1 mL mobilne faze i propušten u pijesak te je ponovno dodana mobilna faza. Skupljene su frakcije i provedena je analiza dobivenih frakcija tankoslojnom kromatografijom. Isti postupak ponovljen je nekoliko puta u svrhu prikupljanja što veće količine traženih nepoznatih supstancija. Svaka frakcija analizirana je tanskoslojnom kromatografijom uz standard lifitegrasta i onečišćenja C. Za svaku supstanciju na kromatogramu je određen i faktor zaostajanja (*engl. Retention Factor, Rf*) kako bi se supstancija inicijalno karakterizirala. Po završetku izolacije, frakcije od značaja odvojene su u okrugle tikvice s ubrušenim grlom. Otapalo je otpareno rotavaporom (IKA RV10 digital) kako bi se dobio produkt.

3.3.2.2. Preparativna tankoslojna kromatografija

Na HPTLC Kieselgel 60 pločicu s UV indikatorom F_{254} nanijet je standard lifitegrasta, onečišćenje C i uzorak 1 g lifitegrasta iz 30% H_2O_2 (od početne mase 0,231 g) i otopljen je u metanolu. Na drugu HPTLC Kieselgel 60 pločicu bez UV indikatora nanijet je samo uzorak po duljini pločice. Obje pločice stavljene su u kupelj u kojoj se nalazila mobilna faza EtOAc : EtOH = 4 : 6. Pomoću preparativne tankoslojne kromatografije izolirane su tri supstancije sa svojstvom luminiscencije na različitim pozicijama pri čemu su izmjerene njihove Rf vrijednosti. Sastrugane su na satno staklo, a potom prebačene u staklene tamne

bočice s plastičnim čepom. Na dno šprice od 10 mL (BD Emerald) stavljena je vata i dodan je sastrugani silikagel te ravnomjerno raspoređen na dnu vate. Nakon toga, dodana je mobilna faza i polagano propuštana kroz špricu u okruglu tikvicu od 10 mL. Na taj način, šprica je isprana nekoliko puta i pomoću TLC-a je provjeravano je li se dobila tražena supstancija. Po završetku, otapalo je otpareno pomoću rotavapora. Isti postupak ponovljen je za sve mrlje koje su se nalazile na pločici sa UV indikatorom i bez UV indikatora.

4. REZULTATI

Lifitegrast je dobavljen od proizvođača Glenmark Pharmaceuticals te je sirovina analizirana na kritične atribute kvalitete. Analizom na jednom kontrolnom broju sirovine (serijski broj 82190138) utvrđeno je da sirovina odgovara zahtjevima kvalitete te se može koristiti u daljnjim studijama. Podatci specifikacije nalaze se u tablici 5.

Tablica 5. Specifikacijski zahtjevi sirovine lifitegrast proizvođača Glenmark i rezultati analize (serijski broj 82190138)

Parametar	**Zahtjev**	**Rezultat**
Osobine	Bijeli do blago žuti prah	Bijeli prah
Topljivost u metilen kloridu	Topljiv	Topljiv
Identifikacija IR	IR spektar mora odgovarati IR spektru referentnog standarda	Odgovara
Stereokemijska čistoća (HPLC)	Retencijsko vrijeme glavnog pika mora odgovarati retencijskom vremenu standarda	Odgovara
Sadržaj vode (Karl Fisher)	Ne više od 3,5 %w/w	1,91 %w/w
Sulfatni pepeo (gravimetrija)	Ne više od 0,10 %w/w	0,05 %w/w
Ukupna onečišćenja (HPLC)	Ne više od 1,0 %w/w	0,14 % w/w
Sadržaj benzilamina (HPLC)	Ne više od 0,15 % w/w	Ispod limita kvantifikacije

Sadržaj litija (AAS)	Ne više od 1000 ppm	Ispod limita kvantifikacije
Ostatna otapala	ACN (ne više od 410 ppm), EtOAc (ne više od 5000 ppm), heksan (ne više od 290 ppm), metanol (ne više od 3000 ppm), toluen (ne više od 890 ppm)	Nije detektirano

Budući da je inicijalna karakterizacija sirovine pokazala da je lifitegrast unutar postavljenih zahtjeva kvalitete, omogućila se provedba inicijalne studije čiji su rezultati prikazani u tablici 6.

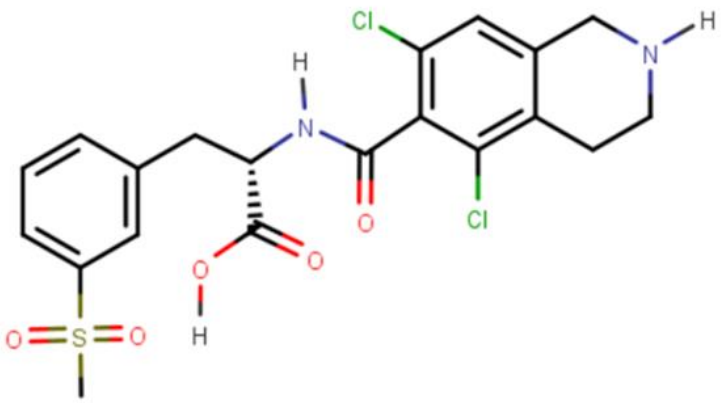
Tablica 6. Sadržaj i onečišćenja krutih i otopina uzoraka (inicijalna studija)

Oznaka uzoraka	**Uvjet**	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
1	50°C	103,9%	C (0,09%)	0,4%
2	50°C/75%RV	101,8%	A (0,1%) C (0,1%)	0,2%
3	25°C/45%RV (foto)	101,5%	C (0,1%)	2,2%
4	Vodena otopina pH=7; fotokomora	106,2%	A (0,1%) C (0,1%)	0,6%
5	0,1 N HCl; 50°C/75%RV	108,7%	A (2,6%) C (0,8%)	3,5%
6	Vodena otopina; 50°C/75%RV	103,2%	A (0,1%) C (0,1%)	0,2%
7	0,1 N NaOH; 50°C/75%RV	89,7%	A (22,5%) C (6,8%)	29,7%
8	3% H_2O_2; 50°C/75%RV	98,2%	A (0,7%) C (2,1%)	13,8%

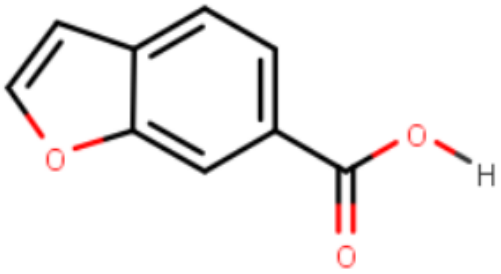
9	Vodena otopina pH=7 i AIBN; 50°C/75%RV	17,5%	A (0,4%) C (2,3%)	78,5%
10	17 mL ACN-a; 50°C/75%RV (kontrola)	102,1%	C (0,1%)	0,1%

Inicijalna studija pokazuje da je lifitegrast kao djelatna tvar u čvrstom stanju stabilan u svim ispitivanim uvjetima čvrstog stanja. Potvrđena je njegova stabilnost pri povišenoj temperaturi i fotostabilnost pri foto uvjetima. Temeljem toga može se zaključiti da je lifitegrast stabilan u krutom stanju, a kao farmaceutska aktivna tvar nalazi se na tržištu u formi krutine.

U pokusu kisele i bazne hidrolize došlo je do pucanja amidne veze B (prikazana na slici 1) i stvaranja poznatih onečišćenja *(S)*-2-(5,7-dikloro-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-karboksamido)-3-(3-(metilsulfonil)fenil)propanska kiselina (**2**) poznato kao onečišćenje A i benzofuran-6-karboksilna kiselina (**3**) poznato kao onečišćenje C što znači da kiseli i alkalni medij utječu na hidrolitičku stabilnost lifitegrasta. Strukture onečišćenja A i C su prikazane na slikama 2 i 3.



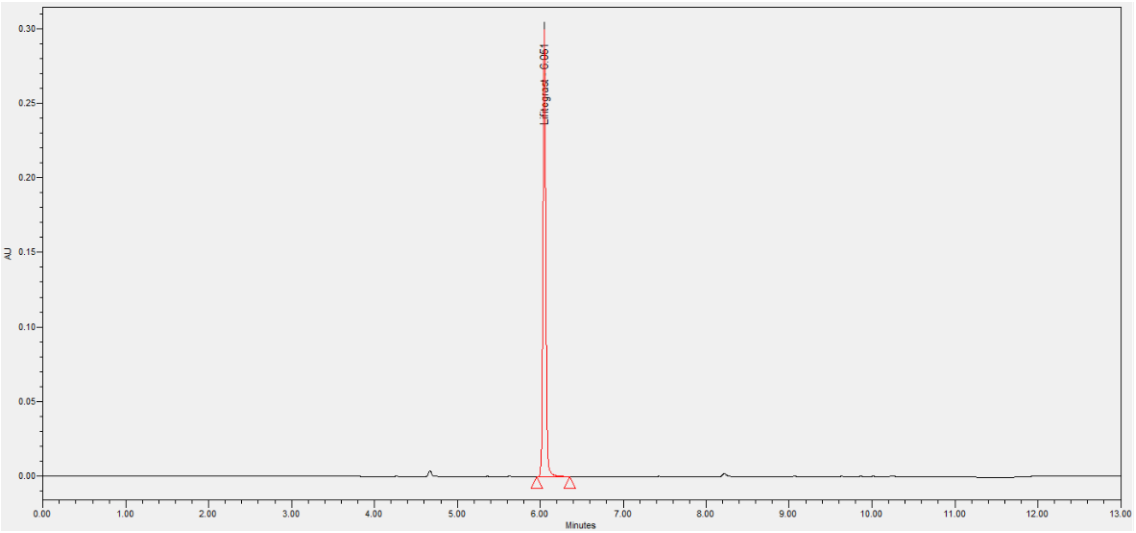
Slika 2. *Onečišćenje* **2** (Izvor:MarvinSketch)



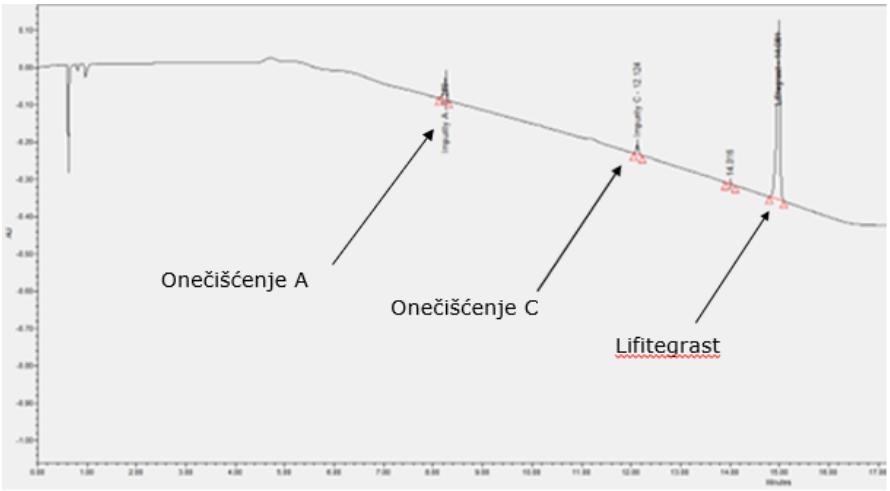
Slika 3. *Onečišćenje* **3** (Izvor: MarvinSketch)

Uz poznata onečišćenja, lifitegrast se razgrađuje i na nepoznata onečišćenja, što je vidljivo po ukupnom postotku onečišćenja.

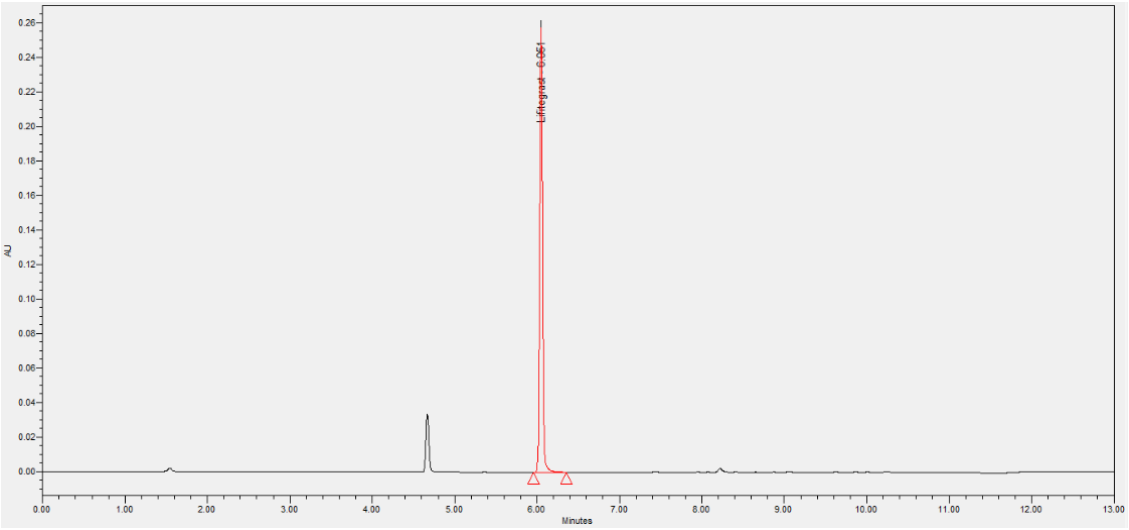
Razgradnja je proučavana i s 3% H_2O_2 pri čemu je došlo do hidrolize i stvaranja nepoznatih onečišćenja. Također, vodena otopina pH=7 s radikalskim inicijatorom AIBN-om dovodi do značajne razgradnje lifitegrasta na poznata onečišćenja A i C te nepoznata onečišćenja (sadržaj neizreagiranog lifitegrasta je 17,5%). AIBN je molekula siromašna elektronima i može sudjelovati u interakciji s elektronima bogatim skupinama. Na kontroli nije uočena razgradnja jer je koncentracija istog veća od 100%, a to je unutar analitičke pogreške mjerenja. U nastavku su prikazani kromatogrami sadržaja lifitegrasta i pojedinačnih onečišćenja pri različitim uvjetima ispitivanja.



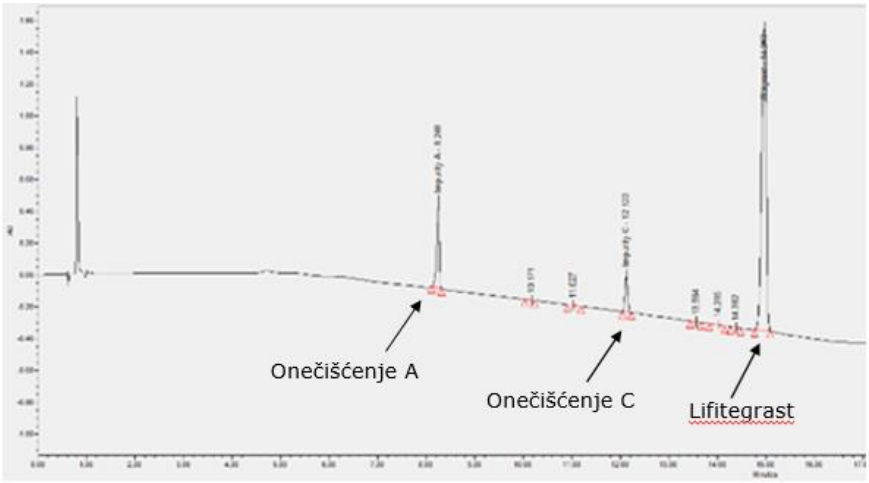
Slika 4. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog kiseloj hidrolizi pri temp. 50°C/75%RV*



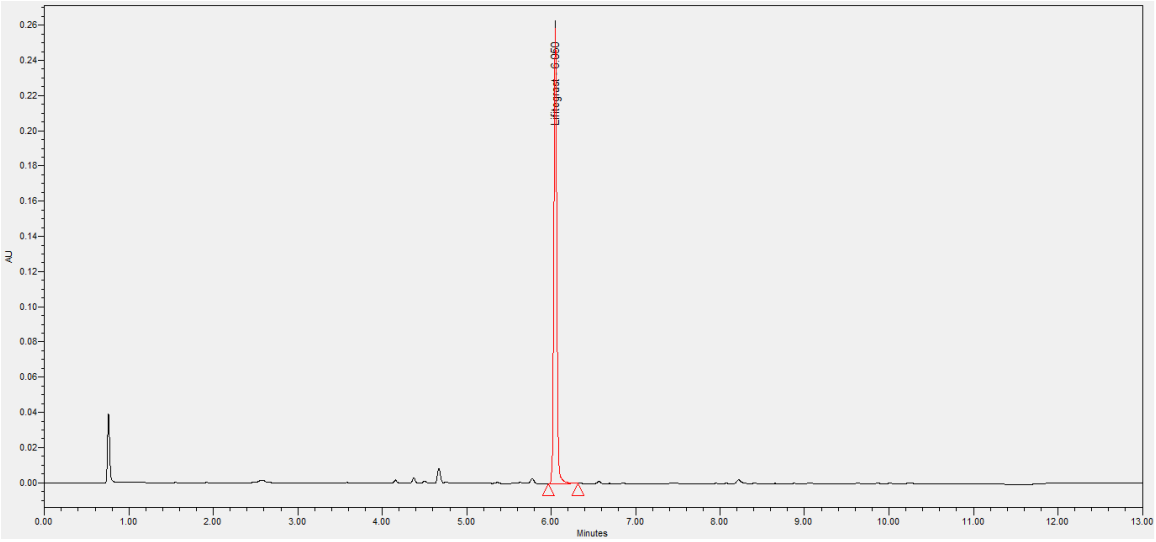
Slika 5. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog kiseloj hidrolizi pri temp. 50°C/75%RV*



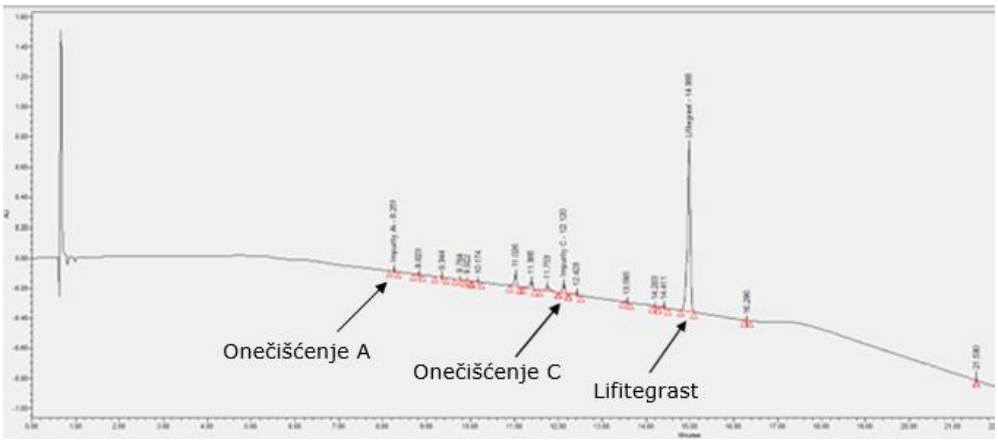
Slika 6. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog alkalnoj hidrolizi pri temp. 50°C/75%RV*



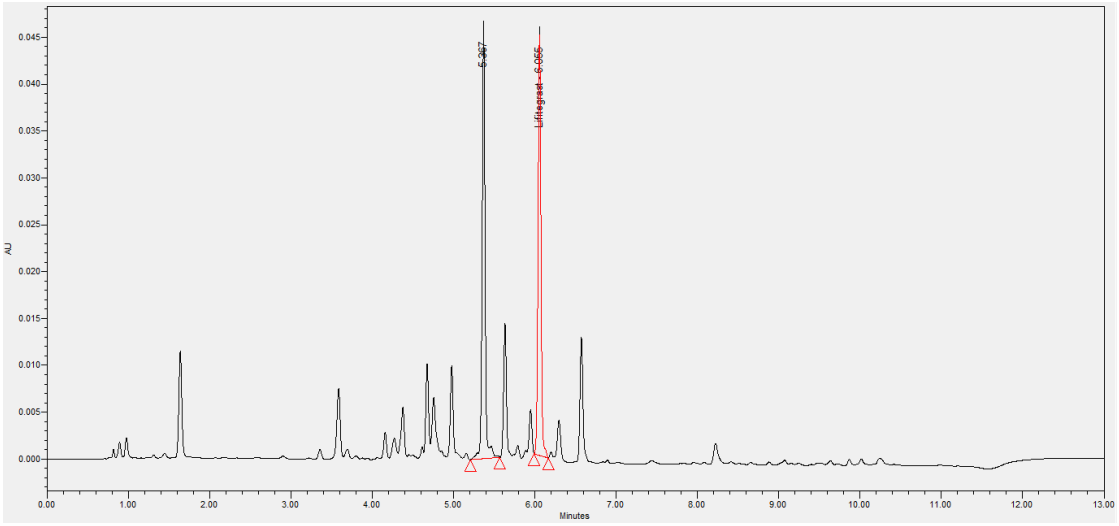
Slika 7. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog alkalnoj hidrolizi pri temp. 50°C/75%RV*



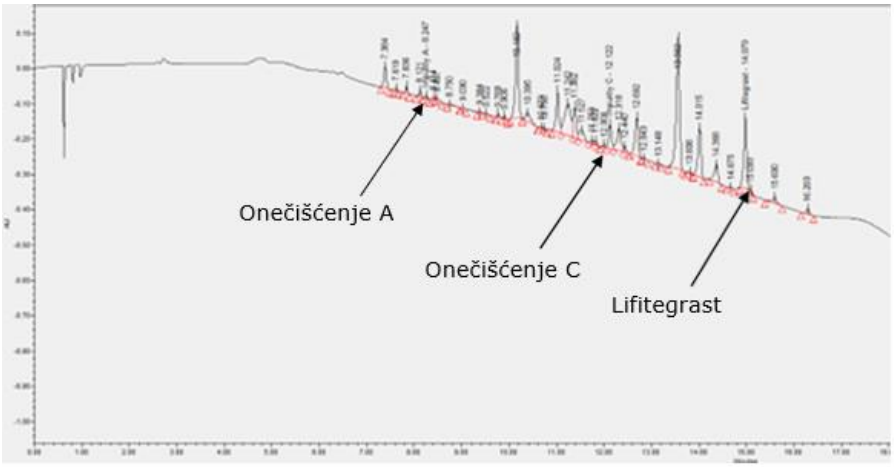
Slika 8. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog oksidaciji s H_2O_2 pri temp. 50°C/75%RV*



Slika 9. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog oksidaciji s H_2O_2 pri temp. 50°C/75%RV*



Slika 10. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog oksidaciji s AIBN-om pri temp. 50°C/75%RV*



Slika 11. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog oksidaciji s AIBN-om pri temp. 50°C/75%RV*

S obzirom da je inicijalna studija, kao orijentacijska studija, dokazala da lifitegrast podliježe razgradnji pod utjecajem visoke temperature, osobito u slučaju hidrolize i oksidacije, došlo je do potrebe provedbe glavne studije kako bi se ispitao maksimalan intenzitet razgradnje. Glavnom studijom se promatrao utjecaj različitih temperatura pri različitim vremenskim periodima na hidrolizu i oksidaciju lifitegrasta u zavisnosti o različitim uvjetima (tablica iz eksperimentalnog dijela).

Tablica 7. Prikaz uzorka kisele hidrolize pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 25°C/60%RV	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
T_0	102,9%	*nd	0,0%
T_{15}	102,7%	A (0,5%) C (0,2%)	0,7%
T_{30}	106,3%	A (0,9%) C (0,3%)	1,2%
Temperatura 40°C/75%RV			
T_0	102,9%	nd	0,0%
T_{15}	98,9%	A (1,6%) C (0,5%)	2,4%
T_{30}	97,5%	A (3,1%) C (1,0%)	4,3%

Temperatura 50°C/75%RV			
T_0	102,9%	nd	0,0%
T_{15}	98,1%	A (4,1%) C (1,3%)	6,2%
T_{30}	101,5%	A (10,1%) C (3,2%)	14,7%

*nd – nije detektirano

Tablica 8. Prikaz uzorka alkalne hidrolize pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 25°C/60%RV	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
T_0	106,8%	A (2,1%) C (0,7%)	2,8%
T_{15}	88,4%	A (11,5%) C (3,8%)	15,3%
T_{30}	88,5%	A (12,1%) C (4,0%)	16,0%
Temperatura 40°C/75%RV			
T_0	106,8%	nd	0,0%
T_{15}	89,8%	A (10,9%) C (3,6%)	14,6%
T_{30}	88,2%	A (12,3%) C (4,1%)	16,4%
Temperatura 50°C/75%RV			
T_0	106,8%	nd	0,0%
T_{15}	91,3%	A (10,1%) C (3,3%)	13,6%

T_{30}	89,3%	A (10,7%) C (3,5%)	14,2%

Tablica 9. Prikaz uzorka oksidacije s H_2O_2 pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 25°C/60%RV	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
T_0	92,0%	nd	0,1%
T_{15}	94,8%	A (0,3%) C (1,4%)	3,1%
T_{30}	77,2%	A (0,2%) C (0,3%)	8,7%
Temperatura 40°C/75%RV			
T_0	92,0%	nd	0,0%
T_{15}	83,2%	A (1,0%) C (1,1%)	9,6%
T_{30}	20,6%	A(1,0%) C (0,4%)	34,9%
Temperatura 50°C/75%RV			
T_0	92,0%	nd	0,0%
T_{15}	58,4%	A (0,2%) C (1,1%)	20,9%
T_{30}	16,9%	A (0,1%) C (0,8%)	30,1%

Tablica 10. Prikaz uzorka oksidacije s AIBN-om pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 25°C/60%RV	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
T_0	102,2%	nd	0,2%
T_{15}	88,7%	C (0,3%)	7,5%
T_{30}	77,4%	A (0,1%) C (0,5%)	11,1%
Temperatura 40°C/75%RV			
T_0	102,2%	nd	0,0%
T_{15}	40,6%	A (0,1%) C (1,1,%)	28,5%
T_{30}	28,0%	A (0,2%) C (1,4%)	36,1%
Temperatura 50°C/75%RV			
T_0	102,2%	nd	0,0%
T_{15}	17,0%	A (0,2%) C (1,6%)	47,8%
T_{30}	14,0%	A (0,3%) C (1,7%)	48,9%

Tablica 11. Kontrola (uzorak 5) pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 25°C/60%RV	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
T_0	107,1%	nd	0,0%
T_{15}	110,2%	nd	0,0%
T_{30}	101,8%	C (0,4%)	0,4%
Temperatura 40°C/75%RV			
T_0	107,1%	nd	0,0%
T_{15}	111,7%	nd	0,0%
T_{30}	101,7%	nd	0,0%
Temperatura 50°C/75%RV			
T_0	nd	nd	0,0%
T_{15}	110,1%	nd	0,0%
T_{30}	112,7%	C (0,1%)	0,0%

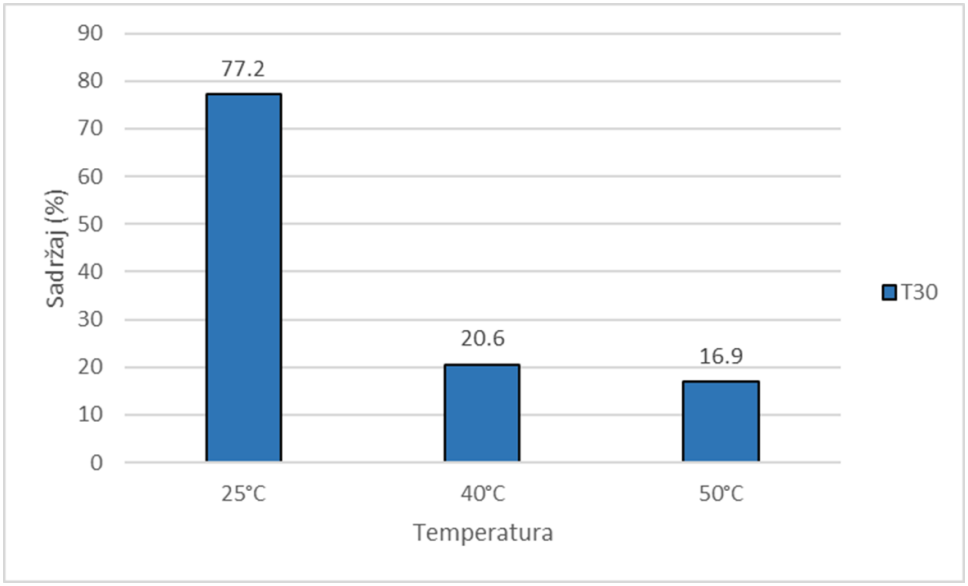
Tablica 12. Kontrola (uzorak 6) pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 25°C/60%RV	**Sadržaj lifitegrasta**	**Pojedinačna onečišćenja**	**Sadržaj ukupnih onečišćenja**
T_{30}	101,4%	nd	0,0%
Temperatura 40°C/75%RV			
T_{30}	100,4%	A (0,1%)	0,0%
Temperatura 50°C/75%RV			
T_{30}	106,4%	A (0,1%) C (0,1%)	0,0%

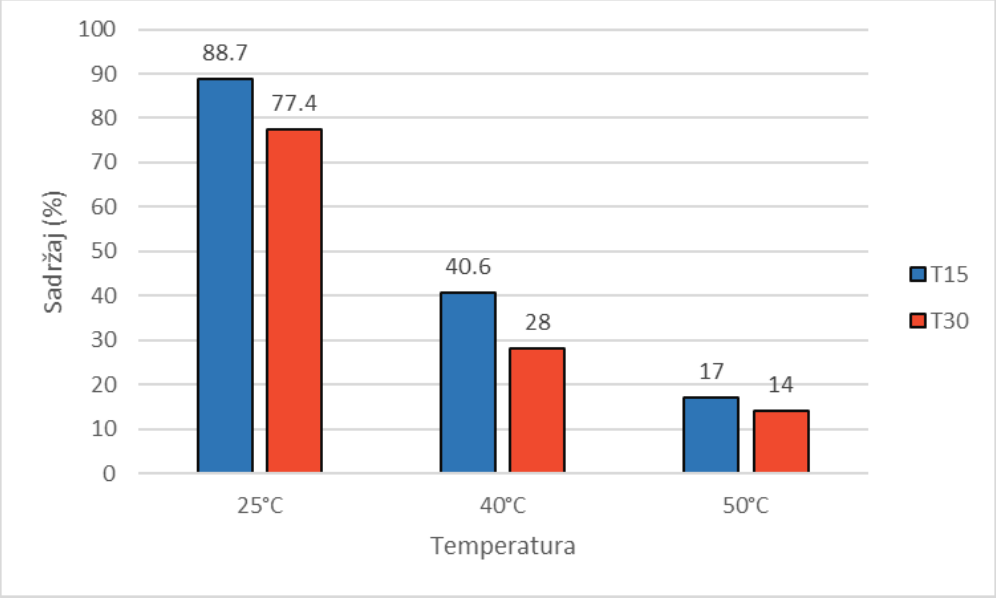
Tablica 13. Kontrola (uzorak 7) pri različitim temperaturama i vremenskim periodima

Temperatura 50°C/75%RV	**Sadržaj lifitegrasta**		
		A (0,1%)	
T_{30}	12,8%	C (0,2%)	0,9%

Iz glavne studije može se uočiti da sadržaj lifitegrasta opada s porastom temperature unutar određenog vremenskog perioda. Najveći postotak onečišćenja nastao je oksidativnom razgradnjom uz 3% H_2O_2 i radikalski inicijator AIBN, što potvrđujemo stupčastim dijagramima prikazanim na slikama 12 i 13. Na njima je prikazan najveći pad u sadržaju lifitegrasta. Također, na T_0 na 25°C/60%RV gotovo nema razgradnje pa se može potvrditi da je sirovina lifitegrast stabilna pri dnevnim uvjetima. Uzorak 7 (kontrola – lifitegrast otopljen u 17 mL ACN-a) pokazuje samo 12,8% sadržaja lifitegrasta i manje od 1% onečišćenja. Razlog tomu je vrlo slaba topljivost lifitegrasta u vodenoj otopini.

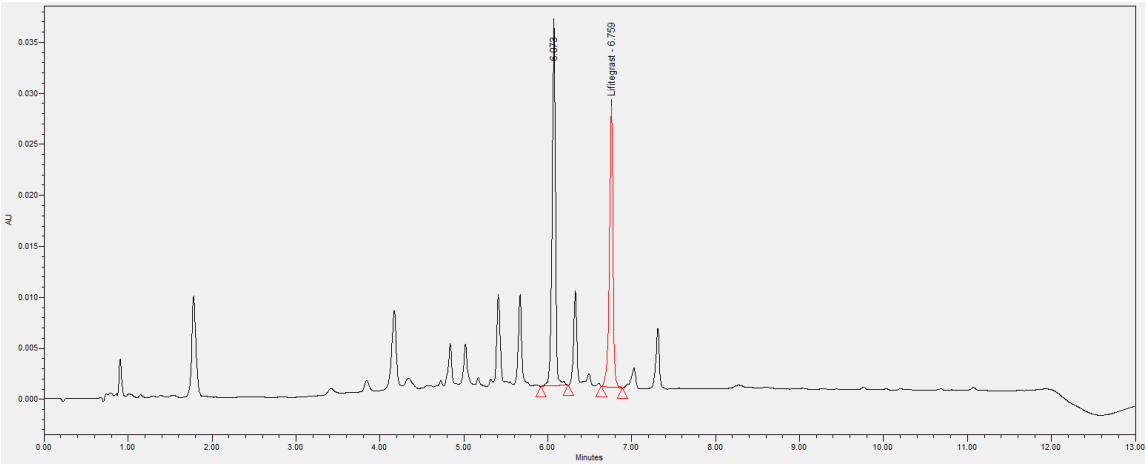


Slika 12. *Oksidativna razgradnja (s H_2O_2) na 25°C/60%RV, 40°C/75%RV i 50°C/75%RV unutar T_{30}*

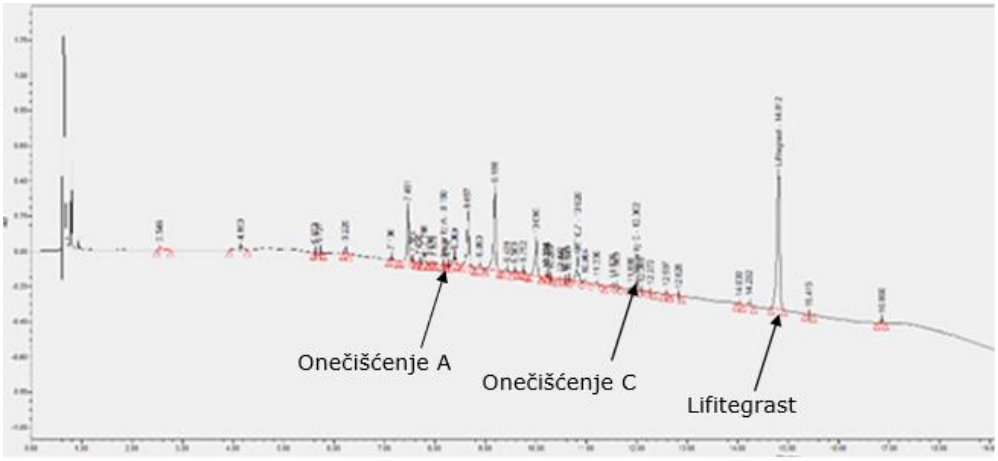


Slika 13. *Oksidativna razgradnja (s AIBN-om) na 25°C/60%RV, 40°C/75%RV i 50°C/75%RV unutar T_{15} i T_{30}*

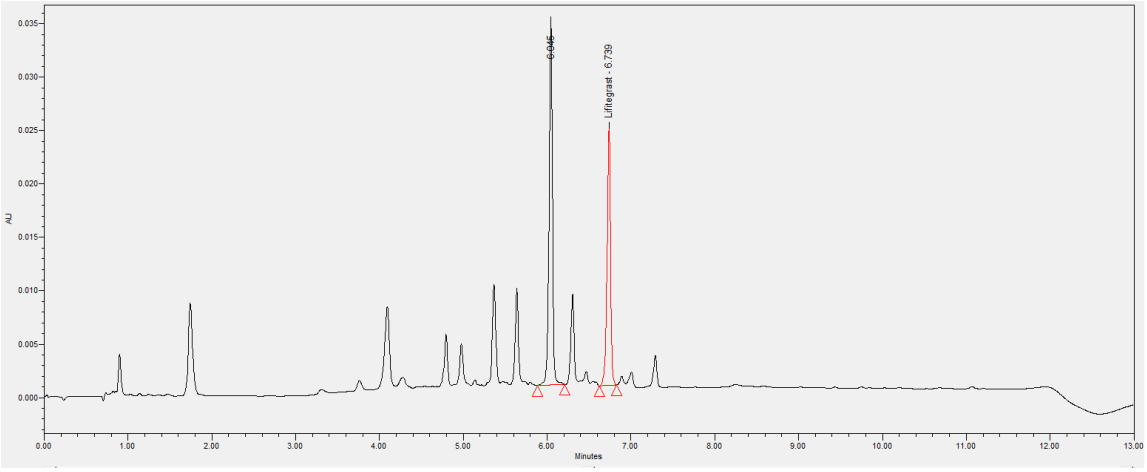
U nastavku su izdvojeni kromatogrami sadržaja i onečišćenja za uzorke oksidativne razgradnje s najmanjim postotkom sadržaja lifitegrasta i najvećim postotkom sadržaja ukupnih onečišćenja.



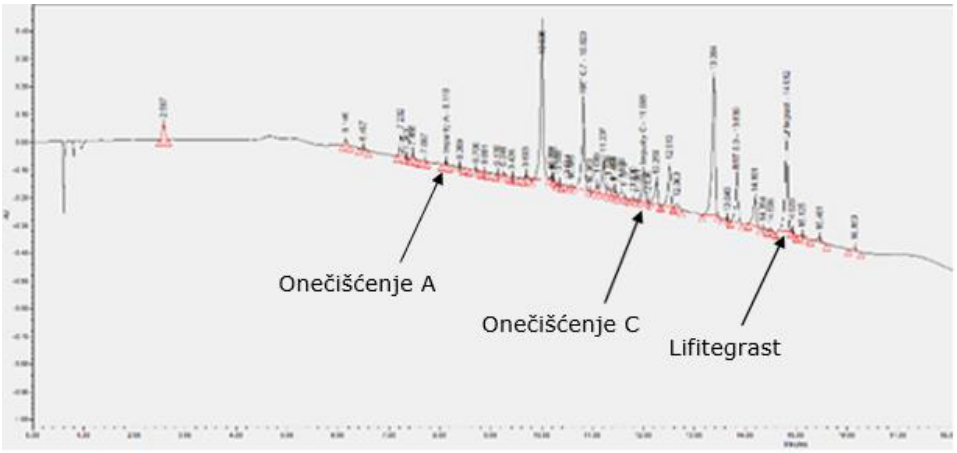
Slika 14. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog oksidaciji s H_2O_2 (T_{30} - 50°C/75%RV)*



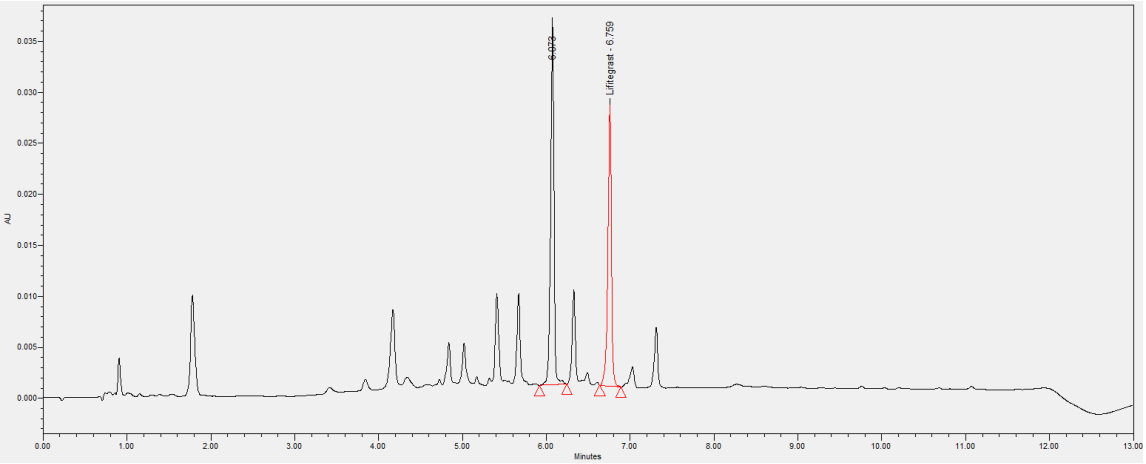
Slika 15. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog oksidaciji s H_2O_2 (T_{30} - 50°C/75%RV)*



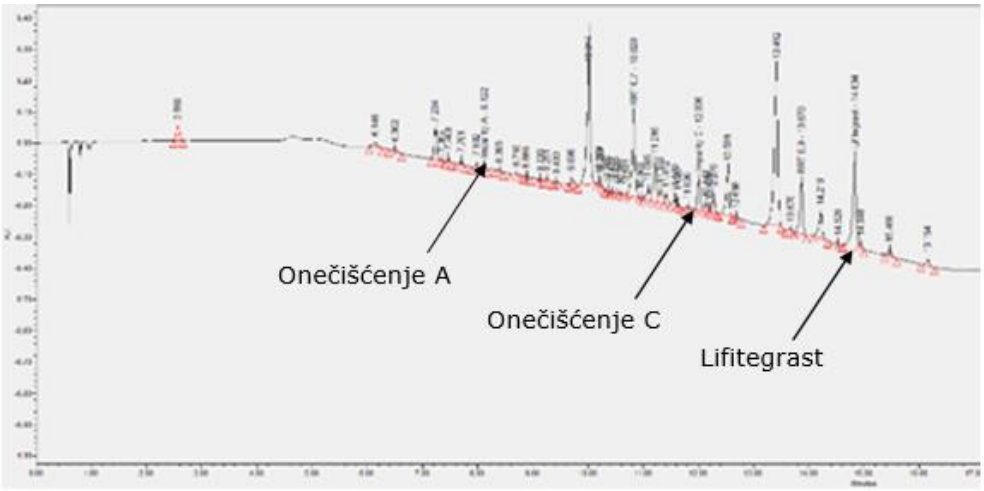
Slika 16. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog oksidaciji s AIBN-om (T_{30} - 50°C/75%RV)*



Slika 17. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog oksidaciji s AIBN-om (T_{30} - 50°C/75%RV)*



Slika 18. *Kromatogram sadržaja uzorka izlaganog oksidaciji s AIBN-om (T_{15} - 50°C/75%RV)*



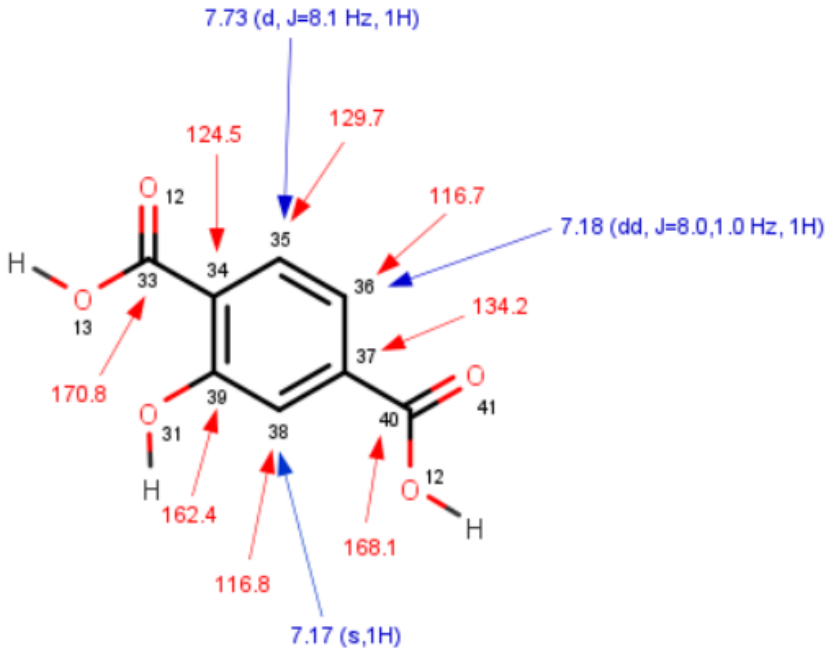
Slika 19. *Kromatogram onečišćenja uzorka izlaganog oksidaciji s AIBN-om (T_{15} - 50°C/75%RV)*

Obzirom na činjenicu da je uočena značajna razgradnja lifitegrasta u prisustvu H_2O_2 proveden je preparativni pokus izlaganjem lifitegrasta 30% H_2O_2 u vremenskom rasponu od tri mjeseca pri uvjetu 50°C/75%RV. Lifitegrast se tijekom promatranog perioda kvantitativno razgradio na tri nepoznate supstancije. Primjenom kolonske kromatografije izolirano je 9,9 mg uzorka nepoznate supstancije koja pokazuje svojstvo luminiscencije sa Rf vrijednosti

0,74 te 10,1 mg uzorka nepoznate neluminiscirajuće supstancije sa Rf vrijednosti 0,65, dok je preparativnom tankoslojnom kromatografijom izolirano 90,9 mg uzorka supstancije čiji je Rf iznosio 0,89, zatim 3,9 mg uzorka supstancije sa Rf vrijednosti 0,67 i 2,8 mg uzorka supstancije sa Rf vrijednosti 0,56.

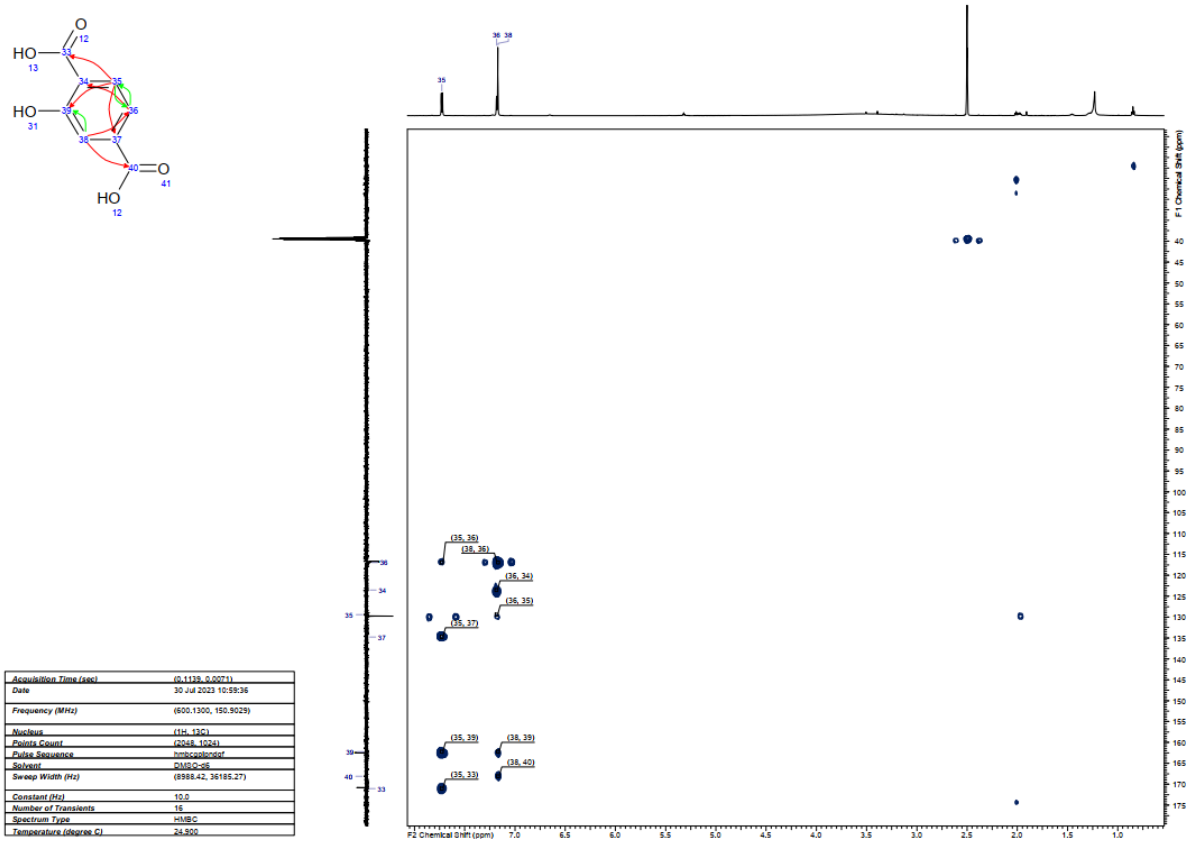
NMR analiza nije provedena na uzorku Rf 0,89 (90,9 mg) zato što je inicijalno snimljeni ^{1}H NMR spektar sadržavao samo signale otapala, nečistoća i ostatnih otapala. Iako je ^{1}H NMR spektar uzorka Rf 0,56 (2,8 mg) sadržavao nekoliko signala u aromatskom području, potpuna NMR analiza također nije bila moguća zbog niske koncentracije tog spoja. U preostalim uzorcima identificirane su tri strukture (u nastavku rada pod nazivima spoj **4**, **5** i **6**) od kojih je jedna nedvojbeno dokazana NMR spektroskopijom, dok su dvije predložene na osnovu NMR spektara te ih treba dodatno potvrditi kompatibilnim eksperimentalnim tehnikama. Sve tri strukture prikazane su na shemi 1.

Spoj 2-hidroksibenzen-1,4-dikarboksilna kiselina (**4**), molekulske formule $C_8H_6O_5$, je onečišćenje lifitegrasta izolirano preparativnom tankoslojnom kromatografijom. Ujedno, to onečišćenje pokazuje svojstvo luminiscencije, što se očitovalo i na tankome sloju. Struktura spoja **4** prikazana je na slici 20.



Slika 20. *^{1}H (600 MHz, plavo) i ^{13}C (151 MHz, crveno) NMR kemijski pomaci za strukturu spoja* **4** *u DMSO-d_6 pri 25 °C, jedinica ppm nije navedena zbog jasnoće prikaza* (Izvor: MarvinSketch)

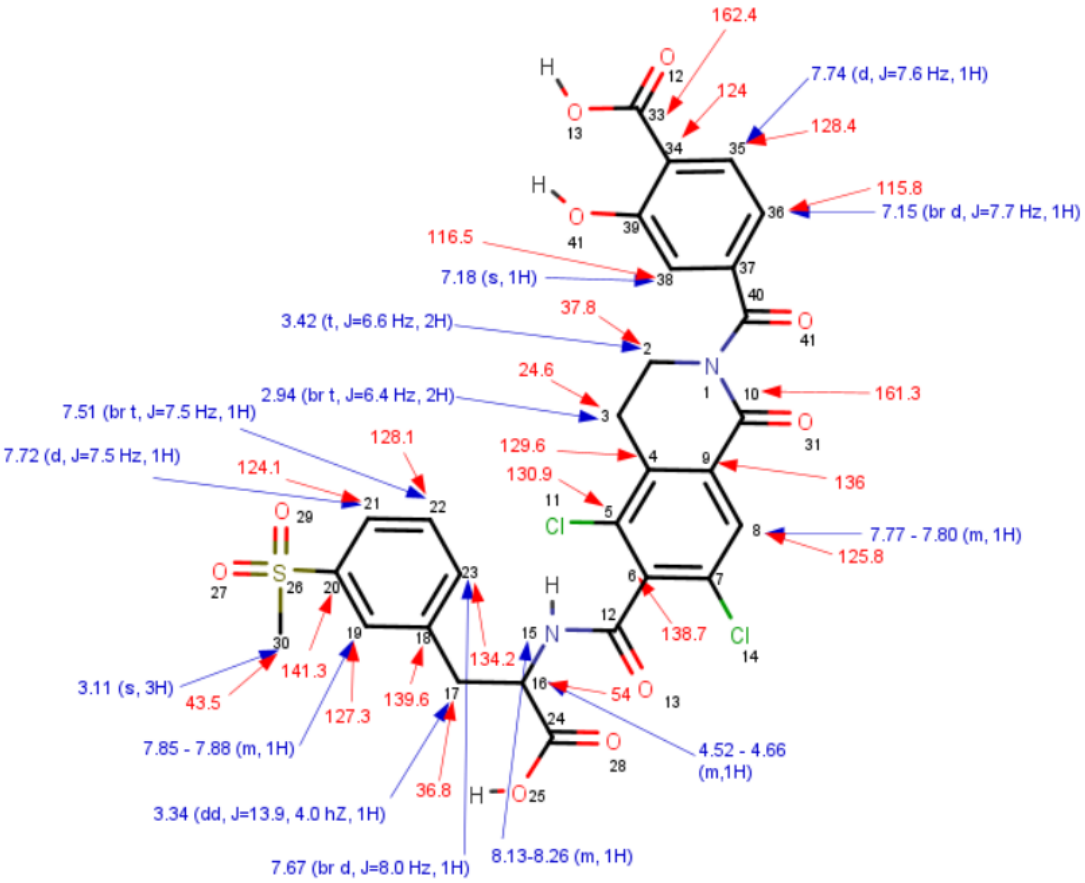
Glavni dokaz strukture spoja **4** sa slike 20 su dvije karbonilne skupine, 33 i 40, čiji ugljikovi kemijski pomaci iznose 170,8 i 168,1 ppm (*engl. parts per million*). Ostatak molekule dokazan je pomoću ^{1}H-^{13}C HMBC interakcija: 36 i 38 sa 40, 38 sa 36, 38 i 36 sa 34, 35 sa 39, 35 sa 37, te 39 i 35 sa 33. Interakcije su vidljive na slici 21.



Slika 21: *Struktura spoja* **4** *s ključnim* ^{1}H-^{13}C *HMBC interakcijama, te* ^{1}H-^{13}C *HMBC NMR spektar spoja* **4** iz NMR uzorka 1 *(Rf = 0,67) s identificiranom strukturom* **4** *u DMSO-*d_6 *na 25 °C*

Spoj 4-(6-{[1-karboksi-2-(3-metilsulfonilfenil)etil]karbamoil}-5,7-dikloro-1-okso-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-karbonil)-2-hidroksibenzojeva kiselina (**5**), molekulske formule $C_{28}H_{22}Cl_2N_2O_{10}S$, i spoj 2-[(5,7-dikloro-1-okso-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-il)formamido]-3-(3-metilsulfonilfenil)propanska kiselina (**6**), molekulske formule $C_{20}H_{20}Cl_2N_2O_6S$, izolirani kolonskom kromatografijom, predstavljaju dva onečišćenja lifitegrasta čije su strukture predložene na osnovu NMR spektara. Spoj **5** pokazuje svojstvo luminiscencije i po strukturi **5** je kompleksniji od spoja strukture **6**. U odnosu na početnu supstanciju lifitegrast, kod spoja **5** je vidljiva promjena uzrokovana pucanjem benzofuranskog prstena te novonastala ketonska skupina u položaju 10, dok je ostatak molekule ostao nepromijenjen. Obje promjene u skladu su s očekivanom

oksidativnom razgradnjom lifitegrasta. Struktura spoja **5** prikazana je na slici 22.

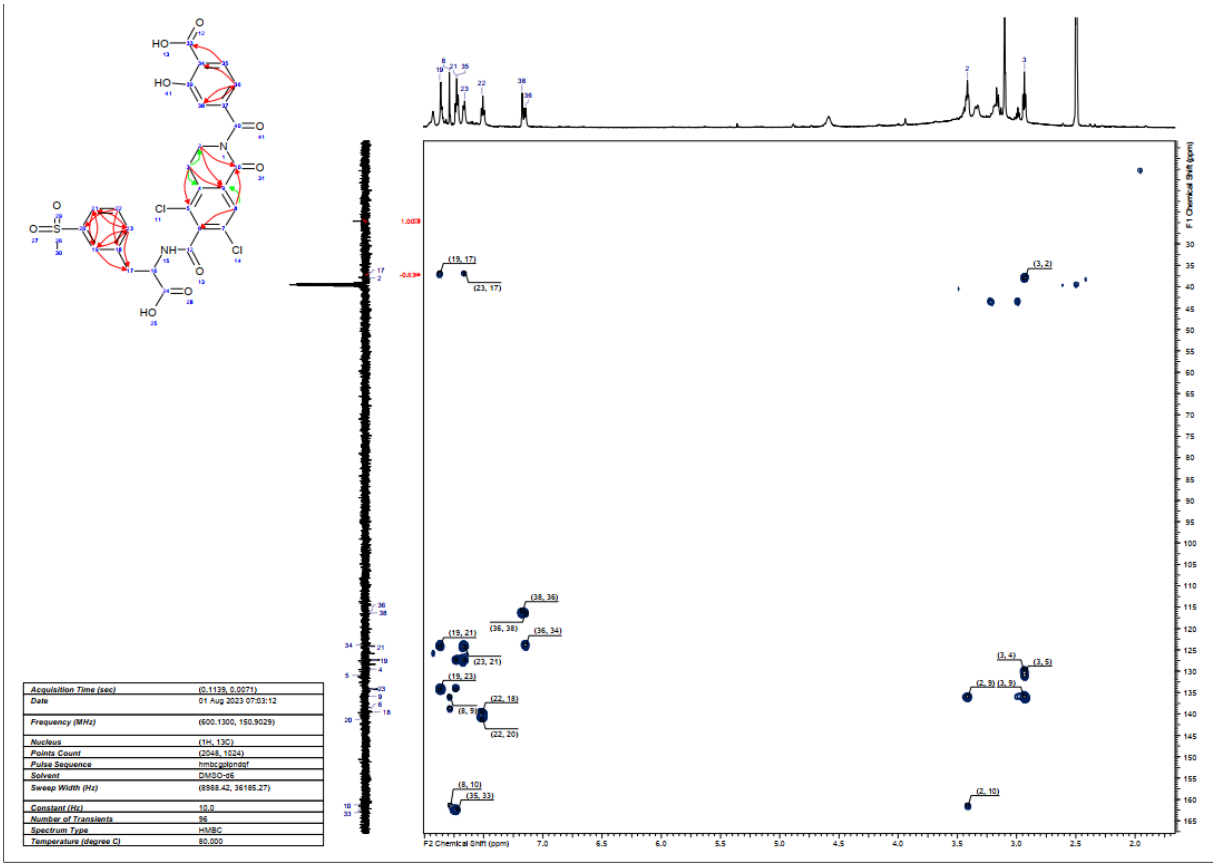


Slika 22: *^{1}H (600 MHz, plavo) i ^{13}C (151 MHz, crveno) NMR kemijski pomaci za strukturu spoja* **5** *u DMSO-d_6 pri 25°C, jedinica ppm nije navedena zbog jasnoće prikaza* (Izvor: MarvinSketch)

Budući da su na ovoj strukturi dvije glavne promjene u odnosu na lifitegrast identificirane na položaju 10 i benzofuranskom prstenu, ključne interakcije kojima se dokazuje struktura nalaze se upravo u ta dva područja i prikazane su na slici 23.

Struktura spoja **5** dokazuje se koristeći ključne ^{1}H-^{13}C HMBC interakcije u centralnom cijelu: 2 sa 10, 2 sa 9, 3 sa 9, 3 sa 5, 8 sa 10 i 8 sa 6. Kemijski pomak 10C=O skupine od 161,3 odgovara predloženoj strukturi. Raspad benzofuranskog prstena i novonastala

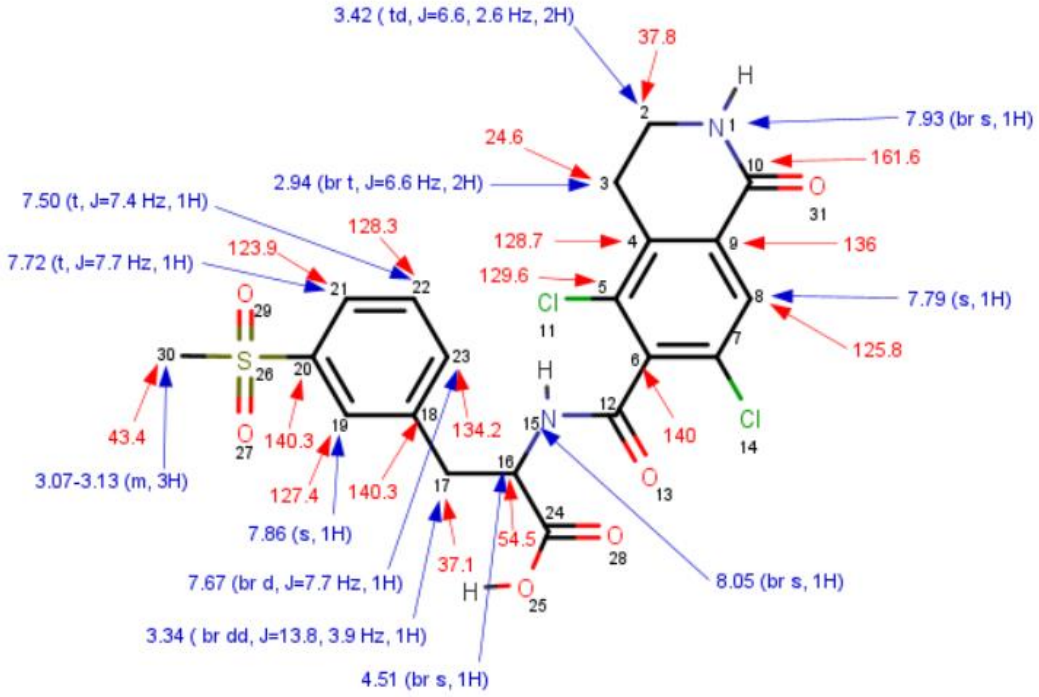
karboksilna skupina 33 s kemijskim pomakom 162,4 ppm dokazana je postojanjem ^{1}H-^{13}C HMBC interakcija 36 sa 38, 36 sa 34 i 35 sa 33. Dodatni dokaz ove promjene je sama struktura spoja 4 koja pokazuje identični strukturni motiv. Interakcije su vidljive na slici 23.



Slika 23: *Struktura spoja* **5** *s ključnim ^{1}H-^{13}C HMBC interakcijama, te ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spektar spoja* **5** *iz NMR uzorka 2 (Rf = 0,74) u DMSO-d_6 na 80°C*

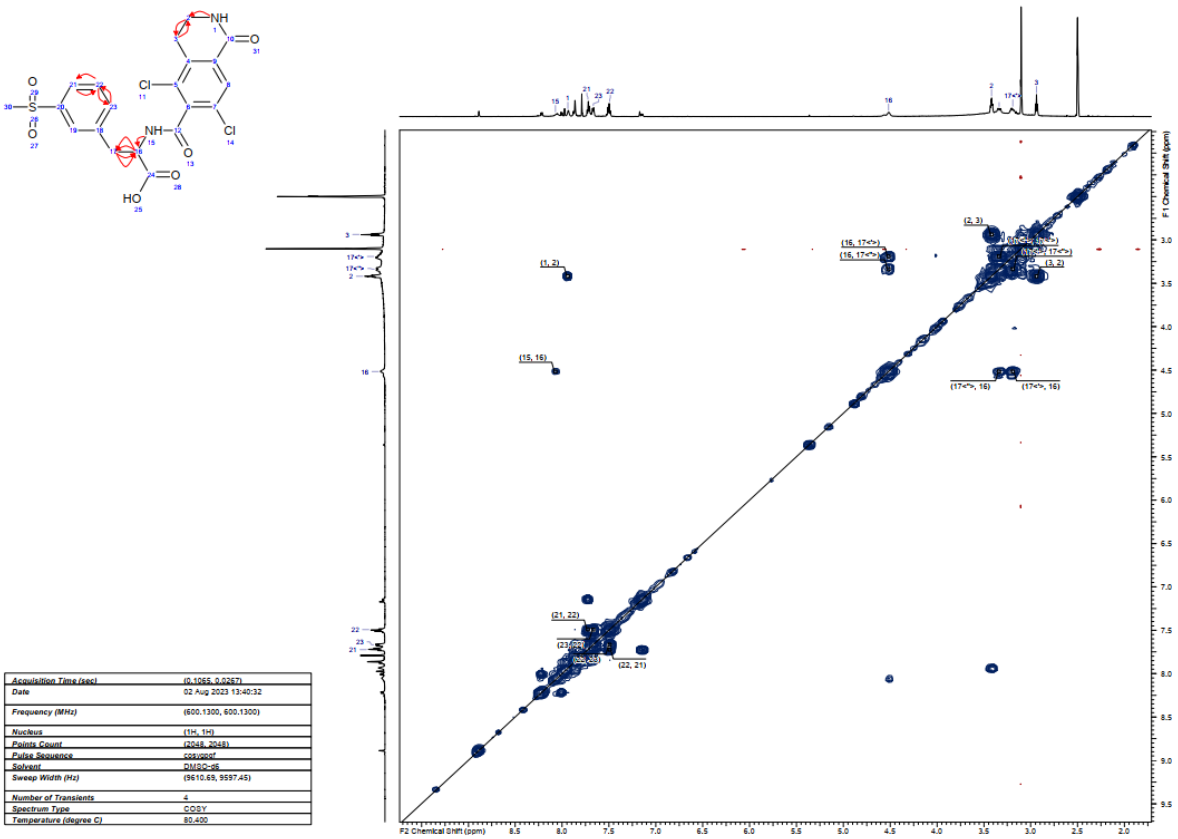
Spoj **6** ne pokazuje svojstvo luminiscencije. Prilikom određivanja strukture spoja **6**, odmah je vidljivo da se u spektrima NMR ne vide signali benzofuranskog prstena, kao ni derivata benzofuranskog prstena prisutnog u spojevima **4** i **5**. To znači da je došlo do pucanja amidne veze 1N-40C=O. Dodatni dokaz pucanja amidne veze je i ^{1}H-^{1}H COSY interakcija 1NH sa 2 koja je vidljiva u strukturi spoja **6**, ali je nema u strukturi spoja **5**. Uz to, kao i kod strukture spoja **5**,

ustanovljena je oksidacija na poziciji 10 te prisustvo ketonske skupine s kemijskim pomakom 161,6 ppm. Ostatak molekule u odnosu na lifitegrast je nepromijenjen. Struktura spoja **6** prikazana je na slici 24.

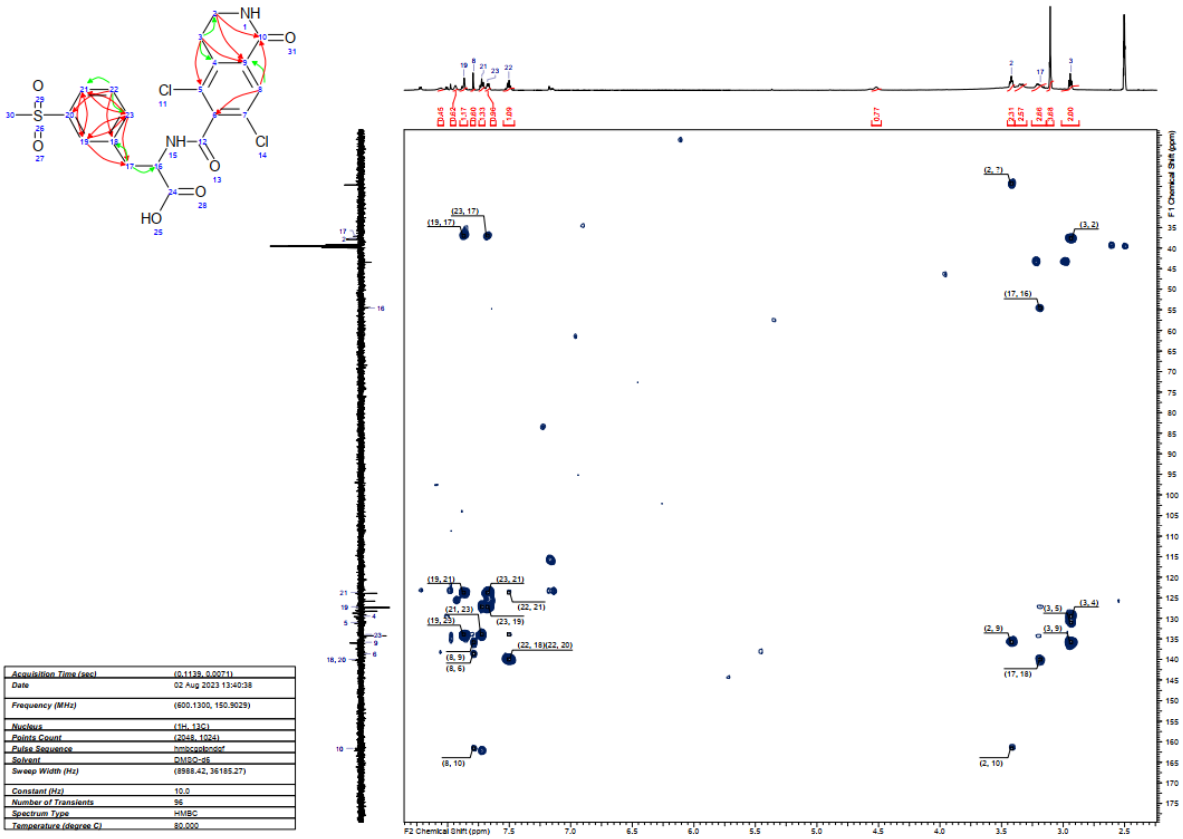


Slika 24: *^{1}H (600 MHz, plavo) i ^{13}C (151 MHz, crveno) NMR kemijski pomaci za strukturu spoja* **6** *u DMSO-d_6 pri 25°C, jedinica ppm nije navedena zbog jasnoće prikaza* (Izvor: MarvinSketch)

Struktura spoja **6** dokazuje se ^{1}H-^{13}C HMBC interakcijama: 2 sa 10, 2 sa 9, 3 sa 9, 3 sa 5, 8 sa 10 i 8 sa 6. Interakcije su vidljive na slikama 25 i 26.



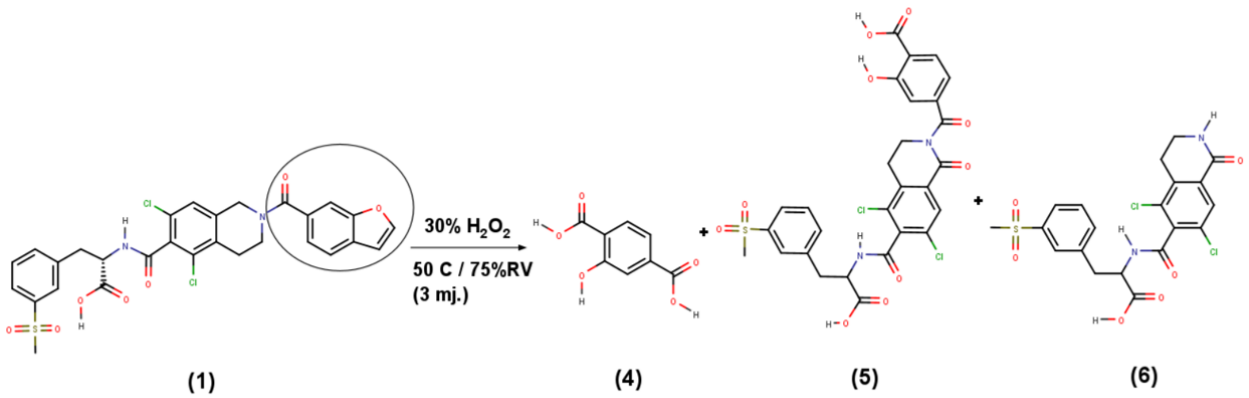
Slika 25: *Struktura spoja* **6** *s ključnim ^{1}H-^{1}H COSY interakcijama, te ^{1}H-^{1}H COSY NMR spektar spoja* **6** *iz NMR uzorka 3 (Rf =0,65) u DMSO-d6 na 80°C*



Slika 26: *Struktura spoja* **6** *s ključnim ^{1}H-^{13}C HMBC interakcijama, te ^{1}H-^{13}C HMBC NMR spektar spoja* **6** *iz NMR uzorka 3 (Rf = 0,65) u DMSO-d_6 na 80°C*

Za razliku od prvog NMR analiziranog uzorka (uzorak 1) koji sadrži samo spoj **4**, NMR analiza pokazala je da preostala dva NMR uzorka (uzorci 2 i 3) uz spojeve **5** i **6** sadrže i druga neidentificirana onečišćenja. Uzorak 2 (Rf = 0,74) uz spoj **5** (65%) sadrži i 35% onečišćenja koje ima spoj **6**. Uzorak 3 (Rf = 0,65) sadrži 75% spoja **6** što je glavni spoj, dok je ostalih 25% onečišćenje čija struktura nije mogla biti određena zbog velikog preklapanja signala onečišćenja i glavnog spoja u NMR spektrima te niskog intenziteta signala onečišćenja.

Spojevi **4**, **5** i **6** nastali su oksidativnom razgradnjom **1**. Prema tome, predložena reakcija za kemijski raspad **1** prikazana je na shemi 1.



Shema 1. *Oksidativna razgradnja* **1** (Izvor: MarvinSketch)

5. RASPRAVA

Zbog nedostatka literaturnih navoda i nedostupnosti javnosti, ovim istraživanjem promatrani su uvjeti koji utječu na fizikalnu i kemijsku stabilnost lifitegrasta. Definirana je inicijalna kvaliteta supstancije lifitegrast i provedene su stres studije koje utječu na njezinu razgradnju. Izlaganjem supstancije ekstremnim uvjetima postignuto je stvaranje novih supstancija, odnosno onečišćenja. Sve u svrhu izolacije i karakterizacije novih produkata. Inicijalnom studijom određeni su uvjeti pod kojima se događa razgradnja lifitegrasta. Potvrđeno je da se lifitegrast u uvjetima termolize, kisele i alkalne hidrolize i oksidacije razgrađuje na poznata onečišćenja A i C te veliki postotak nepoznatih onečišćenja. Glavnom studijom stavio se naglasak na proučavanje različitih temperatura na već ispitane uvjete u inicijalnoj studiji. Vidljivo je da se stabilnost lifitegrasta mijenja pri promjeni temperature i vremenskom razdoblju. Veća razgradnja uočava se pri većim temperaturama i duljem vremenskom periodu. Najveća razgradnja postignuta je oksidacijom koja je provedena sa 30% H_2O_2. Lifitegrast se razgradio na tri nove supstancije različitih Rf vrijednosti koje su identificirane NMR-om. Oksidacijski raspad na molekuli lifitegrast dogodio se na benzofuranskom prstenu koji se u potpunosti odvojio od molekule uz oksidaciju na izokinolinskom

prstenu. Bitno je napomenuti da je na oksidacijsku razgradnju lifitegrasta znatno utjecao i radikalski inicijator AIBN. Međutim, supstancije nisu bile dovoljno uočljive i razlučive na tankome sloju da bi se uspjele izolirati. Stoga je moguće provesti isti eksperiment, ali s drugim radikalnim inicijatorom te izolirati i karakterizirati dobivene produkte razgradnje.

6. ZAKLJUČAK

Lifitegrast, aktivna tvar protuupalnog lijeka Xiidra®, ostvaruje svoje djelovanje kao antagonist interakcije LFA-1/ICAM-1 pri čemu inhibira aktivaciju i proliferaciju T-stanica i time ublažava simptome upale suhog oka. Svi farmaceutski produkti moraju imati karakterizirana onečišćenja koja su prisutna u djelatnoj tvari lijeka i konačnom proizvodu, a izvan su definiranih dopuštenih granica. Dozvoljena granica za onečišćenja je 0,1%, a sve iznad toga mora biti karakterizirano. S obzirom da je literaturnih navoda o kemijskoj stabilnosti lifitegrasta jako malo i nisu dostupni javnosti, provedene su prisilne studije kako bi se odredila reaktivnost molekule i uvjeti pri kojima se događa razgradnja supstance i stvaraju razgradni produkti. Istraživanje razgradnih produkata, a samim time i njihova izolacija te karakterizacija strukture, koristi se za određivanje prikladnog skladištenja djelatne tvari i lijeka te poboljšanje trenutne formulacije lijeka što uključuje formiranje manje reaktivnih i više stabilnih molekula. Također, koristi se u uspostavljanju i validaciji analitičke metode. Svrha razumijevanja i otkrivanja onečišćenja te njihova kontrola je da se osigura sigurna i učinkovita primjena u pacijenata sa što manje neželjenih nuspojava. Uvid u kemijsku strukturu onečišćenja te njihova izolacija i karakterizacija, provodi se pomoću kromatografskih i spektroskopskih tehnika među kojima se najviše koriste HPLC i NMR. Pomoću navedene dvije tehnike identificirana su tri spoja koja predstavljaju onečišćenja lifitegrasta nastala oksidativnom razgradnjom. Izolirani spojevi strukturno odgovaraju

sljedećim spojevima: 2-hidroksibenzen-1,4-dikarboksilna kiselina (**4**), 4-(6-{[1-karboksi-2-(3-metilsulfonilfenil)etil]karbamoil}-5,7-dikloro-1-okso-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-karbonil)-2-hidroksibenzojeva kiselina (**5**), 2-[(5,7-dikloro-1-okso-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-il)formamido]-3-(3-metilsulfonilfenil)propanska kiselina (**6**). Spojevi su podložni daljnoj analizi i karakterizaciji kako bi se izolirali u većoj čistoći te finalno standardizirali kao radni standardi.

7. LITERATURA:

[1] CHMP. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Withdrawal assessment report [Internet]. Dostupno na: www.ema.europa.eu/contact

[2] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 11965427, Lifitegrast [Internet]. Dostupno na: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lifitegrast

[3] Donnenfeld ED, Perry HD, Nattis AS, Rosenberg ED. Lifitegrast for the treatment of dry eye disease in adults. Expert Opin Pharmacother. 2017;18(14):1517–24.

[4] Lifitegrast: Uses, Interactions, Mechanism of Action [Internet]. Dostupno na: https://go.drugbank.com/drugs/DB11611

[5] Godin MR, Gupta PK. Lifitegrast ophthalmic solution in the treatment of signs and symptoms of dry eye disease: Design, development, and place in therapy. Clin Ophthalmol. 2017;11:951–7.

[6] Haber SL, Benson V, Buckway CJ, Gonzales JM, Romanet D, Scholes B. Lifitegrast: a novel drug for patients with dry eye disease. Ther Adv Ophthalmol. 2019;11:251584141987036.

[7] Chan CC, Prokopich CL. Lifitegrast Ophthalmic Solution 5.0% for Treatment of Dry Eye Disease: Overview of Clinical Trial Program. J Pharm Pharm Sci. 2019;22(1):49-56.

[8] What is Xiidra? [Internet]. Dostupno na: www.Xiidra.com
[9] Kątny M, Frankowski M. Impurities in Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients. Crit Rev Anal Chem. 2017;47(3):187–93.
[10] Patil, Poonam & Kasture, Veena & Prakash, K. Impurity profiling emerging trends in quality control of pharmaceuticals. International journal of pharmaceutical chemistry; 2015
[11] Roberto de Alvarenga Junior B, Lajarim Carneiro R. Chemometrics Approaches in Forced Degradation Studies of Pharmaceutical Drugs. Molecules. 2019 Oct 22;24(20):3804.
[12] Baertschi S, Alsante Mills K, Reed R. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. First edition, New York: CRC press; 2005. 1-44 ; 141-352.
[13] Husain A. Forced Degradation Studies. J Anal Pharm Res. 2016;3(6).
[14] Blum F, Whinnett ZI, Lefroy DC, Marks DJB, Smith PJ. blum2014 HPLC.
[15] Ahuja S, Mills Alsante K. Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals. First edition, San Diego: Elsevier Science; 2003. 203-325.
[16] Srivastava N, Singh A et al. Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. Natural bioactive compounds: Technological Advancements, 1 2021
[17] Harvey D (DePauw U. Modren analytical chemistry. McGraw-Hill High Educ. 2000;578-593.
[18] Maggio RM, Calvo NL, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. J Pharm Biomed Anal. 2014;101:102–22.
[19] Mlynárik V. Introduction to nuclear magnetic resonance. Anal Biochem. 2017;529:4–9.

[20] Yerrabelly RJ, Kommera R, Kasireddy VR, Ghojala VR, Yerrabelly H. ChemistrySelect (2020) 5(11) 3355-3358.
[21] Keating GM. Drugs (2017) 77(2) 201-208.
[22] EMA. Guideline on the chemistry of active substances. Manual [Internet]. 2015;44(February):1–16.
Dostupno na:
http://www.ema.europa.eu/ema/doc_index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500186194&murl=menus/document_library/document_library.jsp&mid=0b01ac058009a3dc
[23] International Council for Harmonisation. EMEA/CHMP, 2009, ICH Topic Q8 (R2) Pharmaceutical Development, Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development. Eur Med Agency [Internet]. 2009;8(June).
Dostupno na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf

8. ŽIVOTOPIS

Jadranka Buljević

F. Hanamana 21, 32270 Županja, Hrvatska

032 / 832 – 613 +385 99 750 6595

jadranka.buljevic5bj@gmail.com / jadranka.buljevic@student.uniri.hr

Spol: Žensko

Datum rođenja: 27.03.1999.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Rujan 2021.- trenutno	**Diplomski sveučilišni studij Medicinska kemija** Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Hrvatska
Rujan 2018. – srpanj 2021.	**Prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova (univ.bacc.biotechn.et pharm.inv., s pohvalom magna cum laude)** Biotehnologija i istraživanje lijekova Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Hrvatska Tema: "Depresija i antidepresivi" Mentor: Izv. Prof. dr.sc. Karlo Wittine
Rujan 2014. – rujan 2018.	**Gimnazijsko srednjoškolsko obrazovanje - Opća gimnazija** Veliki kraj 42, 32270 Županja, Hrvatska
Rujan 2006. – rujan 2014.	**Osnovnoškolsko obrazovanje – OŠ Ivan Kozarac** Ul. dr. Franje Račkog 30, 32270, Županja, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

Studeni 2023.- kolovoz 2023.	**ISTRAŽIVAČKI DIPLOMSKI RAD** Jadran Galenski Laboratorij (JGL) d.d. Pulac 4A i Svilno 20, 51000 Rijeka Institut Ruđer Bošković – NMR centar Bijenička Cesta 54, 10000 Zagreb Mentor: Izv. Prof. Dean Marković Komentor: Dr.sc. Leo Štefan

Siječanj 2023. – veljača 2023.	**DEMONSTRATURE** Demonstratorica na kolegiju Opća kemija
Lipanj 2021.	**STUDENTSKA STRUČNA PRAKSA** HALMED – Agencija za lijekove i medicinske proizvode Ksaverska cesta 4, 10000 Zagreb

DODATNO RADNO ISKUSTVO

Listopad 2022. – srpanj 2023.	**KONOBARICA** Rakhia Bar, A. Medulića 5, 51000 Rijeka
Svibanj 2022. – srpanj 2022.	**BLAGAJNICA** Muller, Pećine 81A, Janka Polića Kamova, 51000 Rijeka
Listopad 2021. – svibanj 2022.	**BLAGAJNICA** Pepco, Martinkovac 127, 51000 Rijeka
Listopad 2019.– prosinac 2019.	**PROMOTOR** Farmakol PIP d.o.o. Veslarska ul. 8A, 51000, Rijeka

POPULARIZACIJA ZNANOSTI

	Projekti
Ožujak – lipanj 2022.	STEM games
Svibanj 2019. / travanj 2022.	Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju (radionica “Kemija aroma” i izrada prirodne kozmetike)
Listopad 2018. – ožujak 2020.	Putujući znanstvenici
Listopad 2018. – prosinac 2020.	NatuRis
	Skupovi
Rujan 2022.	Međunarodni znanstveno - stručni skup 19. Ružičkini dani “Danas znanost – sutra industrija”
Studeni 2019.	STEM: Danas za sutra 2
	Konferencije
Prosinac 2019.	“Budućnost i perspektiva “

Prosinac 2018.	"Budućnost i perspektiva studija"

Članstvo

Ožujak – lipanj 2022.	Organizacija STEM games-a
Rujan 2018. – rujan 2023.	Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (USBRI)

NAGRADE

2022./2023.	Državna stipendija
2021./2022.	Gradska stipendija Stipendija grada Županja za izvrsnost
2019.- 2021.	STEM stipendija Stipendija za izvrsnost u STEM području

OSOBNE VJEŠTINE

Jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C1	C1	B2	B2	C1
Njemački	A1	A1	A1	A2	A2

Levels: A1/2: Basic user - B1/2: Independent user - C1/2 Proficient user
Common European Framework of Reference for Languages

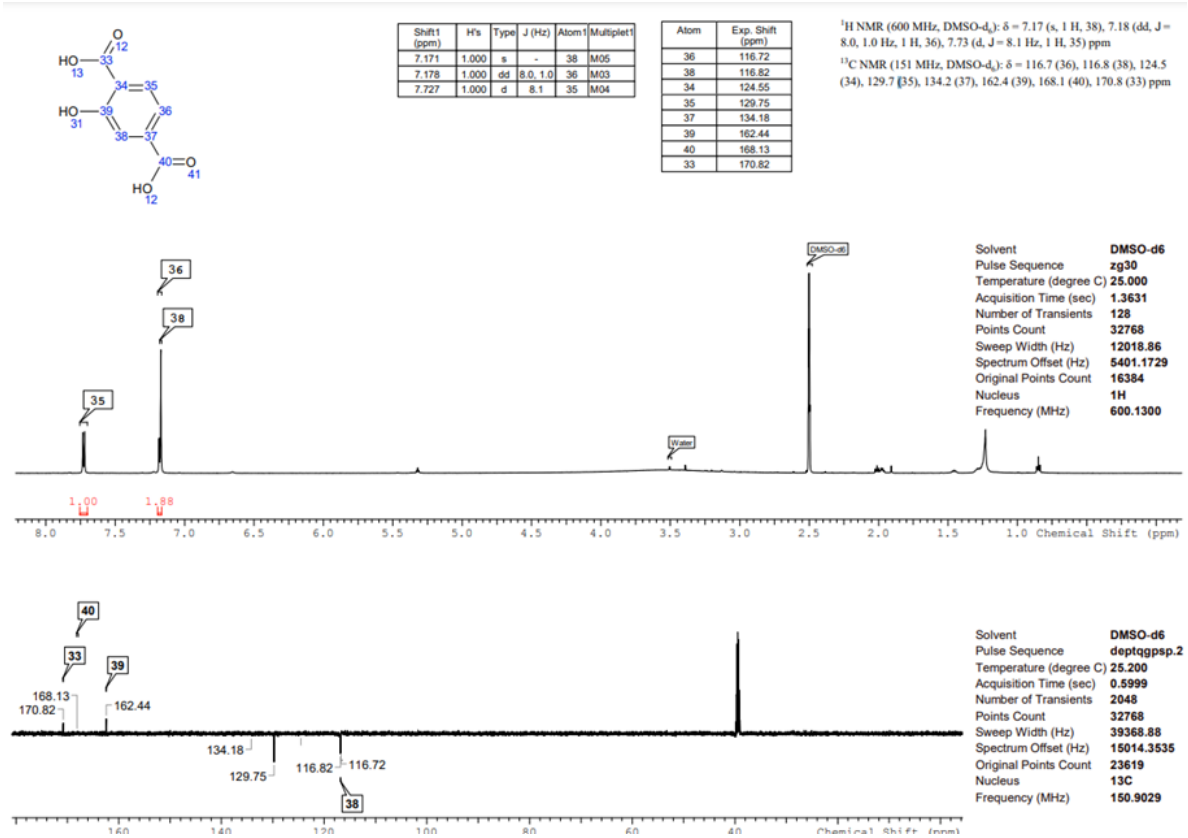
Komunikacijske vještine	Odlične komunikacijske i prezentacijske vještine stečene prilikom izvođenja seminara.
Organizacijske/rukovoditeljske vještine	Samostalna i odlična organizacija stečena tijekom dugogodišnjeg obrazovanja, uloge voditelja na projektu "Kuglice dobrih želja"te sudjelovanja u organizaciji I volontiranju na STEM games 2022.
Poslovne vještine	Visoka samo-motivacija, želja za konstantnim učenjem i usavršavanjem, dobar i uvijek pozitivan sudionik timskog rada.
Digitalne vještine	Vrlo dobro poznavanje Microsoft Office programa te osnovno znanje rada u programima MarvinSketch, Avogadro, VMD, Chimera, Spark, Lig Plus, R Studio i u programu Statistica.
Vozačka dozvola	B

DODATNE INFORMACIJE

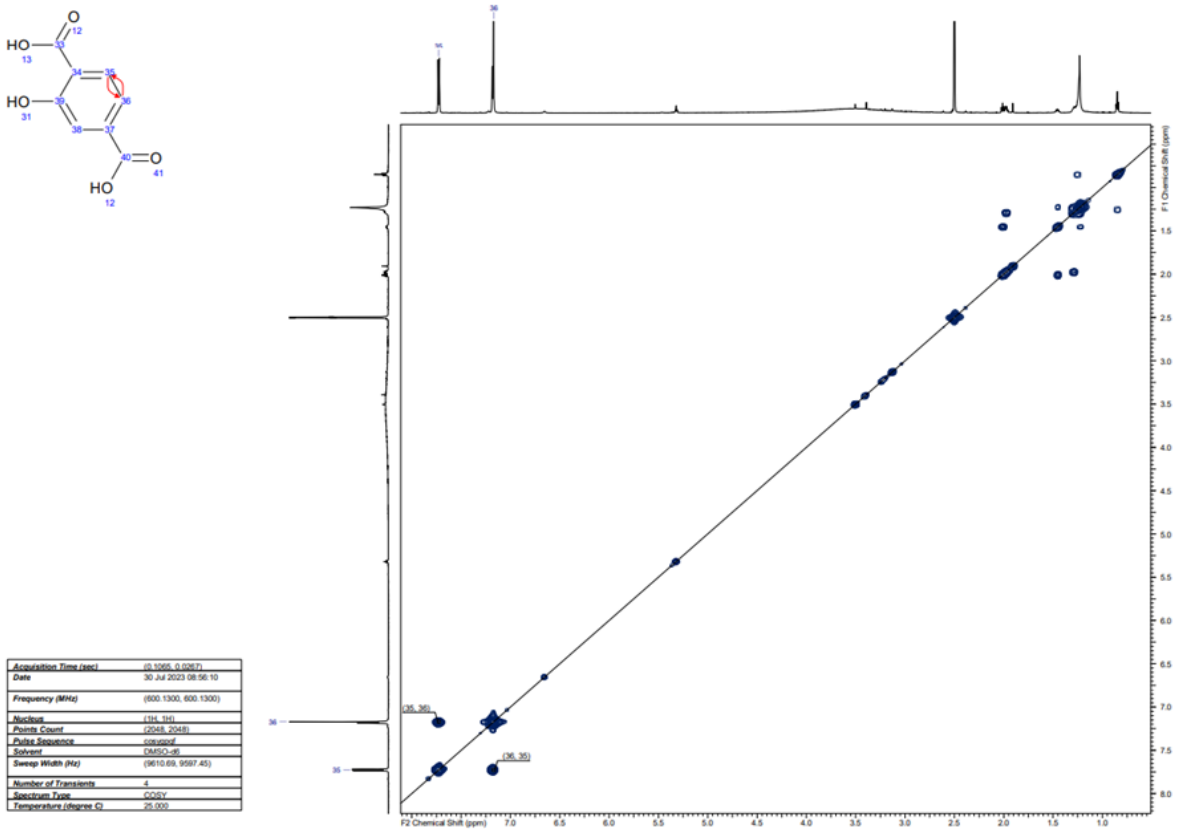
Ostali projekti

Rujan 2019.- rujan 2023.	Student – mentor (mentor dodijeljenom brucošu)
Listopad – prosinac 2020.	Voditeljica projekta "Kuglice dobrih želja" – humanitarni projekt u suradnji s gradom Rijeka
Studeni 2017. – travanj 2018.	"UZOR – učimo zajedno, opažamo, reagiramo" (pomoć u učenju djeci iz udomiteljskih obitelji)

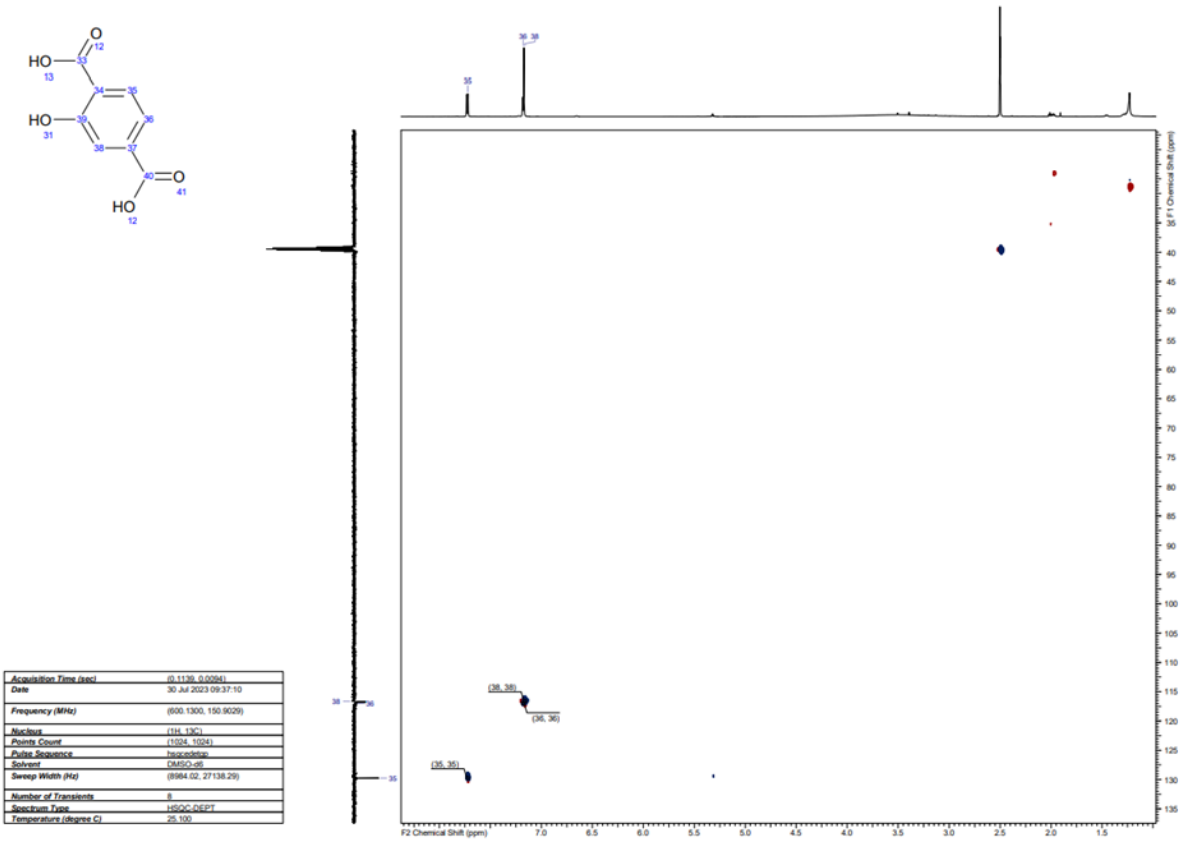
DODACI:



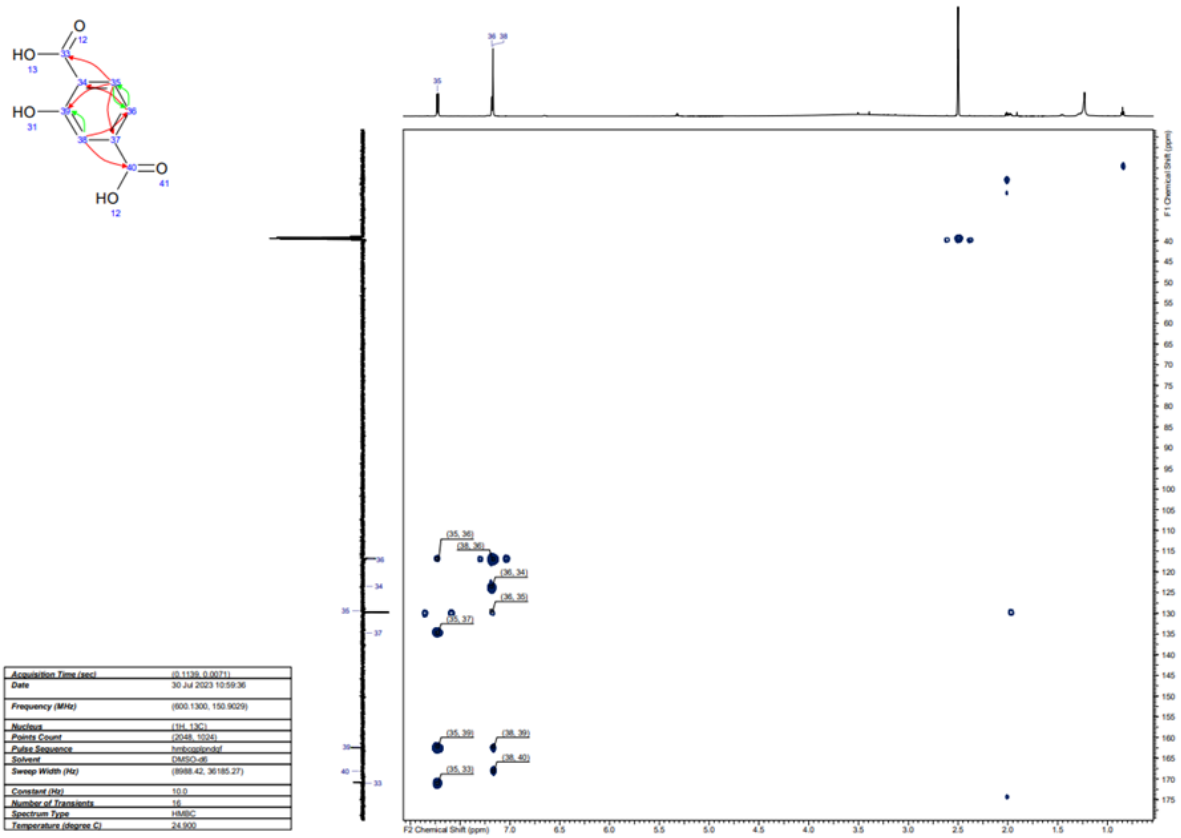
Slika 27: *^{1}H i ^{13}C NMR spektar strukture spoja* **4** *(Rf = 0,67) u DMSO-d6 na 25°C*



Slika 28: *COSY NMR spektar strukture spoja* **4** *(Rf = 0,67) u DMSO-d6 na 25°C*

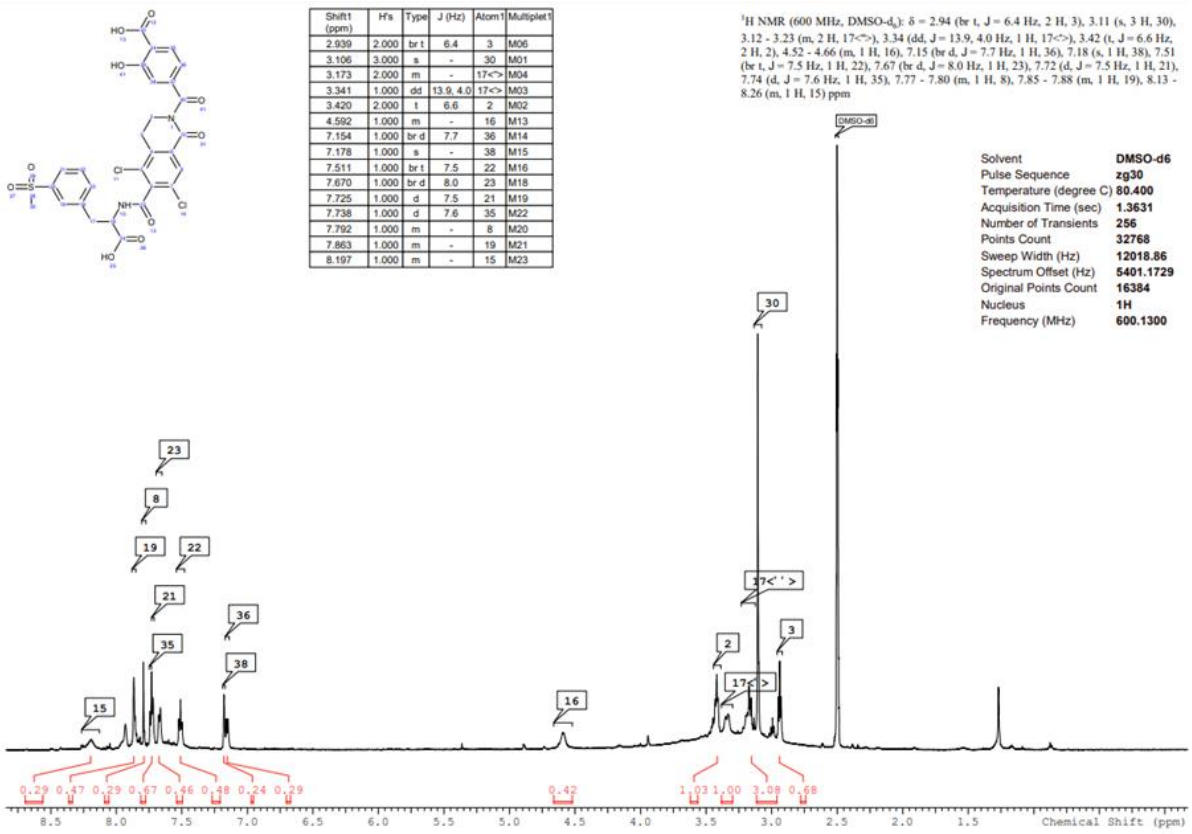


Slika 29: *HSQC-DEPT NMR spektar strukture spoja* **4** *(Rf = 0,67) u DMSO-d6 na 25°C*

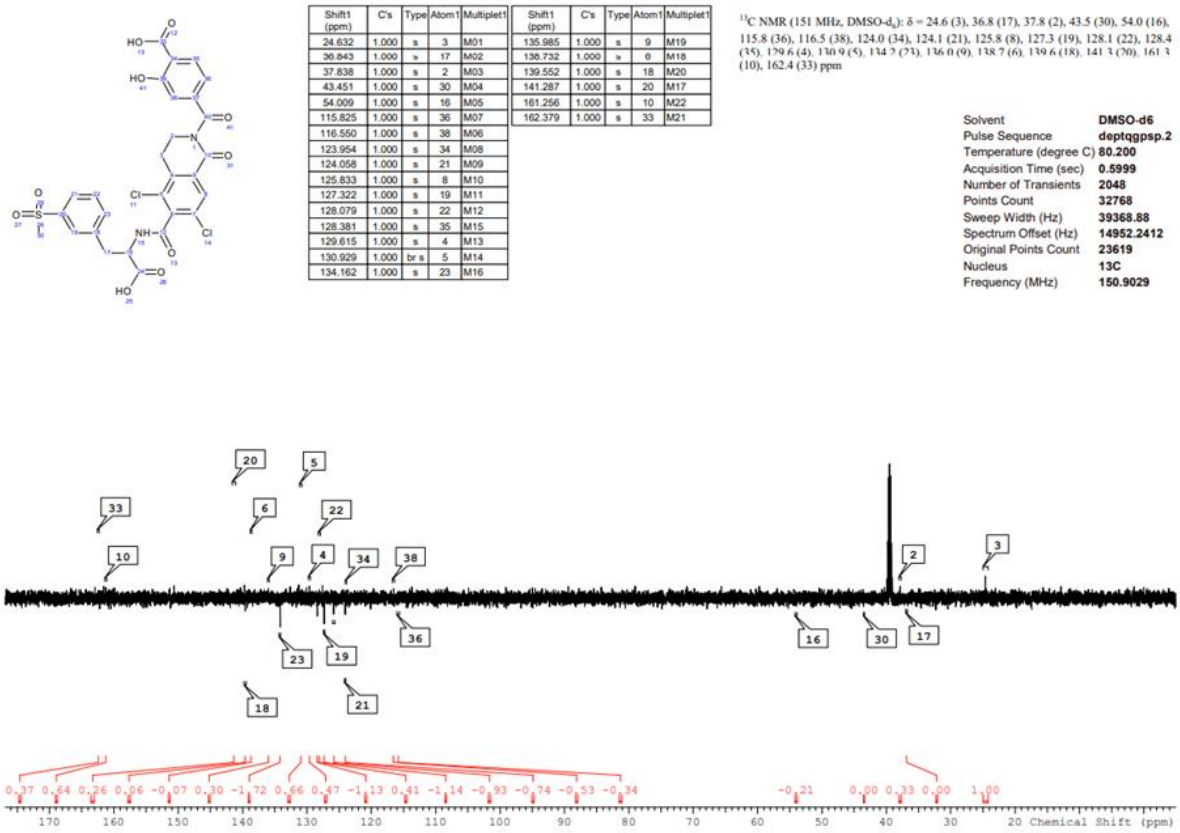


Acquisition Time (sec)	(0.1139, 0.0071)
Date	30 Jul 2023 10:59:36
Frequency (MHz)	(600.1300, 150.9029)
Nucleus	(1H, 13C)
Points Count	(2048, 1024)
Pulse Sequence	hmbcgplndqf
Solvent	DMSO-d6
Sweep Width (Hz)	(8988.42, 36185.27)
Constant (Hz)	10.0
Number of Transients	16
Spectrum Type	HMBC
Temperature (degree C)	24.900

Slika 30: *HMBC NMR spektar strukture spoja* **4** *(Rf = 0,67) u DMSO-d6 na 25°C*



Slika 31: *^{1}H NMR spektar strukture spoja* **5** *(Rf = 0,74) u DMSO-d6 na 80°C*



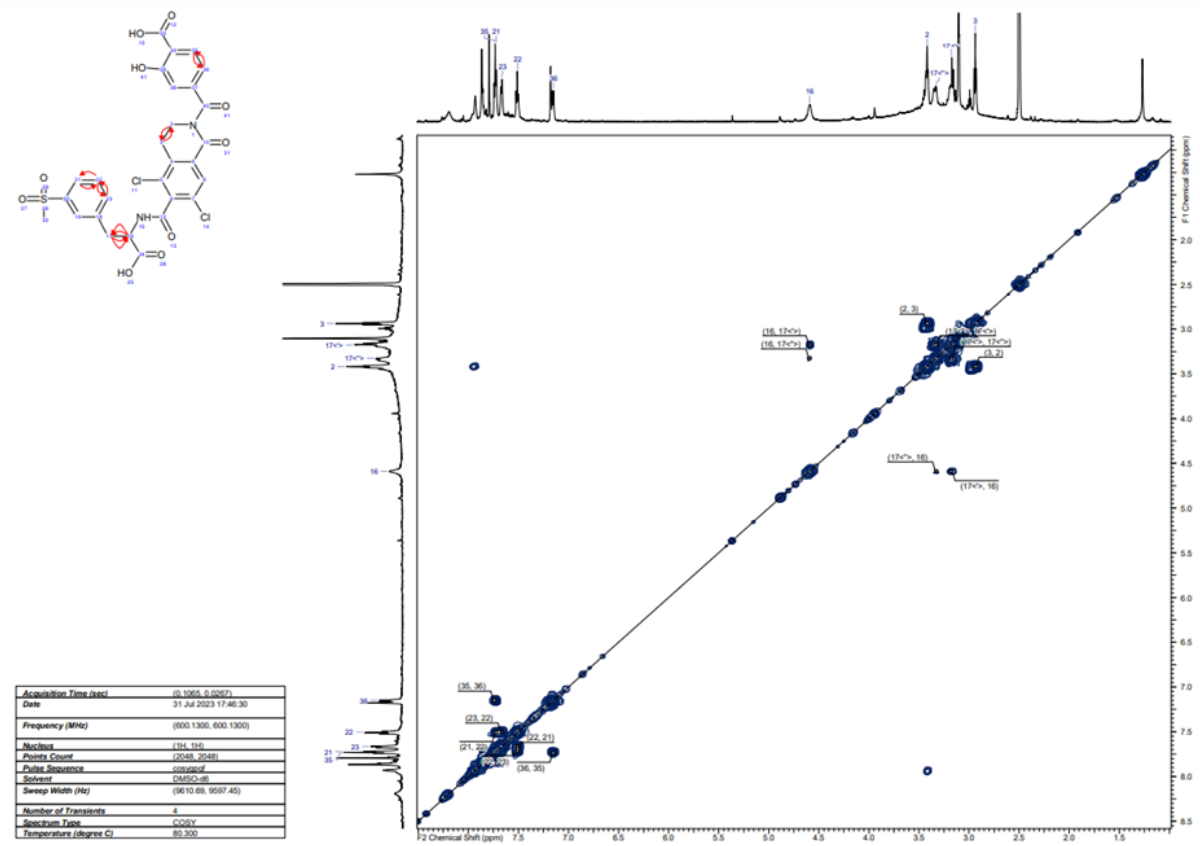
Shift1 (ppm)	C's	Type	Atom1	Multiplet1
24.632	1.000	s	3	M01
36.843	1.000	s	17	M02
37.838	1.000	s	2	M03
43.451	1.000	s	30	M04
54.009	1.000	s	16	M05
115.825	1.000	s	36	M07
116.550	1.000	s	38	M06
123.954	1.000	s	34	M08
124.058	1.000	s	21	M09
125.833	1.000	s	8	M10
127.322	1.000	s	19	M11
128.079	1.000	s	22	M12
128.381	1.000	s	35	M15
129.615	1.000	s	4	M13
130.929	1.000	br s	5	M14
134.162	1.000	s	23	M16

Shift1 (ppm)	C's	Type	Atom1	Multiplet1
135.985	1.000	s	9	M19
136.732	1.000	s	6	M18
139.552	1.000	s	18	M20
141.287	1.000	s	20	M17
161.256	1.000	s	10	M22
162.379	1.000	s	33	M21

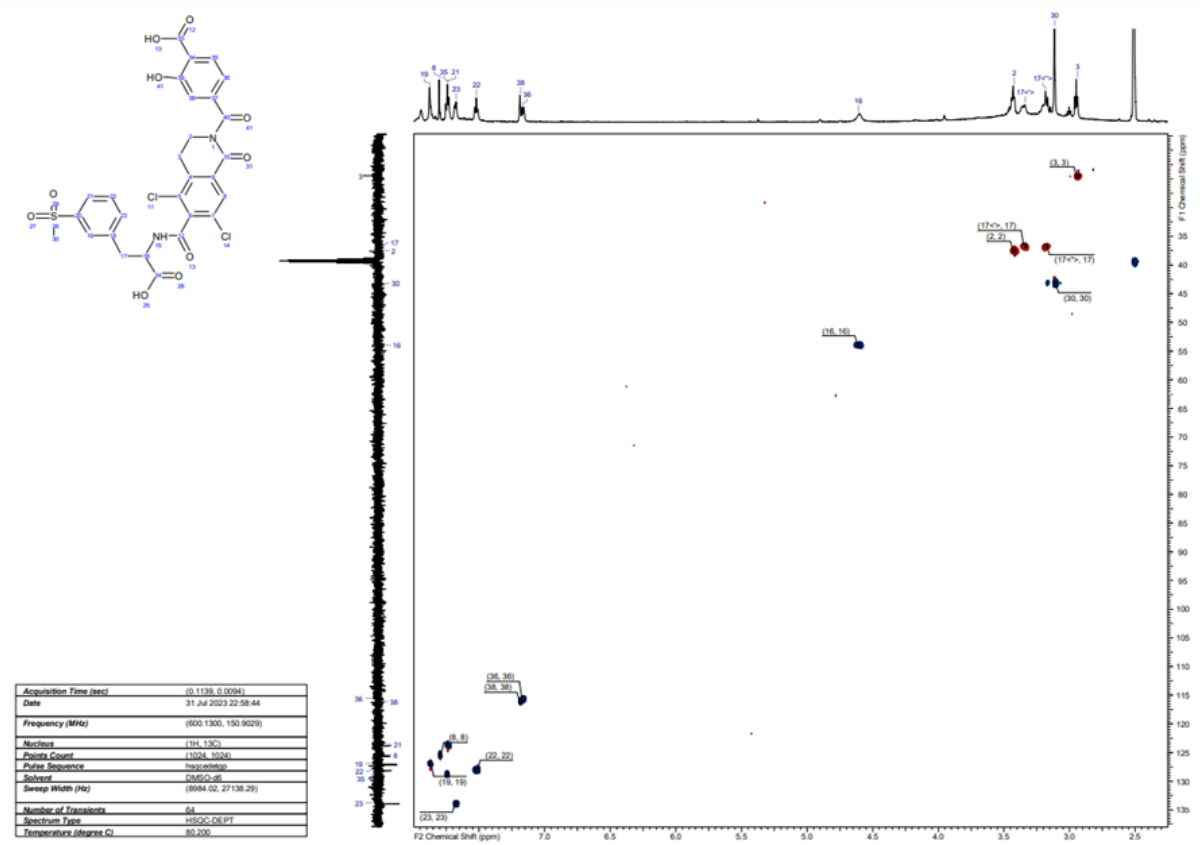
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 24.6 (3), 36.8 (17), 37.8 (2), 43.5 (30), 54.0 (16), 115.8 (36), 116.5 (38), 124.0 (34), 124.1 (21), 125.8 (8), 127.3 (19), 128.1 (22), 128.4 (35), 129.6 (4), 130.9 (5), 134.2 (23), 136.0 (9), 138.7 (6), 139.6 (18), 141.3 (20), 161.3 (10), 162.4 (33) ppm

Solvent	DMSO-d6
Pulse Sequence	deptqgpsp.2
Temperature (degree C)	80.200
Acquisition Time (sec)	0.5999
Number of Transients	2048
Points Count	32768
Sweep Width (Hz)	39368.88
Spectrum Offset (Hz)	14952.2412
Original Points Count	23619
Nucleus	13C
Frequency (MHz)	150.9029

Slika 32: *^{13}C NMR spektar strukture spoja* ***5*** *(Rf = 0,74) u DMSO-d6 na 80°C*

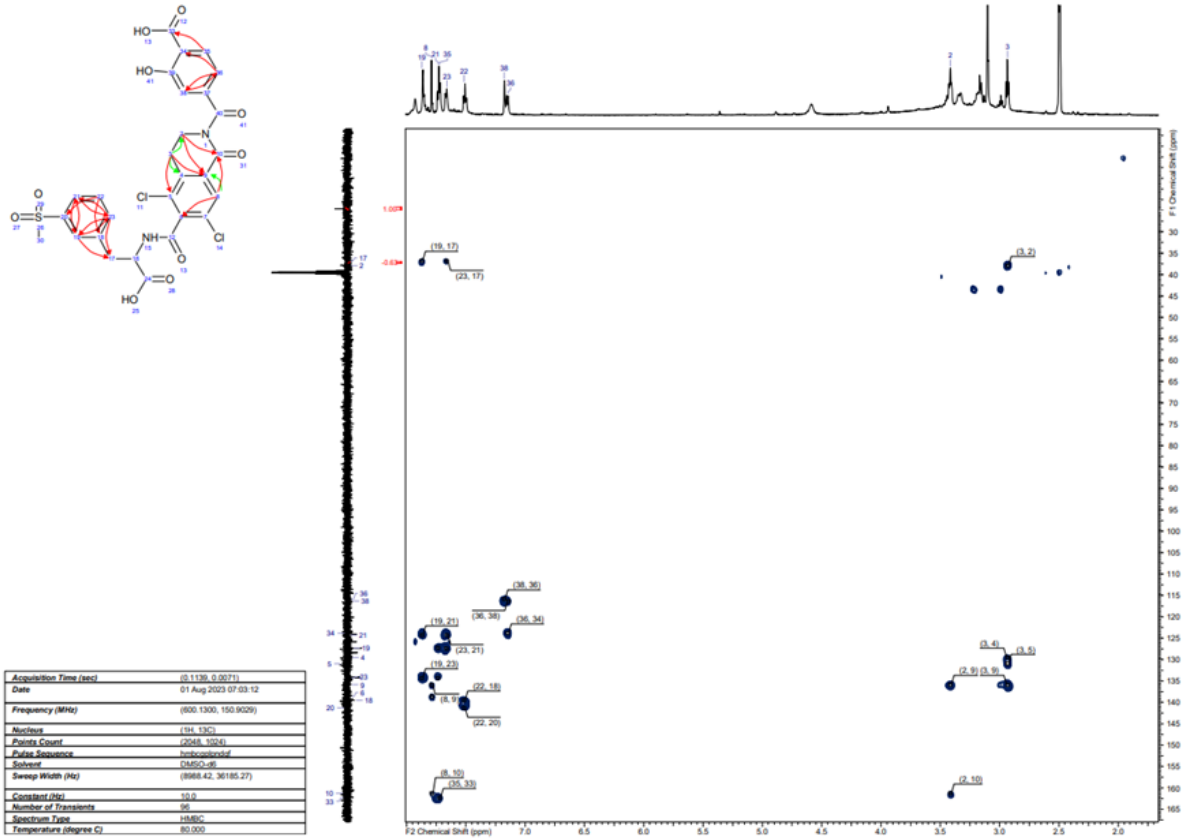


Slika 33: *COSY NMR spektar strukture spoja* **5** *(Rf = 0,74) u DMSO-d6 na 80°C*

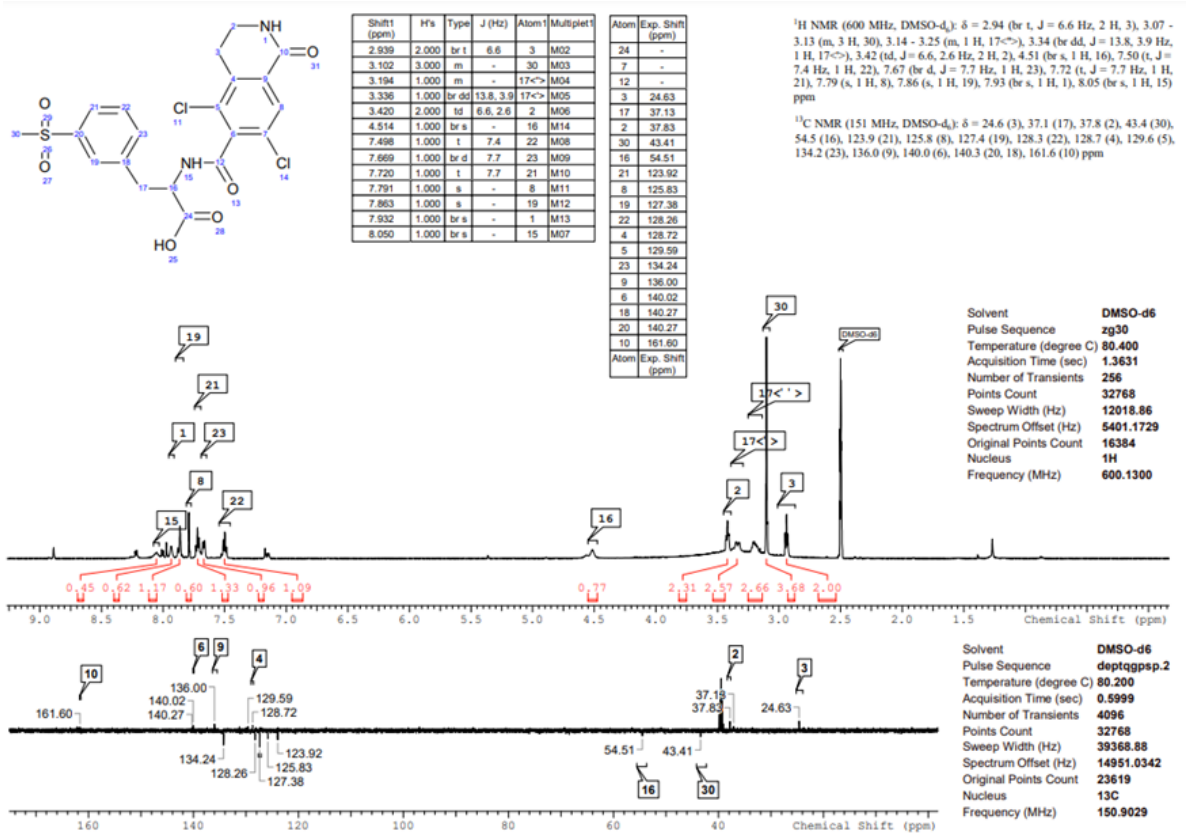


Acquisition Time (sec)	(0.1139, 0.0094)
Date	31 Jul 2023 22:58:44
Frequency (MHz)	(600.1300, 150.9029)
Nucleus	(1H, 13C)
Points Count	(1024, 1024)
Pulse Sequence	hsqcdetgp
Solvent	DMSO-d6
Sweep Width (Hz)	(8984.02, 27138.29)
Number of Transients	64
Spectrum Type	HSQC-DEPT
Temperature (degree C)	80.200

Slika 34: *HSQC-DEPT NMR spektar strukture spoja* **5** *(Rf = 0,74) u DMSO-d6 na 80°C*



Slika 35: *HMBC NMR spektar strukture spoja* **5** *(Rf = 0,74) u DMSO-d6 na 80°C*



Shift1 (ppm)	H's	Type	J (Hz)	Atom1	Multiplet1
2.939	2.000	br t	6.6	3	M02
3.102	3.000	m	-	30	M03
3.194	1.000	m	-	17<'>	M04
3.336	1.000	br dd	13.8, 3.9	17<>	M05
3.420	2.000	td	6.6, 2.6	2	M06
4.514	1.000	br s	-	16	M14
7.498	1.000	t	7.4	22	M08
7.669	1.000	br d	7.7	23	M09
7.720	1.000	t	7.7	21	M10
7.791	1.000	s	-	8	M11
7.863	1.000	s	-	19	M12
7.932	1.000	br s	-	1	M13
8.050	1.000	br s	-	15	M07

Atom	Exp. Shift (ppm)
24	-
7	-
12	-
3	24.63
17	37.13
2	37.83
30	43.41
16	54.51
21	123.92
8	125.83
19	127.38
22	128.26
4	128.72
5	129.59
23	134.24
9	136.00
6	140.02
18	140.27
20	140.27
10	161.60

Atom	Exp. Shift (ppm)

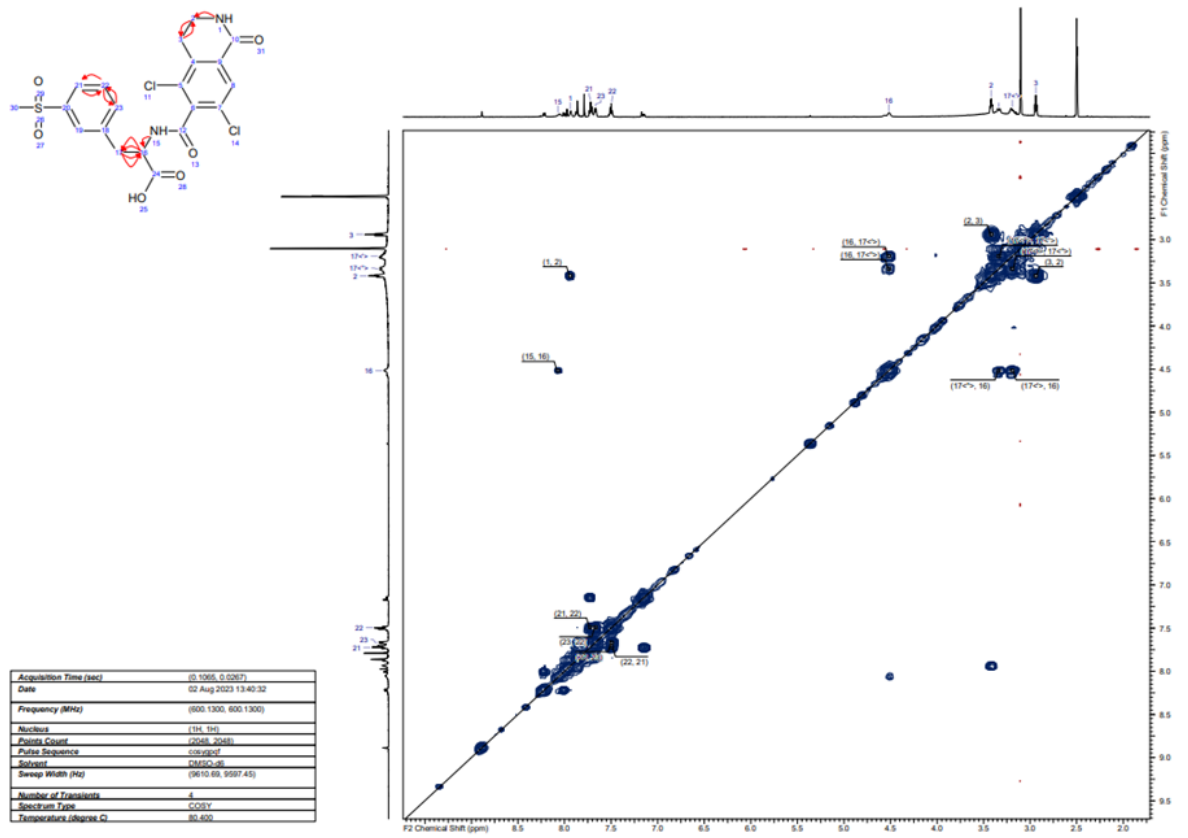
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.94 (br t, J = 6.6 Hz, 2 H, 3), 3.07 - 3.13 (m, 3 H, 30), 3.14 - 3.25 (m, 1 H, 17<'>), 3.34 (br dd, J = 13.8, 3.9 Hz, 1 H, 17<>), 3.42 (td, J = 6.6, 2.6 Hz, 2 H, 2), 4.51 (br s, 1 H, 16), 7.50 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, 22), 7.67 (br d, J = 7.7 Hz, 1 H, 23), 7.72 (t, J = 7.7 Hz, 1 H, 21), 7.79 (s, 1 H, 8), 7.86 (s, 1 H, 19), 7.93 (br s, 1 H, 1), 8.05 (br s, 1 H, 15) ppm

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 24.6 (3), 37.1 (17), 37.8 (2), 43.4 (30), 54.5 (16), 123.9 (21), 125.8 (8), 127.4 (19), 128.3 (22), 128.7 (4), 129.6 (5), 134.2 (23), 136.0 (9), 140.0 (6), 140.3 (20, 18), 161.6 (10) ppm

Solvent	DMSO-d6
Pulse Sequence	zg30
Temperature (degree C)	80.400
Acquisition Time (sec)	1.3631
Number of Transients	256
Points Count	32768
Sweep Width (Hz)	12018.86
Spectrum Offset (Hz)	5401.1729
Original Points Count	16384
Nucleus	1H
Frequency (MHz)	600.1300

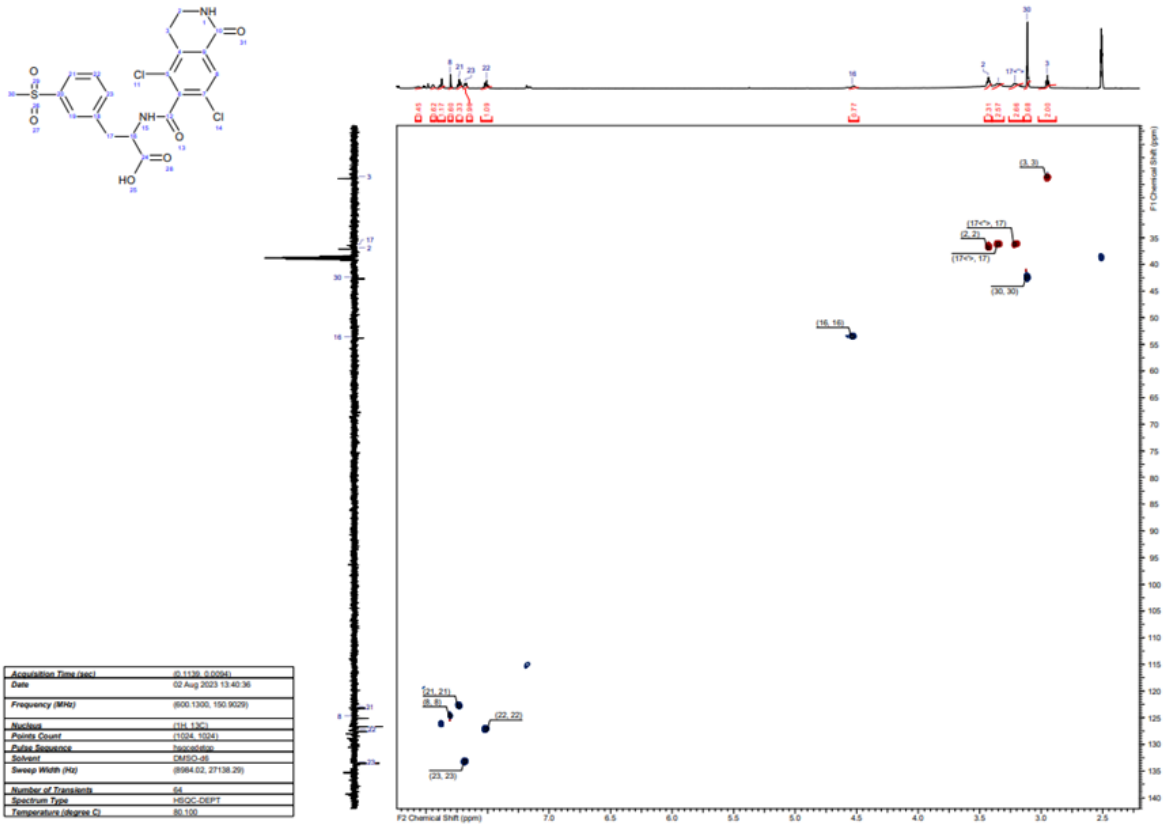
Solvent	DMSO-d6
Pulse Sequence	deptqgpsp.2
Temperature (degree C)	80.200
Acquisition Time (sec)	0.5999
Number of Transients	4096
Points Count	32768
Sweep Width (Hz)	39368.88
Spectrum Offset (Hz)	14951.0342
Original Points Count	23619
Nucleus	13C
Frequency (MHz)	150.9029

Slika 36: *^{1}H i ^{13}C NMR spektar strukture spoja* ***6*** *(Rf = 0,65) u DMSO-d6 na 80°C*

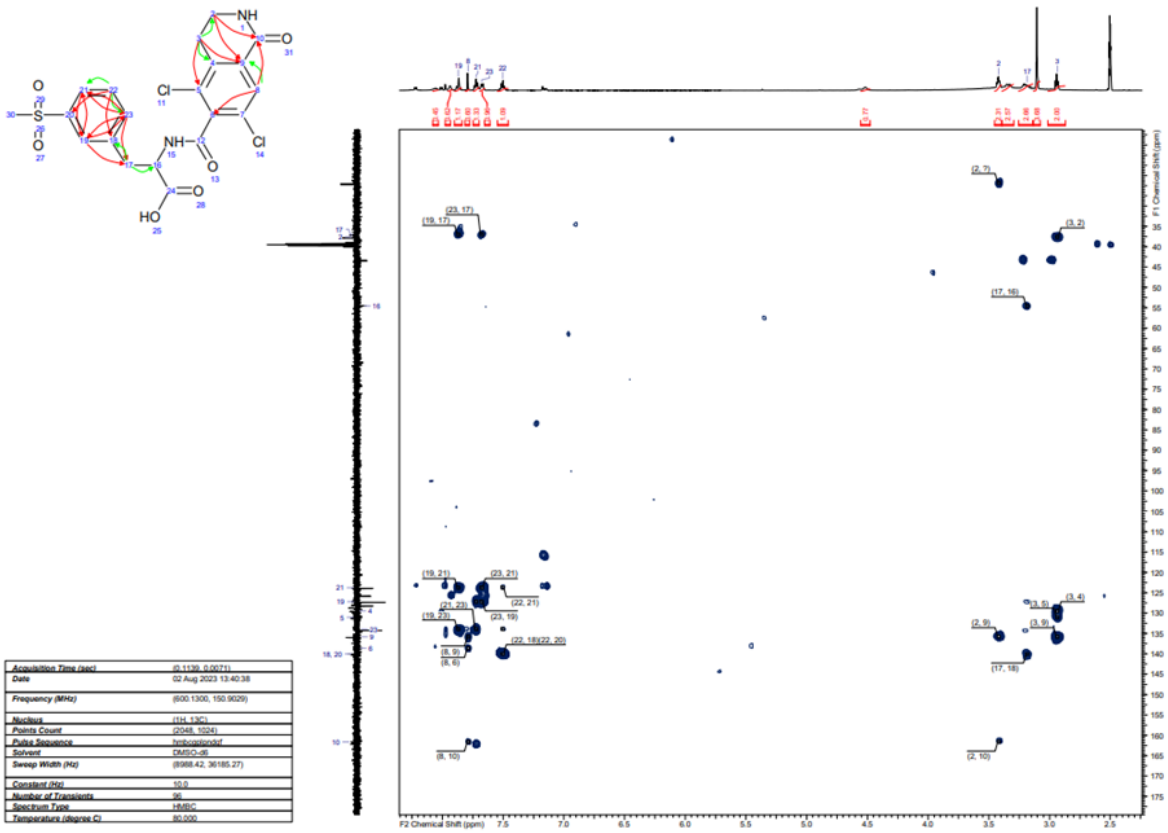


Acquisition Time (sec)	(0.1065, 0.0267)
Date	02 Aug 2023 13:40:32
Frequency (MHz)	(600.1300, 600.1300)
Nucleus	(1H, 1H)
Points Count	(2048, 2048)
Pulse Sequence	cosygpqf
Solvent	DMSO-d6
Sweep Width (Hz)	(9610.69, 9597.45)
Number of Transients	4
Spectrum Type	COSY
Temperature (degree C)	80.400

Slika 37: *COSY NMR spektar strukture spoja* **6** *(Rf = 0,65) u DMSO-d6 na 80°C*



Slika 38: *HSQC-DEPT NMR spektar strukture spoja* **6** *(Rf = 0,65) u DMSO-d6 na 80°C*



Acquisition Time (sec)	(0.1139, 0.00711)
Date	02 Aug 2023 13:40:38
Frequency (MHz)	(600.1300, 150.9029)
Nucleus	(1H, 13C)
Points Count	(2048, 1024)
Pulse Sequence	hmbcgplpndqf
Solvent	DMSO-d6
Sweep Width (Hz)	(8988.42, 36185.27)
Constant (Hz)	10.0
Number of Transients	96
Spectrum Type	HMBC
Temperature (degree C)	80.000

Slika 39: *HMBC NMR spektar strukture spoja* **6** *(Rf = 0,65) u DMSO-d6 na 80°C*