

# Određivanje razgradnih produkata amino i amidino supstituiranih 2-benzotiazola

---

Pavić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:911714>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ema Pavić

**ODREĐIVANJE RAZGRADNIH PRODUKATA AMINO I  
AMIDINO SUPSTITUIRANIH 2-BENZOTIAZOLA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

prof. dr. sc. Marijana Hranjec

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, 2021.

*Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na pomoći, strpljenju, sugestijama i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala asistentici Kristini Tolić na strpljenju, potpori i pruženoj pomoći u laboratoriju tokom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Zahvalu upućujem i prof. dr. sc Nives Galić te Marijani Pocrnić, mag. chem. s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na omogućenom pristupu Q-TOF-u te analizi uzoraka s ciljem određivanja razgradnih produkata.*

*Posebno se želim zahvaliti svojoj majci Jasni na odgoju, trudu, podršci, razumijevanju, ljubavi i pomoći koju mi je pružila.*

*Također hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su me podržavali i bodrili kroz sve godine školovanja te mi učinili ovo razdoblje života jednostavnijim i ljepšim.*

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom 4379 pod nazivom *Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog skeleta u dizajnu novih antitumorskih agensa.*



Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović.

## SAŽETAK

### Određivanje razgradnih produkata amino i amidino supstituiranih 2-benzotiazola

Definiranje stabilnosti lijekova ponajviše se svodi na određivanje neželjenih svojstava uzrokovanih razgradnim produktima i onečišćenjima koji smanjuju kvalitetu, sigurnost i djelotvornost lijeka. U svrhu točnog određivanja procesa proizvodnje, uvjeta skladištenja i transporta, važno je ispitati kako se kvaliteta farmaceutskog proizvoda mijenja pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika. Prije početka komercijalne uporabe farmaceutski aktivnih tvari potrebno je, uz ispitivanje stabilnosti, procijeniti njihova svojstva koja mogu imati značajan utjecaj na žive organizme i okoliš. Tek nakon provedenih ispitivanja, farmaceutski aktivni spojevi mogu prijeći u fazu ispitivanja potencijalne implementacije u novim farmaceutskim proizvodima. Jedan od načina ispitivanja stabilnosti jest podvrgavanje aktivnih tvari ekstremnim kemijskim i okolišnim uvjetima, tzv. ispitivanje prisilne razgradnje.

Cilj ovog rada bio je odrediti strukturu i svojstva razgradnih produkata dva derivata 2-fenilbenzotiazola. Uzorci spojeva LD-4, IUPAC naziva 2-(4-amidinofenil)-6-aminobenzotiazol-klorid, i LD-5, IUPAC naziva 2-(4-aminofenil)-6-(imidazolin-2-il)benzotiazol-mesilat, ispitivani su u uvjetima kisele hidrolize (0,5 M HCl), bazne hidrolize (0,5 M NaOH), oksidacije peroksidom (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), povišene temperature (80 °C i 100 °C) i UV/VIS svjetla (500 Wh/m<sup>2</sup>), a identifikacija produkata provedena je pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti povezanim sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (HPLC-QTOF).

Na osnovu dobivenih spektara masa određena je struktura razgradnih produkata i predložen razgradni put osnovnih spojeva. Na temelju određene strukture razgradnih produkata procijenjene su vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i biakumulacijskog faktora pomoću T.E.S.T. softverskog programa.

**Ključne riječi:** benzotiazol, prisilna razgradnja, razgradni produkti, tekućinska kromatografije visoke djelotvornosti, razvojna toksičnost, mutagenost, bioakumulacijski faktor

## ABSTRACT

### **Determination of degradation products of amino and amidino substituted 2-benzothiazoles**

Defining the stability of drugs is mostly reduced to determining the adverse properties caused by degradation products and contaminants that reduce the quality, safety and efficiency of the drug. In order to accurately determine the production process, as well as storage and transport conditions, it is important to examine how the quality of the pharmaceutical product changes under the influence of various environmental factors. Before commencing commercial use of pharmaceutically active substances, it is necessary, in addition to stability testing, to evaluate their properties which may have a significant effect on living organisms and the environment. Only after the tests have been performed, can the pharmaceutically active compounds enter the testing phase of potential implementation in new pharmaceutical products. One way to test stability is to subject the active substances to extreme chemical and environmental conditions, the so-called forced decomposition test.

The aim of this study was to determine the structure and properties of degradation products of two 2-phenylbenzothiazole derivatives. Samples of the compounds LD-4, IUPAC called 2-(4-amidinophenyl)-6-aminobenzothiazole chloride, and LD-5, IUPAC called 2-(4-aminophenyl)-6-(imidazolin-2-yl)benzothiazole mesylate, were tested under conditions of acid hydrolysis (0,5 M HCl), basic hydrolysis (0,5 M NaOH), peroxide oxidation (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), elevated temperatures (80 °C i 100 °C) and UV/VIS light (500 Wh/m<sup>2</sup>), and product identification was performed using a high performance liquid chromatograph connected to a high resolution mass spectrometer (HPLC-QTOF).

Based on the obtained mass spectra, the structure of degradation products was determined and the degradation pathway of basic compounds was proposed. Based on the specific structure of degradation products, the values of developmental toxicity, mutagenicity and bioaccumulation factor were estimated using T.E.S.T. software program.

**Key words:** benzothiazole, forced degradation, degradation products, high performance liquid chromatography, developmental toxicity, mutagenicity, bioaccumulation factor

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. OPĆI DIO.....   | 2  |
| 2.1. Prisilna razgradnja aktivnih farmaceutskih tvari .....  | 2  |
| 2.1.1. Svrha prisilne razgradnje [1, 5, 6] .....   | 2  |
| 2.1.2. Uvjeti prisilne razgradnje .....  | 3  |
| 2.1.3. Klasifikacija onečišćenja .....   | 6  |
| 2.2. Benzotiazol.....  | 7  |
| 2.2.1. Biološka svojstva derivata benzotiazola.....  | 8  |
| 2.3. Analitičke tehnike za analizu uzoraka podvrgnutih prisilnoj razgradnji.....                                       | 11 |
| 2.3.1. Kromatografija .....  | 12 |
| 2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....   | 13 |
| 2.4. Spektrometrija masa .....   | 14 |
| 2.4.1. Način rada spektrometra masa.....   | 15 |
| 2.4.2. Vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (HPLC-MS/MS).....  | 18 |
| 2.5. Procjena toksičnosti farmaceutski aktivnih tvari.....   | 19 |
| 2.5.1. T.E.S.T. ....   | 19 |
| 2.5.2. QSAR modeli .....   | 19 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....  | 21 |
| 3.1. Materijali .....  | 21 |
| 3.1.1. Kemikalije .....  | 21 |
| 3.1.2. Ispitivani derivati 2-fenilbenzotiazola.....  | 21 |
| 3.2. Instrumenti.....  | 22 |
| 3.2.1. Analitička vaga.....  | 22 |
| 3.2.2. Sušionik .....  | 22 |
| 3.2.3. Ultrazvuk .....   | 23 |
| 3.2.4. Uređaj za osvjetljivanje simuliranim zračenjem .....  | 23 |
| 3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (HPLC-QTOF)..... | 24 |
| 3.3. Opis rada.....  | 25 |
| 3.3.1. Priprema standardnih otopina.....   | 25 |
| 3.3.2. Priprema uzoraka za ispitivanje prisilne razgradnje.....  | 26 |
| 3.3.3. Analiza uzoraka spektrometrijom masa visoke razlučivosti .....  | 27 |
| 3.3.3.1. Ispitivanje spoja LD-4 .....  | 27 |
| 3.3.3.2. Ispitivanje spoja LD-5 .....  | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 30 |
| 4.1. Identifikacija produkata nastalih prisilnom razgradnjom .....   | 30 |
| 4.1.1. Identifikacija razgradnih produkata spoja LD-4.....   | 30 |
| 4.1.2. Identifikacija razgradnih produkata spoja LD-5.....   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Procjena toksičnosti.....   | 52 |
| 4.2.1. Procjena toksičnosti LD-4 i njegovih razgradnih produkata ..... | 54 |
| 4.2.2. Procjena toksičnosti LD-5 i njegovih razgradnih produkata ..... | 59 |
| 5. ZAKLJUČAK .....   | 67 |
| 6. LITERATURA.....   | 70 |
| 7. ŽIVOTOPIS .....   | 75 |



## **1. UVOD**

Stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda je ključan čimbenik njegove kvalitete, sigurnosti i djelotvornosti. Stabilnost farmaceutskog proizvoda definira se kao mjera do koje lijek zadržava istovjetne karakteristike koje je imao u vrijeme proizvodnje pa sve do isteka roka valjanosti. Svrha ispitivanja stabilnosti tijekom razvoja farmaceutskog proizvoda jest prikupljanje saznanja o tome kako se kvaliteta proizvoda mijenja pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika koja uvelike utječu na proces proizvodnje, uvjete skladištenja i transporta. Kod definiranja sigurnosti lijekova najviše pažnje daje se nepoželjnim svojstvima uzrokovanih razgradnim produktima i onečišćenjima koji smanjuju kvalitetu i sigurnost lijeka. Iz tog je razloga važno odrediti i identificirati onečišćenja i razgradne produkte koji su prisutni u djelatnoj tvari i gotovom farmaceutskom proizvodu. Nestabilnost gotovog proizvoda može dovesti do razgradnje ili gubitka djelotvornosti lijeka te stvaranja novih spojeva s potencijalnim toksičnim djelovanjem. Kao pomoć u određivanju stabilnosti provode se ispitivanja prisilne razgradnje. Prate se promjene kvalitete aktivne tvari i lijeka podvrgavanjem istih ekstremnim kemijskim i okolišnim uvjetima. Svrha studija prisilne razgradnje jest razjasniti potencijalne razgradne produkte, odrediti njihovu sigurnost i razviti analitičke postupke za kvantitativno određivanje takvih kemijskih spojeva.

S obzirom da su u današnje vrijeme virusne i tumorske bolesti drugi po redu uzročnici smrti, potraga za antivirusnim i antitumorskim lijekovima vrlo je važan zadatak u suvremenim istraživanjima, posebice u kemiji. Budući da su dvije potencijalne mete za antivirusne i antitumorske supstancije DNA i RNA molekule i skupina mnogobrojnih proteina, pronalaženje novih bioloških supstancija usmjereno je ka sintezi novih spojeva koji se vežu za DNA ili RNA, odnosno onih koji inhibiraju specifične proteine.

U skupinu potencijalnih terapeutika ubraja se velik broj derivata benzotiazola koji pokazuju širok spektar biološkog djelovanja i zanimljiva kemijska i fizikalna svojstva. Mehanizam djelovanja biološki aktivnih spojeva s benzotiazolskom jezgrom još nije u potpunosti razjašnjen u većini slučajeva, budući da benzotiazolna jezgra nije izolirana u velikom broju prirodnih spojeva. Iz tog se razloga, u posljednje vrijeme, znatno povećalo zanimanje za pripremu različitih derivata benzotiazola i njihovo biološko ispitivanje.

U ovom radu provedene su studije prisilne razgradnje na amino i amidino supstituiranim 2-benzotiazolima te su na temelju spektara masa određeni njihovi razgradni produkti pri različitim uvjetima.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Prisilna razgradnja aktivnih farmaceutskih tvari

Prisilna razgradnja<sup>1</sup> je razgradnja aktivne tvari ili gotovog lijeka pod kontroliranim žestokim uvjetima koji ubrzavaju prirodnu razgradnju i kataliziraju kemijsku promjenu kako bi se dobila informacija o stabilnosti aktivne farmaceutske tvari i proizvoda u cijelosti. Prisilna razgradnja pruža uvid u moguće puteve razgradnje i produkte ljekovite tvari, čija je identifikacija zatim moguća pomoću dostupnih analitičkih postupaka. Proučavanjem produkata prisilne razgradnje utvrđuje se stabilnost i kvaliteta početne molekule. Prisilna razgradnja nezaobilazan je korak prilikom stavljanja lijeka na tržište [1]. Dvije najveće svjetske organizacije za regulaciju lijekova, Agencija za hranu i lijekove, FDA<sup>2</sup> i Međunarodni odbor za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu, ICH<sup>3</sup> propisale su potrebna istraživanja i dokumentaciju koju je potrebno priložiti prije plasiranja lijeka na tržište [2]. Prisilna razgradnja provodi se na čvrstoj tvari i otopini, a obuhvaća hidrolizu u širokom rasponu pH vrijednosti, utjecaj temperature, vlage, oksidirajućih tvari i svjetla. Nadalje, ne postoje točno definirani uvjeti prisilne razgradnje koji određuju vrijednosti pH, temperature ili upotrebu određenog oksidansa već se oni prilagođavaju kako bi stupanj razgradnje ljekovite tvari ili lijeka bio otprilike 10 % [3]. Prejaki uvjeti mogu dovesti do nastanka sekundarnih razgradnih produkata koji nisu uobičajeni u životnom ciklusu proizvoda. S druge strane, kod preblagih uvjeta neki razgradni produkti neće nastati i neki razgradni putevi neće biti otkriveni pa se izabranom metodom neće moći pratiti svi razgradni produkti [4]. Koncentracija tvari koja se ispituje također nije definirana regulatornim smjericama no, preporučeno je da koncentracija bude 1 mg mL<sup>-1</sup> ili koncentracija kod koje se aktivna tvar ili lijek očekuje u konačnoj formulaciji [1].

### 2.1.1. Svrha prisilne razgradnje [1, 5, 6]

Studije prisilne razgradnje provode se sa sljedećim ciljevima:

1. Utvrditi put razgradnje ljekovite tvari odnosno gotovog proizvoda (lijeka).

---

1 engl. *Forced Degradation*

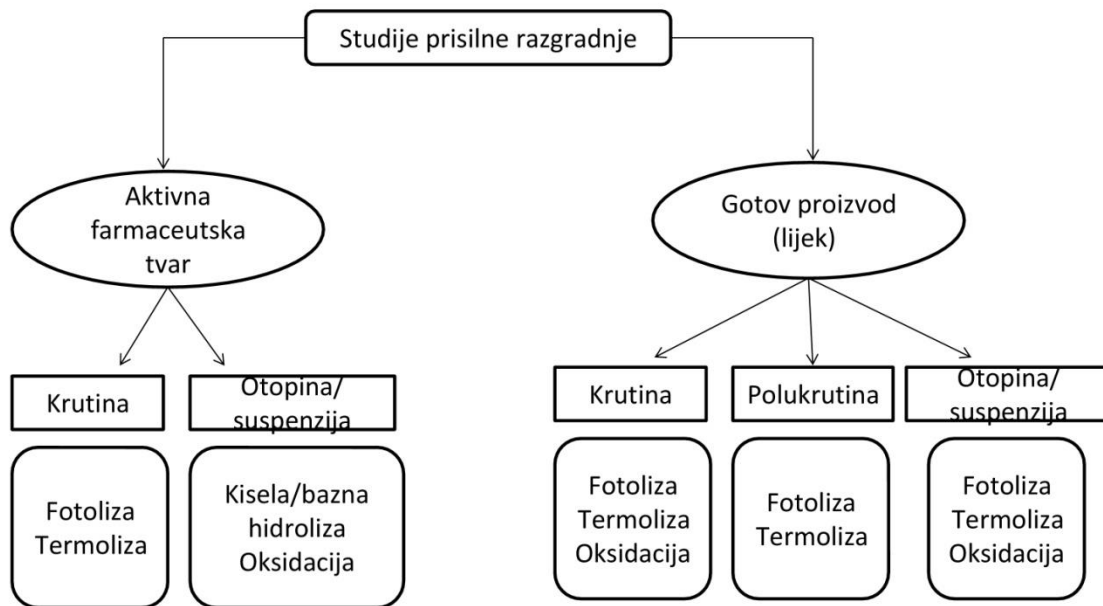
2 engl. *Food and Drug Administration*, FDA

3 engl. *International Committee for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH

2. Razlikovati produkte razgradnje koji su povezani s ljekovitom tvari od onih koji su generirani iz pomoćnih tvari u formulaciji.
3. Objasniti strukturu nastalih produkata prisilne razgradnje.
4. Utvrditi unutarnju stabilnost djelatne odnosno ljekovite tvari u početnoj formulaciji.
5. Otkriti mehanizme razgradnje ljekovite tvari i gotovog proizvoda kao što su hidroliza, oksidacija, fotoliza i termoliza.
6. Razumjeti kemijska svojstva molekula.
7. Utvrditi prirodu razvijenih analitičkih metoda s obzirom na njihovo određivanje stabilnosti.
8. Stvoriti stabilniju formulaciju.

### **2.1.2. Uvjeti prisilne razgradnje**

U studijama prisilne razgradnje ispituju se utjecaji temperature, vlažnosti, oksidacije, hidrolize i svjetlosti na ljekovitu tvar ili gotov proizvod. Ispitivanja prisilne razgradnje preporučeno je provesti u ranoj fazi kliničkih ispitivanja aktivne farmaceutske tvari kako bi se dobilo što više vremena za određivanje mogućih razgradnih produkata i njihovih struktura kao i vremena za odabir optimalnih uvjeta razgradnje. Na temelju ranih ispitivanja prisilne razgradnje mogu se, također, iznijeti pravovremene preporuke za poboljšanja u proizvodnom procesu kao i za odabir prikladne stabilitetno-indikativne metode [7]. Slika 2.1. prikazuje pod kojim uvjetima se odvija prisilna razgradnja aktivne farmaceutske tvari odnosno gotovog proizvoda.



**Slika 2.1.** Prisilna razgradnja aktivne farmaceutske tvari i gotovog proizvoda

### 2.1.2.1. Hidroliza

Hidroliza je kemijska reakcija koja uključuje razgradnju kemijskog spoja u reakciji s vodom. To je jedna od najzastupljenijih kemijskih reakcija s velikim rasponom pH vrijednosti. Hidroliza u kiselim i baznim uvjetima uključuje katalizu ioniziranih funkcionalnih grupa prisutnih u molekuli kemijskog spoja. Kiseli odnosno, bazni uvjeti podrazumijevaju razgradnju molekule izlaganjem tvari kiselim i baznim uvjetima koji izazivaju nastajanje primarnih produkata razgradnje u širokom rasponu. Izbor vrste i koncentracije kiseline odnosno baze ovisi o stabilnosti molekule ljekovite tvari [1]. Najčešće korištene kiseline kod kisele hidrolize jesu klorovodična i sumporna kiselina ( $0.1-1 \text{ mol L}^{-1}$ ) dok su najčešće korištene baze za baznu hidrolizu natrijev i kalijev hidroksid ( $0.1-1 \text{ mol L}^{-1}$ ) [8, 9]. Ako je kemijski spoj slabo topiv u vodi, za njegovo otapanje koriste se neka druga otapala u kombinaciji s vodom. Izbor otapala ovisi o strukturi molekula kemijskog spoja, tj. ljekovite tvari. Reakcija hidrolize provodi se pri sobnoj temperaturi no, ukoliko pri tim uvjetima ne dolazi do razgradnje temperatura se povisuje ( $50-70 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Također, ispitivanja ovakve vrste ne smiju trajati duže od 7 dana. Kako ne bi došlo do daljnje razgradnje, otopina razgrađenog

uzorka na kraju se neutralizira odgovarajućom bazom ili kiselinom [1].

### 2.1.2.2. Oksidacija

Za oksidaciju ljekovite tvari prilikom prisilne razgradnje kao oksidirajuće sredstvo najčešće se koristi vodikov peroksid, ali i drugi oksidirajući agensi kao što su metalni ioni, kisik i radikali. Vrsta oksidirajućeg sredstva, njegova koncentracija i odabir ostalih uvjeta ovisi o prirodi ljekovite tvari. Smatra se kako optimalan stupanj razgradnje daje primjena 0,1-3 % otopine vodikovog peroksida pri neutralnom pH i sobnoj temperaturi [1]. Oksidacija aktivne farmaceutske tvari najčešći je mehanizam razgradnje ljekovite tvari, a uključuje prijelaz elektrona i stvaranje aniona i kationa, no njen mehanizam može biti veoma složene prirode.

### 2.1.2.3. Termička razgradnja

Termička razgradnja je razgradnja koja se provodi izlaganjem krute tvari ili otopine povišenim temperaturama koje uzrokuju kidanje kovalentnih veza u molekuli [10]. Kruti uzorci aktivne farmaceutske tvari ili gotovog proizvoda podvrgavaju se suhim i vlažnim uvjetima povišene temperature, dok se tekući uzorci gotovog proizvoda podvrgavaju samo suhim uvjetima. Utjecaj temperature na termičku razgradnju tvari može se opisati Arrheniusovom jednačbom:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (2-1)$$

pri čemu  $k$  predstavlja konstantu brzine reakcije,  $A$  Arrheniusovu konstantu,  $E_a$  energiju aktivacije,  $R$  opću plinsku konstantu i  $T$  temperaturu. Ispitivanja termičke razgradnje najčešće se provode pri 40-80 °C. Kod viših temperatura ispitivanja moguća je pojava drugih mehanizama razgradnje i produkata razgradnje koji se neće pojaviti pri normalnim uvjetima skladištenja i transporta gotovog proizvoda. Prilikom termičke razgradnje najčešće se odvijaju reakcije dehidratacije, dekarboksilacije, izomerizacije i dimerizacije [11, 12].

#### **2.1.2.4. Fotolitička razgradnja**

Velik broj aktivnih farmaceutskih tvari osjetljiv je na izvor svjetlosti stoga, prilikom proizvodnje i skladištenja gotovih farmaceutski proizvoda može doći do njihove razgradnje. Iz tog su razloga fotokemijska istraživanja bitan dio studija prisilne razgradnje iz kojeg se dobiva uvid u fotokemijsko ponašanje lijekova. Uporaba odgovarajućih spremnika i ambalažnog materijala može zaštititi proizvode od štetnih učinaka svjetlosti. Osjetljivost lijeka na određeno područje spektra svjetlosti varira ovisno o kemijskog strukturi aktivne farmaceutske tvari, fotoreaktivnosti te samoj prirodi doziranja lijeka [13]. Fotokemijska ispitivanja provode se izlaganjem uzorka utjecaju ultraljubičastog ili vidljivog dijela spektra. Valna duljina svjetlosti prilikom koje najčešće dolazi do fotolitičke razgradnje varira u rasponu od 300-800 nm. Po završetku ispitivanja, uzorcima se određuju promjene fizikalnih svojstava te sadržaj aktivne farmaceutske tvari i onečišćenja [1].

#### **2.1.3. Klasifikacija onečišćenja**

Onečišćenjem se smatra svaki sastojak aktivne farmaceutske tvari koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u gotovom proizvodu ili svaki sastojak ljekovite tvari bez definiranog kemijskog entiteta kao ljekovite tvari. To su, dakle, neželjeni spojevi koji, ovisno o njihovoj količini u ispitivanom uzorku, mogu utjecati na sigurnost i učinkovitost gotovog lijeka [14, 15].

Nadalje, prema ICH smjernicama onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala.

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje i/ili skladištenja gotovog farmaceutskog proizvoda, a mogu biti identificirana, neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva.

Uključuju:

- početne sirovine i međuprodukte
- nusprodukte
- procesne i razgradne produkte
- reagense, ligande i katalizatore.

Ovisno o količini onečišćenja koja se nalaze u ispitivanom uzorku, proizvođač ih je dužan



navesti u izjavi onečišćenja, identificirati ili kvalificirati [14].

Anorganska onečišćenja nastaju u procesu proizvodnje, najčešće su poznata i identificirana, a uključuju:

- anorganske soli
- teške metale ili druge zaostale metale
- reagense, ligande i katalizatore
- ostali materijal [14].

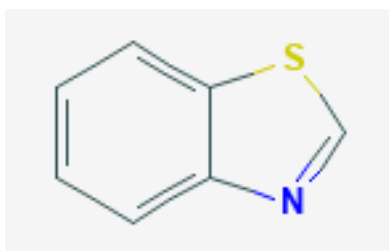
Ostatna otapala su organske ili anorganske, hlapljive ili nehlapljive tekućine koje služe za pripremu otopina ili suspenzija u sintezi nove ljekovite tvari ili nastaju u procesu proizvodnje istih. Dije se u tri skupine:

- otapala koja treba izbjegavati: kancerogena otapala i otapala opasna za okoliš
- otapala koja treba ograničiti: moguća neurotoksičnost, teratogenost i druge vrste toksičnosti
- otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi [16].

Poznavanje strukture nečistoća u farmaceutski aktivnoj tvari neophodno je za prilagođavanje reakcijskih uvjeta proizvodnog procesa, a samim tim i za smanjenje količine nečistoća gotovog proizvoda na prihvatljivu razinu. Stoga su, izolacija, identifikacija i kvantifikacija nečistoća neizostavni dio prilikom razvoja jednog lijeka i samim tim pružaju određenu sigurnost u terapiji lijekovima.

## 2.2. Benzotiazol

Benzotiazol spada u skupinu aromatskih heterocikličkih spojeva čija se molekula sastoji od tiazolnog prstena kondenziranog na položaju 4 i 5 na benzensku jezgru [17].



**Slika 2.2.** Strukturna formula benzotiazola [18]

Veza C-2-N peteročlanog prstena ima svojstvo dvostruke veze, dok ostale veze tiazolnog prstena pokazuju svojstvo jednostruke veze. S obzirom da se najveće vrijednosti negativnog naboja nalaze na atomima dušika i sumpora, ukupan naboj u heterocikličkom dijelu molekule je negativan, dok je benzenski prsten pozitivan. Iz tog je razloga molekula benzotiazola neutralna molekula [19].

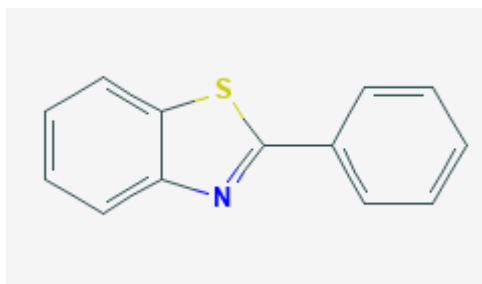
### **2.2.1. Biološka svojstva derivata benzotiazola**

U današnje vrijeme virusne i tumorske bolesti smatraju se drugim po redu uzročnicima smrti u svijetu, stoga potraga za antivirusnim i antitumorskim lijekovima predstavlja vrlo važan cilj suvremenih istraživanja u medicinskoj kemiji. DNA, ali i u rastućem opsegu RNA dvije su potencijalne mete za antivirusne i antitumorske supstancije pa je pronalaženje novih bioloških aktivnijih supstancija usmjereno ka sintezi novih spojeva koji se vežu na DNA ili RNA odnosno koji inhibiraju specifične proteine [20].

Kao što je već spomenuto u uvodu, u skupinu potencijalnih terapeutika za liječenje virusnih i tumorskih bolesti spada velik broj derivata benzotiazola koji pokazuju širok spektar biološkog djelovanja i zanimljiva kemijska i fizikalna svojstva.

Benzotiazol je sastavni dio strukture mnogih organskih sintetskih i prirodnih spojeva. U posljednjih nekoliko godina sve veća pažnja posvećuje se benzotiazolima supstituiranim s odgovarajućim supstituentima koji pokazuju izraženije i selektivnije antitumorsko djelovanje pa interes za istraživanjem njihove biološke i farmakološke aktivnosti sve više raste. Posebna pažnja prilikom istraživanja posvećena je njihovim antialergijskim, protuupalnim, antitumorskim i analgetskim svojstvima. S obzirom na njihov mehanizam djelovanja, pokazalo se da derivati benzotiazola djeluju kao inhibitori tirozin-kinaza i topoizomeraza, odnosno kao lijekovi koji se koriste u terapiji tumora [21]. Iz tog su razloga, benzotiazolni spojevi od značajnog interesa u raznolikoj farmaceutskoj namjeni.

Posebno zanimljivi za istraživanje jesu derivati 2-fenilbenzotiazola (slika 2.3.).

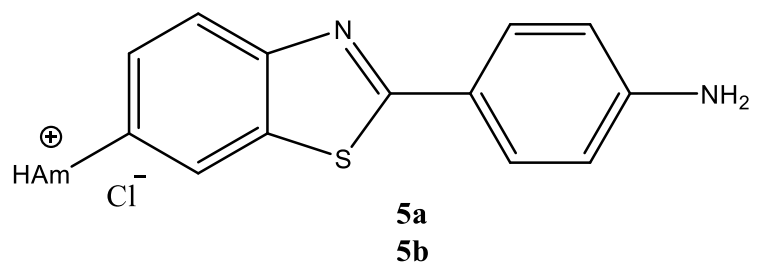
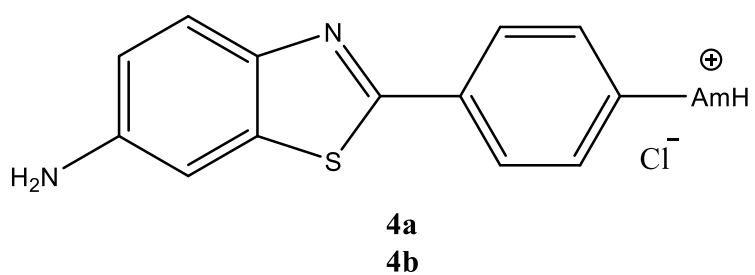
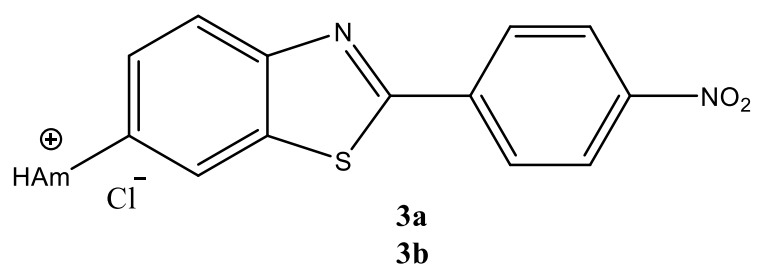
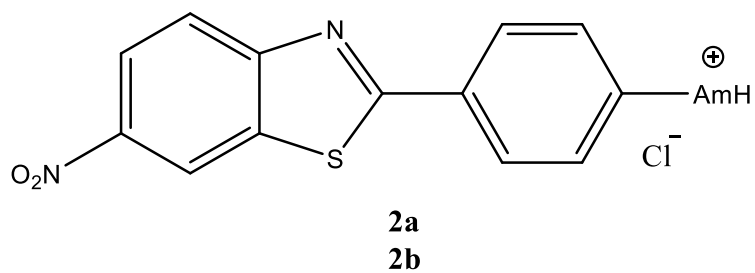
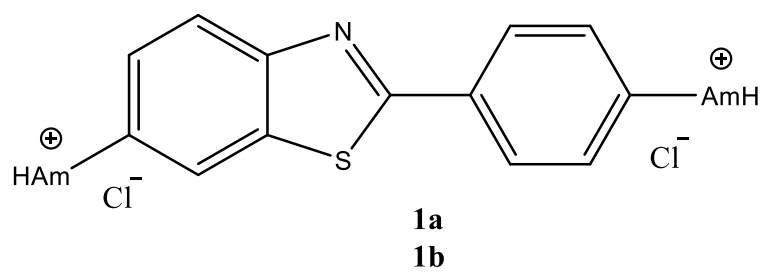


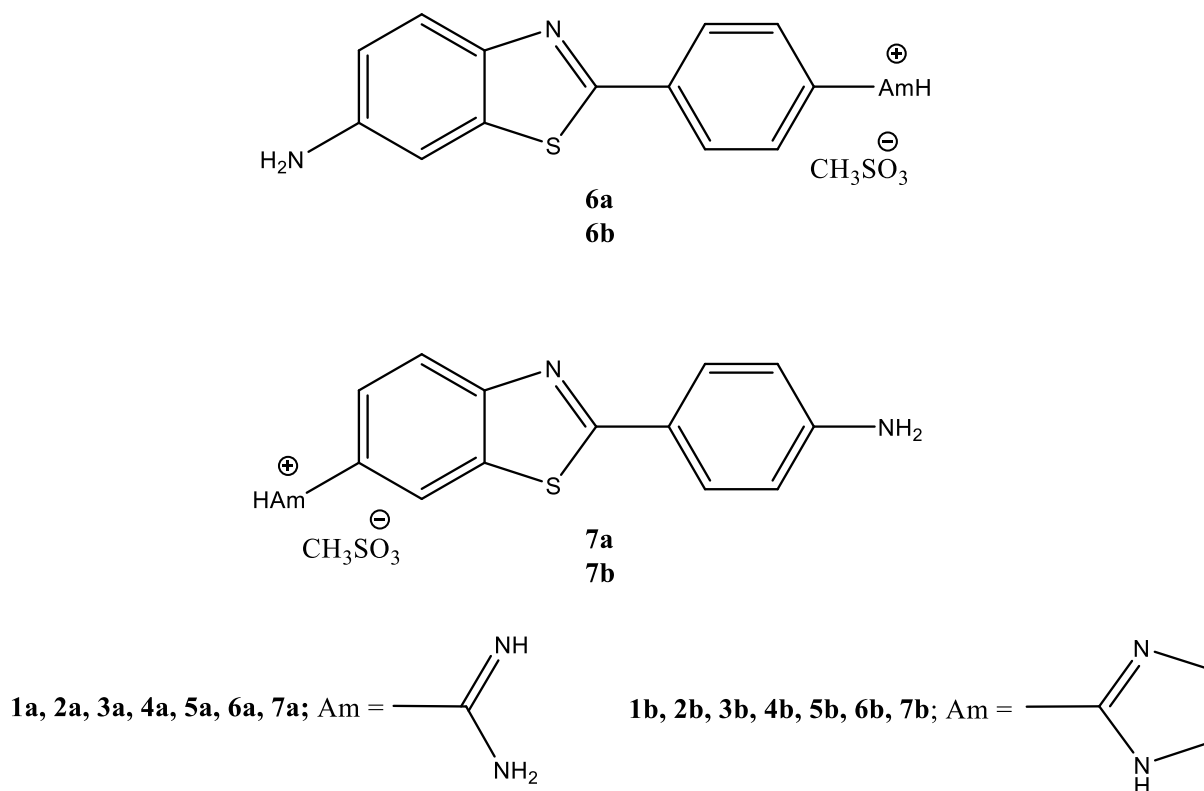
**Slika 2.3.** Strukturna formula 2-fenilbenzotiazola [22]

Studije su pokazale da antiproliferativna aktivnost sintetiziranih derivata 2-fenilbenzotiazola bitno ovisi o položaju supstituenta na kosturu 2-fenilbenzotiazola kao i o vrsti amidinskog supstituenta na istom (slika 2.4.) [23].

Naime, svi kloridi derivata 2-fenilbenzotiazola (1-5) osim diamidino supstituiranog 2-fenilbenzotiazola (1a) pokazuju odgovarajuću citotoksičnost te izraženu inhibitorsku aktivnost prema rastu tumorskih stanica. Zanimljivo, kada je kostur 2-fenilbenzotiazola s obje strane supstituiran imidazolinilskom grupom (2b) inhibitorsko djelovanje je jače izraženo ali neselektivno. Općenito, nitro-amidino supstituirani 2-fenilbenzotiazol derivati (2 i 3) pokazuju sličnu inhibitorsku aktivnost kao njihovi amino-amidino supstituirani analozi (4 i 5). Ipak, nitro-imidazolinil supstituirani spojevi (2b i 3b) djeluju manje inhibitorski u usporedbi s nitro-amidino supstituiranim analogima (2a i 3a) koji su neselektivno citotoksični. S druge strane, amino-imidazolinil supstituirani spojevi (4b i 5b) u određenoj mjeri pokazuju snažnije inhibitorsko djelovanje od amino-amidino supstituiranih 2-fenilbenzotiazola (4a i 5a). Studije su također pokazale, iako razlike nisu značajne, da spojevi imaju veće inhibitorsko djelovanje kada je amidinska skupina vezana za fenilni prsten nego kad je ona vezana direktno na prsten benzotiazola [21].

S obzirom na rezultate ispitivanja antiproliferativne aktivnosti mesilata derivata 2-fenilbenzotiazola (6 i 7), ovisnost položaja i vrste supstituenta (amidino/imidazolinil) nije u potpunosti utvrđena. Ipak, imidazolinilska skupina pokazuje nadmoć u odnosu na amidinsku skupinu u inhibitorskom djelovanju na neke tumorske stanice.





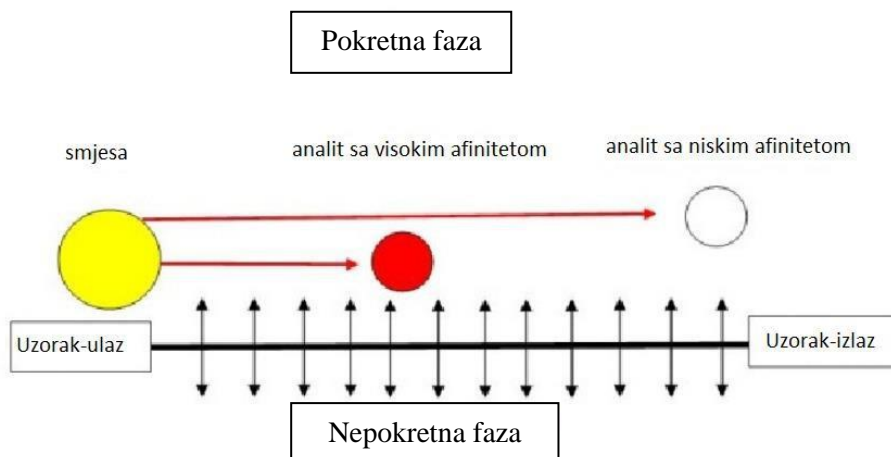
**Slika 2.4.** Primjeri derivata 2-fenilbenzotiazola (preuzeto i prilagođeno) [21, 23]

### 2.3. Analitičke tehnike za analizu uzoraka podvrgnutih prisilnoj razgradnji

Detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje onečišćenja pa tako i produkata prisilne razgradnje aktivne farmaceutske tvari važni su koraci u ispitivanju profila čistoće lijeka prije plasiranja lijeka na tržište. Najčešće korištene tehnike za analizu uzoraka podvrgnutih prisilnoj razgradnji jesu kromatografske tehnike koje pružaju mogućnost određivanja pojedinačnih analita u smjesi pomoćnih tvari i razgradnih produkata. Ovisno o vrsti analita razvijaju se metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti dok je primjena plinske kromatografije ograničena na hlapljive i termostabilne tvari. Za karakterizaciju produkata prisilne razgradnje najčešće se koriste kromatografske tehnike u sprezi sa spektrometrijom masa ili nuklearnom magnetskom rezonantnom spektroskopijom [24].

### 2.3.1. Kromatografija

Kromatografske tehnike su najčešće korištene tehnike za analizu uzoraka podvrgnutih prisilnoj razgradnji, a uključuju odjeljivanje, identifikaciju i određivanje strukture razgradnih produkata [25]. Kromatografija je analitička metoda koja omogućuje odjeljivanje sastojaka ispitivanog uzorka između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna. Nepokretna (stacionarna) faza može biti čvrsta, kapljevita ili u obliku gela, dok je pokretna (mobilna) faza fluid koji prolazi kroz nepokretnu fazu ili uzduž nje u određenom smjeru [26]. Odjeljivanje sastojaka smjese temelji se na različitoj brzini kretanja komponenata kroz kromatografsku kolonu do kojeg dolazi zbog različitih interakcija komponenata smjese s nepokretnom, odnosno nepokretnom i pokretnom fazom. Pokretna faza prenosi otopljene tvari preko nepokretne faze. Iz tog razloga, zadržavanje sastojaka smjese na nepokretnoj fazi mora biti selektivno kako bi oni uz nju bili različito dugo vezani čime dolazi do razdvajanja smjese. Kromatografske tehnike se prema agregatnom stanju pokretne faze dijele na tekućinsku kromatografiju, LC<sup>4</sup>, plinsku kromatografiju<sup>5</sup> i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima, SFC<sup>6</sup> [25].



Slika 2.5. Princip kromatografije [27]

4 engl. *Liquid Chromatography*, LC

5 engl. *Gas Chromatography*, GC

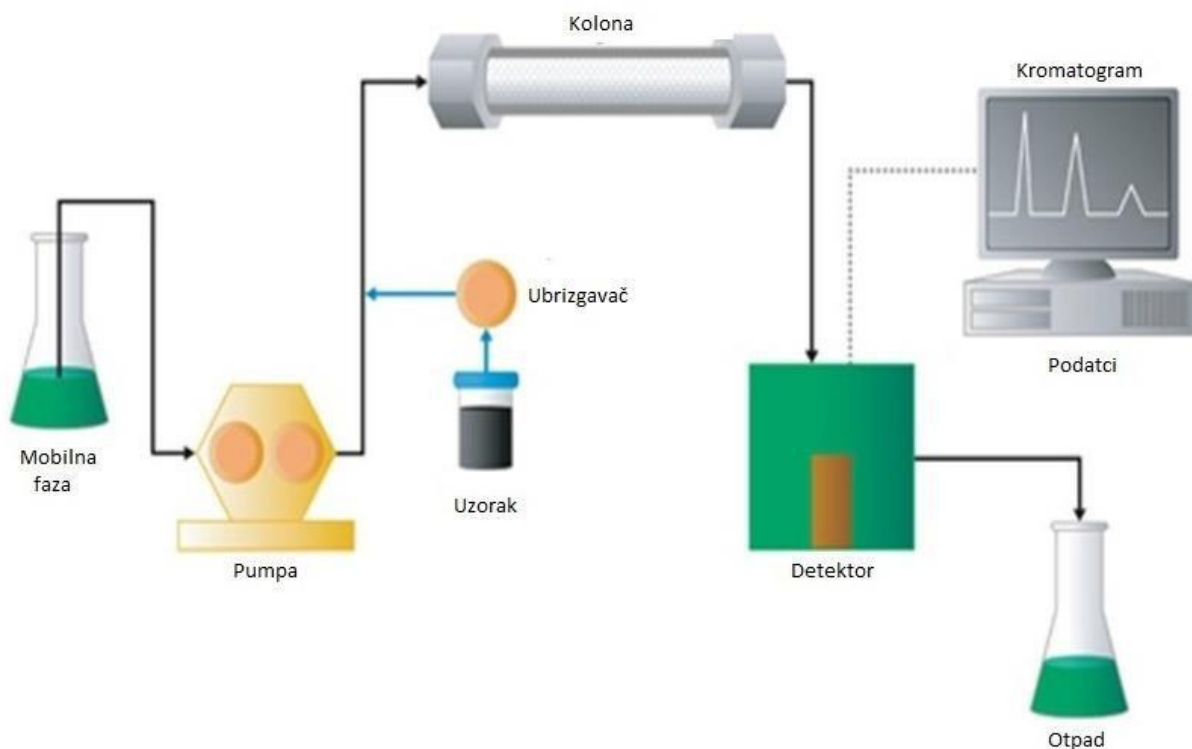
6 engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC

### 2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija najčešće je korištena separacijska tehnika koja se koristi za odjeljivanje otopljenih tvari. Njome se određuju polarni i nepolarni spojevi u farmaceutskoj, kemijskoj, biokemijskoj i drugim industrijama. Također se koristi za razdvajanje, kvalitativnu i kvantitativnu analizu aktivne farmaceutske tvari, reakcijskih onečišćenja i produkata razgradnje [28].

Kod tekućinske kromatografije (LC) otapalo kroz kolonu putuje silom gravitacije, dok kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) ono putuje pod visokim tlakom kako bi se prevladao pad tlaka u koloni što, nadalje, smanjuje vrijeme zadržavanja. Iz tog se razloga, HPLC uređaj smatra naprednijim tipom LC uređaja [29]. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti jedna je od najbržih, najsigurnijih i najpreciznijih metoda kojom se provjerava čistoća novih kemijskih spojeva, prate promjene tijekom procesa proizvodnje i određuje kvaliteta gotovog farmaceutskog proizvoda [30].

HPLC uređaj sastoji se od spremnika za pokretnu fazu, pumpe, sustava za uvođenje uzorka, kolone, detektora te sustava za obradu podataka (slika 2.6.).



Slika 2.6. Dijelovi HPLC uređaja [31]

Sustav za dovođenje pokretne faze sastoji se od jednog ili više spremnika pokretne faze koji omogućuje konstantan protok pokretne faze u sustav. Kao pokretna faza koriste se otapala visoke čistoće, bez prisustva otopljenih plinova ili suspendiranih čestica te ona mora biti kompatibilna s analitom, razgradnim produktom i mogućim onečišćenjima [4]. Pumpa stvara pritisak na pokretnu fazu (do 15 MPa) kako bi ona moglo proći kroz kolonu. Pumpe moraju zadovoljavati vrlo stroge uvjete odnosno, moraju generirati dovoljan tlak kroz kolonu, biti prikladne za veliki raspon otapala, stvoriti ujednačen pritisak bez promjena, isporučivati konstantnu brzinu protoka otapala u minuti itd. Injektor uzorka služi za unos uzorka u pokretnu fazu prije ulaska u kolonu. Posebno je dizajniran za tu namjenu s ciljem što manjih poremećaja. Kolona je najvažniji dio HPLC uređaja jer se u njoj odvija sam proces kromatografije. Izrađena je od nehrđajućeg čelika, a može biti od 50-300 mm dugačka. Unutar kolone nalazi se nepokretna faza čije su čestice veličine od 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Nakon prolaska kroz kolonu pod visokim tlakom, analit se analizira detektorom. Neki od najčešće korištenih detektora su spektrofotometrijski detektori (UV-VIS i detektor s nizom dioda), spektrometar masa (MS), elektrokemijski i amperokemijski detektor. Oni se međusobno razlikuju po načinu rada, ali svaki od njih daje signal koji je proporcionalan određenom svojstvu analita [25, 29-31, 33].

## 2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa,  $\text{MS}^7$  je analitička tehnika pomoću koje je moguće kvalitativno i kvantitativno analizirati molekule uzorka. Vrlo je pogodna jer analiza zahtjeva vrlo male količine uzorka, a daje značajne informacije o strukturi nepoznatih molekula. Načelo rada bazira se na stvaranju ioniziranih molekula odnosno, pozitivno i negativno nabijenih iona koji se potom, u plinovitoj fazi, djelovanjem vanjskom električnog i/ili magnetskog polja, razdvajaju na temelju njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) [34].

Spektrometrija masa može se koristiti kao zasebna metoda ili može biti dio vezanog sustava i koristiti se kao detektor u primjerice tekućinskoj kromatografiji. Prednost ovakvih vezanih sustava je ta što se pri analizi gubi vrlo malo uzorka [35].

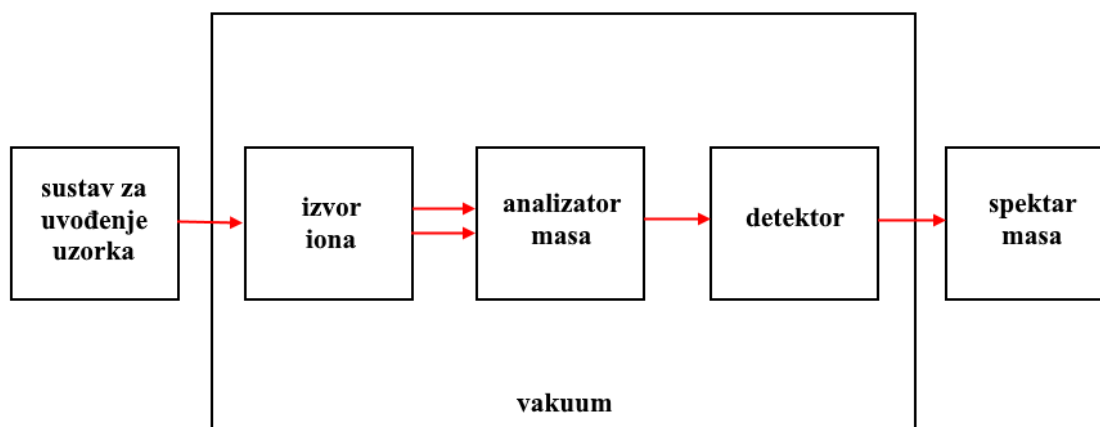
---

<sup>7</sup> engl. *Mass Spectrometry*, MS



## 2.4.1. Način rada spektrometra masa

Spektrometar masa, koji radi u visokome vakuumu, sastoji se od četiri osnovna dijela: sustava za unošenje uzorka, ionskog izvora, analizatora i detektora povezanog sa sustavom za obradu podataka (slika 2.7.).



Slika 2.7. Shema spektrometra masa

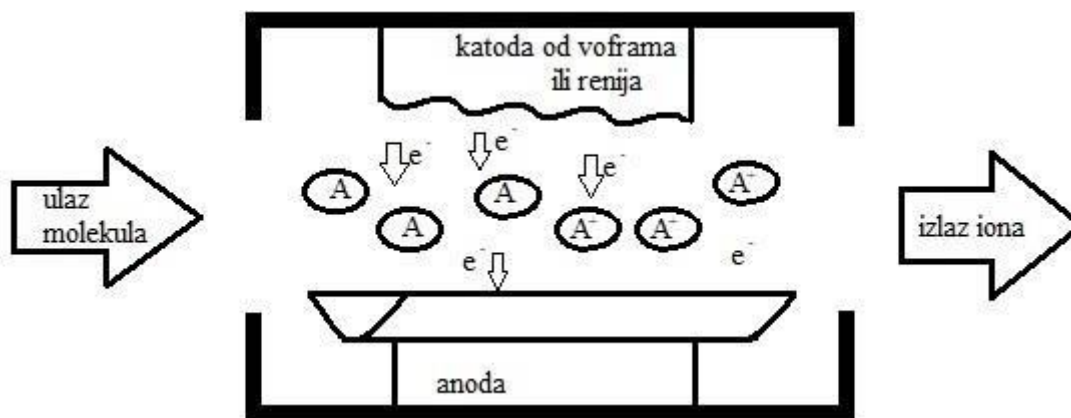
Kako bi se smanjile interakcije iona s česticama zraka, analizator masa mora biti u vakuumu. Tekući uzorak kroz tanku cijev dolazi do sustava gdje se uzorak odvaja od otapala kako prevelika količina otapala pretvorenog u paru ne bi poremetila vakuumsko okruženje. Zatim slijedi ionizacija uzorka koja uključuje dovođenje energije molekuli prilikom čega može doći do fragmentacije molekule na dva ili više fragmenta. Molekule koje nisu podlegle fragmentaciji nazivaju se molekulski ion, a u spektru daju signal s najvećom vrijednosti  $m/z$  [32]. Odabir tehnike ionizacije ovisi o vrsti i prirodi istraživane molekule, a ovisno o tehnici ionizacije, fragmentacija uzorka u spektrima masa biti će različita. Najčešće korištene tehnike su ionizacija elektronima<sup>8</sup>, kemijska ionizacija, CI<sup>9</sup>, ionizacija elektroraspršenjem, ESI<sup>10</sup> te matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, MALDI<sup>11</sup> [25]. Kod ionizacije elektronima, zraka elektrona visoke energije ( $E \approx 70$  eV), koju emitira grijana katoda od volframa ili renija, prolazi kroz paru uzorka čime nastaju nestabilni molekulski radikali skloni fragmentaciji na manje dijelove, koji se dalje kreću prema analizatoru masa [36]. Proces je prikazan na slici 2.8.

8 engl. *Electron Ionisation*, EI

9 engl. *Chemical Ionisation*, CI

10 engl. *ElectroSpray Ionisation*, ESI

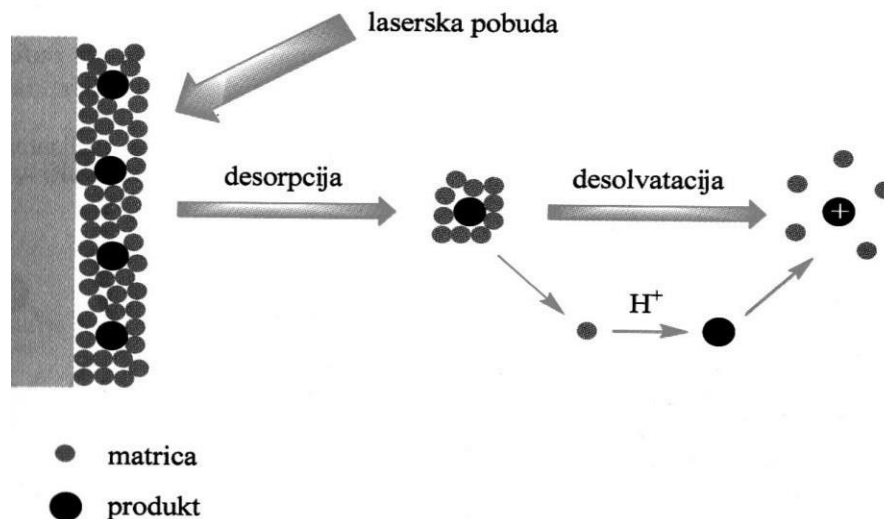
11 engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*, MALDI



**Slika 2.8.** Proces ionizacije elektronima [37]

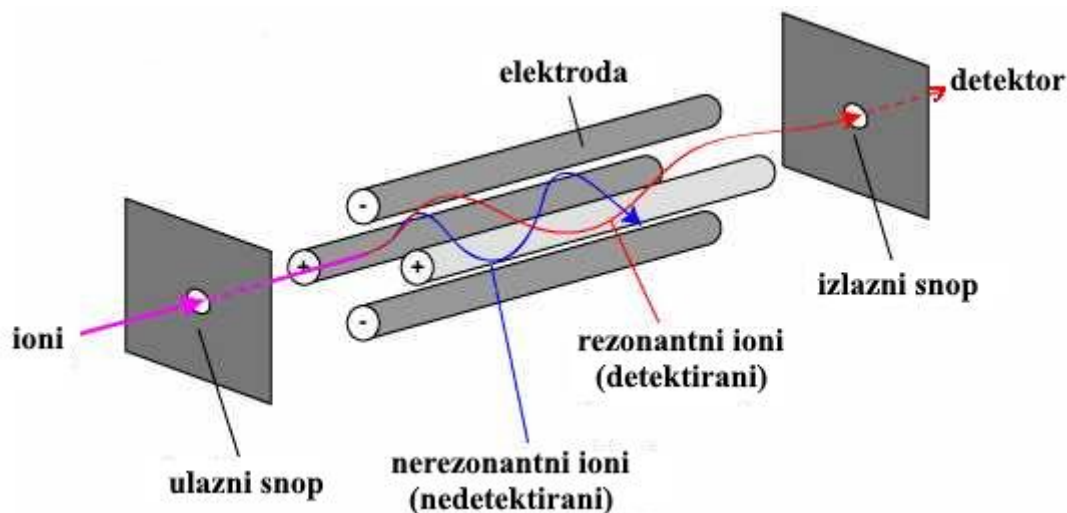
Nadalje, nestabilni spojevi primjenom EI ne daju molekulske radikale pa se primjenjuje kemijska ionizacija pri čemu se rasplinuti uzorak izlaže djelovanju reaktivnog plina ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ). Nastali kationi i anioni posjeduju manju energiju od fragmenata nastalih ionizacijom snopom elektrona. Ionizacija elektroraspršenjem najblaži je postupak prikladan za nestabilne i velike (nehlapljive) molekule. Primjenom električnog potencijala, otopina uzorka se protiskuje kroz kapilaru pri atmosferskom tlaku. Otopina se raspršuje u nabijene kapljice („sprej“), otapalo postupno isparava, a kapljice se sve više smanjuju čime raste njihov naboj. Na kraju, djelovanje Coulombovih sila izaziva raspadanje na još manje kapljice i nabijene ione. Tako nastali ioni putuju dalje prema analizatoru masa. Ionizacijom raspršenjem omogućeno je, tako, direktno prevođenje iona iz otopine u ione u plinovitoj fazi [38]. MALDI se provodi u dva koraka. Najprije se uzorak otapa u organskim molekulama (tzv. molekulama matriksa), a nakon otparavanja otapala zajedno s njima kristalizira. Osvjetljavanjem laserom, energija se prenosi na molekule matriksa koje je prenose uzorku te se on ionizira i prelazi u plinovitu fazu. Nedostatak ove tehnike je taj što je analiza ograničena na korištenje analizatora vremena leta, TOF<sup>12</sup> [39]. Proces ionizacije prikazan je na slici 2.9.

<sup>12</sup> engl. *Time of Flight*, TOF



**Slika 2.9.** MALDI proces [37]

Nakon ionizacije uzorka, ioni putuju u analizator masa koji ih razdvaja na temelju njihovog omjera mase i naboja,  $m/z$ . Razdvajanje iona provodi se u vakuumu pod utjecajem statičkog ili dinamičkog električnog i/ili magnetskog polja u vremenu ili prostoru [40]. Najčešće korišteni analizatori masa jesu kvadrupolni analizator masa,  $Q^{13}$  te TOF analizator. Sustav sa kvadrupolnim analizatorom masa sastoji se od četiri paralelne šipke (elektrode) na međusobno jednakoj udaljenosti. Između svakog para nasuprotnih elektroda djeluje električno polje unutar kojeg ioni putuju smjeru osi  $z$  sa oscilacijama po  $x$  i  $y$  osi. Stabilni ioni s karakterističnim omjerom  $m/z$  ostaju na svojoj putanji i dolaze do detektora, dok se ostali sudaraju s pozitivnom i negativnom elektrodom i bivaju neutralizirani i tako ne stižu do detektora (slika 2.10.). Kvadrupolni analizatori masa su robusni, ekonomični, fizički mali i lakše se povezuju sa širokim rasponom ulaznih sustava u usporedbi s drugim konvencionalnim analizatorima masa [41].



**Slika 2.10.** Shema kvadrupolnog analizatora masa [42]

U analizatoru vremena leta ioni se ubrzavaju pod utjecajem električnog polja nakon čega putuju kroz vakuum, bez prisustva električnog ili magnetskog polja, prema detektoru. Brzina iona proporcionalna je njegovoj masi odnosno omjeru  $m/z$ . Drugim riječima, ioni veće vrijednosti omjera putuju sporije od onih s manjim vrijednostima  $m/z$ . Masa iona se, zatim, računa iz vremena koje je potrebno da ion dođe od izvora do detektora [41]. Analizator koji mjeri vrijeme leta često se kombinira s kvadrupolnim analizatorom masa, tzv. Q-TOF uređaj. Tada je riječ o spregnutoj (tandemskoj) spektrometriji masa (MS/MS).

Po izlasku iz analizatora ioni odlaze na detektor koji bilježi broj iona pri svakoj vrijednosti  $m/z$ , a kao krajnji rezultat dobije se spektar masa.

#### **2.4.2. Vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (HPLC-MS/MS)**

Vezani, odnosno spregnuti sustav sadrži tehniku koja odjeljuje sastojke smjese, u ovom slučaju to je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, i tehniku koja odijeljene uzorke detektira, u ovom slučaju to je spektrometrija masa. Nadalje, sve češće se koristi kombinacija više analizatora istovremeno (tzv. tandemna spektrometrija masa – MS/MS) kojom se prate individualni ioni u grupi iona s ciljem određivanja podrijetla ionskog fragmenta [43]. Primjenom LC-MS tehnike strukturni izomeri sličnog kemijskog ponašanja jednostrukim ioniziranjem daju iste ione u spektrometru masa, dok se dodatnim fragmentiranjem, odnosno

primjenom LC-MS/MS tehnike, u spektrometru masa vide različiti ionski fragmenti [4]. Na taj su način razvijene brze i osjetljive metode za analizu aktivnih farmaceutskih tvari, njihovih mogućih razgradnih produkata i onečišćenja [12].

## 2.5. Procjena toksičnosti farmaceutski aktivnih tvari

Prilikom određivanja sigurnosti lijekova najviše pažnje pridaje se nepoželjnim svojstvima uzrokovanih razgradnim produktima i onečišćenjima koji uvelike smanjuju sigurnost i kvalitetu gotovog lijeka. Jednim takvim nepoželjnim svojstvom smatra se i toksičnost. Toksične tvari imaju štetan učinak na organizam odnosno uzrokuju prolazno ili trajno neželjeno djelovanje u organizmu [44].

### 2.5.1. T.E.S.T.

Najčešći softverski alat koji se koristi za procjenu toksičnosti spojeva jest T.E.S.T.<sup>14</sup> program. Svrha softvera TEST jest procijeniti vrijednosti toksičnosti i fizikalna svojstva kemikalija na temelju njihove molekulske strukture (tzv. molekulskih deskriptora). Procijenjene vrijednosti toksičnosti i fizikalnih svojstava mogu se koristiti za pružanje podataka potrebnih za poboljšanje održivosti dizajna kemijskih procesa ili za odabir tzv. zelenijih otapala. Softverski alat za procjenu toksičnosti omogućuje jednostavnu procjenu toksičnosti i fizikalnih svojstava pomoću različitih QSAR modela bez potrebe za korištenjem dodatnih programa [45].

### 2.5.2. QSAR modeli

Modeli odnosa strukture i aktivnosti, SAR<sup>15</sup> i kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti, QSAR<sup>16</sup> su teorijski modeli koji se mogu koristiti za kvantitativno ili kvalitativno predviđanje fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava tvari na temelju njegove kemijske strukture [46]. Akutna razina toksičnosti jedan je od primjera mjera toksičnosti koji se mogu predvidjeti iz

---

<sup>14</sup> engl. *Toxicity Estimation Software Tool*, T.E.S.T.

<sup>15</sup> engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR

<sup>16</sup> engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR

QSAR-a. Jednostavni QSAR modeli izračunavaju toksičnost kemikalija pomoću jednostavne linearne funkcije:

$$\text{tokičnost} = ax_1 + bx_2 + c \quad (2-2)$$

pri čemu su  $x_1$  i  $x_2$  neovisne varijable, a  $a$ ,  $b$  i  $c$  ugrađeni parametri. Molekulska težina i koeficijent raspodjele oktanol-voda,  $K_{ow}$  primjeri su neovisnih varijabli.

Neka od fizikalnih svojstva koja se mogu odrediti T.E.S.T. programom jesu: talište, vrelište, topljivost u vodi, relativna gustoća, površinska napetost, toplinska vodljivost, viskoznost, tlak pare itd.

Kao što je već rečeno, T.E.S.T. program omogućuje procjenu vrijednosti toksičnosti pomoću nekoliko QSAR metoda:

- **Hijerarhijska metoda grupiranja:** toksičnost zadanog spoja procjenjuje se koristeći prosjek predviđanja dobiven iz više modela
- **Metoda pojedinačnog modela:** vrijednosti toksičnosti procjenjuju se pomoću multiregresijskog linearnog modela primjenom genetičkog algoritamskog pristupa koristeći molekularne deskriptore kao nezavisne varijable
- **Metoda grupnog doprinosa:** vrijednosti toksičnosti se procjenjuju pomoću multiregresijskog linearnog modela koristeći molekulske fragmente kao nezavisne varijable
- **Metoda najbližeg susjeda:** vrijednosti toksičnosti procjenjuju se uzimajući u obzir prosjek vrijednosti triju molekula najbližijih zadanom spoju
- **Konsenzus metoda:** toksičnost se procjenjuje uzimajući u obzir prosjek predviđenih vrijednosti toksičnosti dobivenih pomoću iznad navedenih QSAR modela ako su vrijednosti unutar domene primjenjivosti [47].

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

## 3.1. Materijali

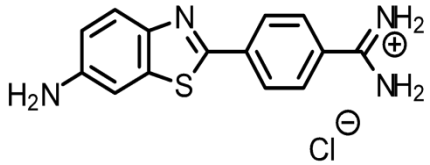
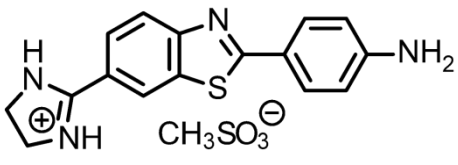
### 3.1.1. Kemikalije

Za eksperimentalni dio ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- HCl; proizvođač: Biovit d.o.o., Varaždin, Hrvatska, stupanj čistoće *p.a*
- NaOH; proizvođač: Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska, stupanj čistoće *p.a*
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, otopina 30 %-zna; proizvođač: Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska, stupanj čistoće *p.a*
- Acetonitril; proizvođač: Fisher Scientific, SAD
- Ultračista voda, Mili-Q; Milipore Simplicity UV

### 3.1.2. Ispitivani derivati 2-fenilbenzotiazola

Tablica 3.1. Prikaz ispitivanih derivata 2-fenilbenzotiazola

|                       | LD-4  | LD-5  |
|-----------------------|---|---|
| Naziv po IUPAC-U      | 2-(4-amidinofenil)-6-aminobenzotiazol-klorid  | 2-(4-aminofenil)-6-(imidazolin-2-il)benzotiazol-mesilat                               |
| Strukturna formula    |  |  |
| Molarna masa, [g/mol] | 304,80  | 390,48  |



## 3.2. Instrumenti

### 3.2.1. Analitička vaga

Za precizno određivanje mase uzorka (farmaceutika) korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105DU, čija je mogućnost očitavanja 0,01 mg, a maksimalan kapacitet 120 g.



Slika 3.1. Mettler Toledo XA105DU

### 3.2.2. Sušionik

Za sušenje uzoraka korišten je sušionik Instrumenaria, čiji je raspon temperature zagrijavanja od sobne temperature do 200 °C.



Slika 3.2. Sušionik

### 3.2.3. Ultrazvuk

Kao pomoć pri otapanju i homogenizaciji uzorka s otapalom korišten je ultrazvučni uređaj.



**Slika 3.3.** Ultrazvučni uređaj

### 3.2.4. Uređaj za osvjetljivanje simuliranim zračenjem

Za ispitivanje promjena svojstava uzoraka uzrokovanih sunčevom svjetlošću u kratkom vremenskom periodu korišten je SUNTEST CPS+.

Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht, Njemačka) (slika 3.4.) je uređaj koji služi za osvjetljavanje uzoraka umjetnim Sunčevim zračenjem u rasponu valnih duljina 300-800 nm. Izvor umjetnog Sunčeva zračenja je ksenonska lampa. Parametri koji se mogu podešavati su temperatura, intenzitet lampe i vrijeme izlaganja uzorka zračenju.

Otopine ispitivanih spojeva osvjetljavane su u posudicama od kvarcnog stakla kako bi se potaknuo fotooksidacijski mehanizam slobodnih radikala te njihova fotolitička razgradnja.



**Slika 3.4.** Suntest CPS+

### **3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (HPLC-QTOF)**

Za analizu uzoraka podvrgnutih prisilnoj razgradnji korišten je HPLC Agilent Series 1290 Infinity II uređaj (slika 3.5.) spojen na spektrometar masa Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) (slika 3.6.).



**Slika 3.5.** HPLC sustav Agilent 1290 Infinity II



**Slika 3.6.** Spektrometar masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF)

### 3.3. Opis rada

#### 3.3.1. Priprema standardnih otopina

Pripremljene su standardne otopine uzoraka koncentracije 200 mg/L otapanjem 1 mg uzorka u tikvici od 5 mL u određenom otapalu. U tablici su prikazana otapala za korištene uzorke.

**Tablica 3.2.** Otapala korištena za uzorke

| UZORAK | OTAPALO          |
|--------|------------------|
| LD-4   | 20 % acetonitril |
| LD-5   | Mili-Q voda      |

Iz standardnih otopina napravljene su otopine koncentracije 10 mg/L za analizu na HPLC-QTOF uređaju.

### **3.3.2. Priprema uzoraka za ispitivanje prisilne razgradnje**

#### **3.3.2.1. Kisela hidroliza**

Ispitivanje razgradnje u kiselim uvjetima provedeno je na sljedeći način:

Na analitičkoj vagi važe se 1 mg uzorka u tikvicu od 5 mL. Uzorak se zatim otopi u 2 mL određenog otapala te se otopini doda 500 µL 0,5 M otopine HCl. Tako pripremljena otopina pusti se da odstoji 6 sati u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se neutralizira s 500 µL 0,5 M otopine NaOH i nadopuni Mili-Q vodom do oznake. Otopina se zatim prebaci u vijalicu nakon čega se snima na HPLC-QTOF uređaju.

#### **3.3.2.2. Bazna hidroliza**

Ispitivanje razgradnje u baznim uvjetima provedeno je na analogan način:

Na analitičkoj vagi važe se 1 mg uzorka u tikvicu od 5 mL. Uzorak se zatim otopi u 2 mL određenog otapala te se otopini doda 500 µL 0,5 M otopine NaOH. Tako pripremljena otopina pusti se da odstoji 6 sati u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se neutralizira s 500 µL 0,5 M otopine HCl i nadopuni Mili-Q vodom do oznake. Otopina se zatim prebaci u vijalicu nakon čega se snima na HPLC-QTOF uređaju.

#### **3.3.2.3. Oksidacija**

Ispitivanje razgradnje uzoraka oksidacijskim putem, korištenjem vodikovog peroksida, provedeno je na sljedeći način:

Na analitičkoj vagi važe se 1 mg uzorka u tikvicu od 5 mL. Uzorak se zatim otopi u 2 mL određenog otapala te se otopini doda 1 mL 10 %-tne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tako pripremljena otopina pusti se da odstoji 6 sati u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega se nadopuni Mili-Q vodom do oznake. Otopina se zatim prebaci u vijalicu nakon čega se snima na HPLC-QTOF uređaju.

#### **3.3.2.4. Termička razgradnja**

Ispitivanje razgradnje uzoraka pod utjecajem povišene temperature provedeno je na sljedeći način:

Na analitičkoj vagi važe se 1 mg uzorka u malu čašicu. Uzorak se zatim stavlja na 100 °C u sušionik na 24 nakon čega se otopi u prikladnom otapalu u tikvici od 5 mL i nadopuni Mili-Q vodom do oznake. Otopina se zatim prebaci u vijalicu nakon čega se snima na HPLC-QTOF uređaju.

U manju posudicu se prebaci 2 mL standardne otopine uzorka koncentracije 200 mg/L koja se zatim stavlja na vodenu kupelj na 80 °C otprilike 6 sati. Otopina se zatim prebaci u vijalicu nakon čega se snima na HPLC-QTOF uređaju.

#### **3.3.2.5. Fotolitička razgradnja**

Ispitivanje razgradnje uzoraka pod utjecajem svjetla provedeno je na sljedeći način:

U manju posudicu se prebaci 2 mL standardne otopine uzorka koncentracije 200 mg/L koja se zatim stavlja u uređaj Suntest CPS+ kojim se prate promjene svojstava uzrokovane sunčevom svjetlošću. Uzorak se izlaže umjetnom sunčevom zračenju intenziteta 500 Wh/m<sup>2</sup> u trajanju od 15 h. Otopina se zatim prebaci u vijalicu nakon čega se snima na HPLC-QTOF uređaju.

### **3.3.3. Analiza uzoraka spektrometrijom masa visoke razlučivosti**

Nakon ispitivanja stabilnosti uzoraka prisilnom razgradnjom, uzorci su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti povezanim sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (HPLC-QTOF).

#### **3.3.3.1. Ispitivanje spoja LD-4**

Za analizu se koristila Zorbax Eclipse Plus C18 kolona, dimenzija 50 x 2,5 mm i unutarnjeg promjera 1,8 µm. Pokretna faza sastojala se od 0,1%-ne otopine mravlje kiseline u vodi (A) i 0,1%-ne otopine mravlje kiseline u metanolu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u tablici 3.3.

**Tablica 3.3.** Gradijent pokretne faze za analizu uzoraka LD-4 tekućinskom kromatografijom

| Vrijeme / min | Volumen otapala A / % |
|---------------|-----------------------|
| 0             | 90                    |
| 9             | 40                    |
| 11            | 90                    |

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Kolona je termostatirana na 40 °C. U kolonu je injektirano 2 µL uzorka. Protok pokretne faze je tijekom analize iznosio 0,4 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzorka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti, za što je potrebna 1 minuta.

Uvjeti izvora iona spektrometra masa prilikom analize prikazani su u tablici 3.4.

**Tablica 3.4.** Uvjeti izvora iona spektrometra masa

|   |          |
|---|----------|
| <b>Temperatura protočnog plina</b>      | 350 °C   |
| <b>Protok protočnog plina</b>           | 11 L/min |
| <b>Tlak raspršivača plina</b>           | 35 psi   |
| <b>Potencijal kapilare</b>              | 3500 V   |
| <b>Potencijal mlaznice</b>              | 1000 V   |
| <b>Temperatura plina za desolvaciju</b> | 200 °C   |
| <b>Protok plina za desolvaciju</b>      | 14 L/min |

Kao protočni plin i plin za desolvaciju korišten je dušik.

MS spektri su snimani u području 100 – 1000 *m/z*, a MS/MS u području 50 – 370 *m/z*.

### 3.3.3.2. Ispitivanje spoja LD-5

Za analizu se koristila Zorbax Eclipse Plus C18 kolona, dimenzija 50 x 2,5 mm i unutarnjeg promjera 1,8 µm. Pokretna faza sastojala se od 0,1%-ne otopine mravlje kiseline u vodi (A) i 0,1%-ne otopine mravlje kiseline u metanolu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne

faze prikazan je u tablici 3.4.

**Tablica 3.4.** Gradijent pokretne faze za analizu uzoraka LD-5 tekućinskom kromatografijom

| Vrijeme / min | Volumen otapala A / % |
|---------------|-----------------------|
| 0             | 90                    |
| 5             | 60                    |
| 5,3           | 45                    |
| 9             | 40                    |
| 11            | 90                    |

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Kolona je termostatirana na 40 °C. U kolonu je injektirano 2 µL uzorka. Protok pokretne faze je tijekom analize iznosio 0,4 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzorka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti, za što je potrebna 1 minuta.

Uvjeti izvora iona spektrometra masa prilikom analize prikazani su u tablici 3.5.

**Tablica 3.5.** Uvjeti izvora iona spektrometra masa

|   |          |
|---|----------|
| <b>Temperatura protočnog plina</b>      | 350 °C   |
| <b>Protok protočnog plina</b>           | 11 L/min |
| <b>Tlak raspršivača plina</b>           | 35 psi   |
| <b>Potencijal kapilare</b>              | 3500 V   |
| <b>Potencijal mlaznice</b>              | 1000 V   |
| <b>Temperatura plina za desolvaciju</b> | 200 °C   |
| <b>Protok plina za desolvaciju</b>      | 14 L/min |

Kao protočni plin i plin za desolvaciju korišten je dušik.

MS spektri su snimani u području 100 – 1000 *m/z*, a MS/MS u području 50 – 400 *m/z*.



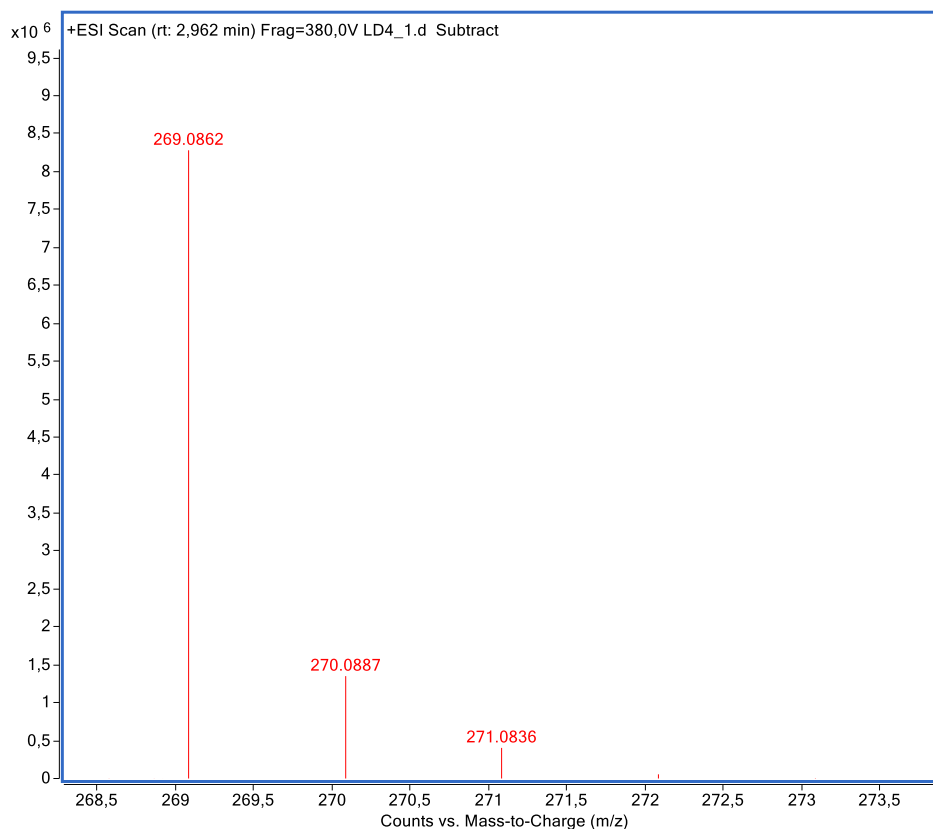
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Identifikacija produkata nastalih prisilnom razgradnjom

Ispitivanja prisilne razgradnje provode se sa svrhom boljeg razumijevanja stabilnosti aktivnog farmaceutskog oblika ili već gotovog lijeka. Ona pružaju uvid u razgradni put ljekovite tvari i pomažu pri karakterizaciji razgradnih produkata koji nastaju pod utjecajem ekstremnih tj. pojačanih uvjeta. Razgradni produkti ranije sintetiziranih spojeva LD-4 i LD-5 nastali prisilnom razgradnjom analizirani su na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti povezanim sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (HPLC-QTOF). U nastavku su dani dobiveni spektri masa na temelju koji su određeni razgradni produkti i pretpostavljen razgradni put navedenih spojeva.

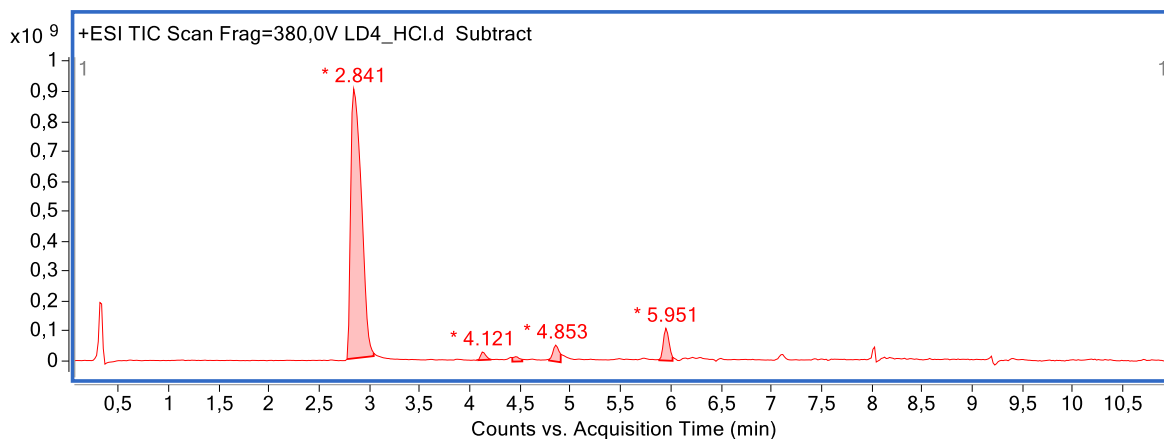
### 4.1.1. Identifikacija razgradnih produkata spoja LD-4

Na slici 4.1. prikazan je spektar masa nerazgrađenog osnovnog spoja LD-4, a iz kromatograma je vidljivo da se glavni pik koji odgovara spoju LD-4 pojavljuje na vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) od 2,962 minute.

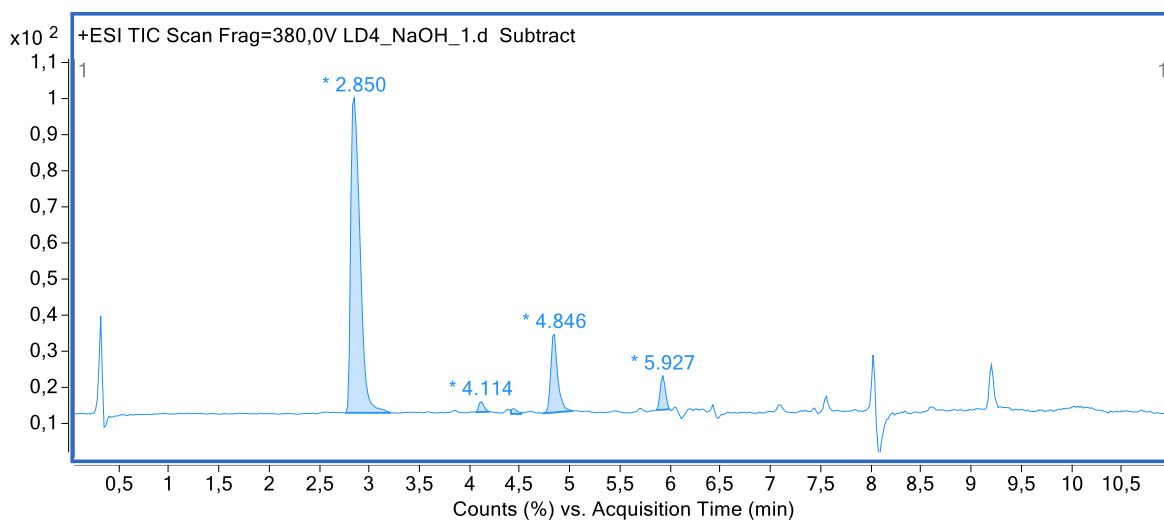


**Slika 4.1.** MS spektar osnovnog LD-4 spoja s vremenom zadržavanja  $t_R=2,962$  min (uvećani spektar)

Nakon snimanja kromatograma osnovnog spoja, snimani su kromatogrami uzoraka LD-4 koji su bili podvrgnuti prisilnoj razgradnji s HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, povišenoj temperaturi te umjetnoj sunčevoj svjetlosti. Ispitivanja prisilne razgradnje pokazala su da je LD-4 podložan razgradnji pod svim navedenim uvjetima (slika 4.2.-4.7).

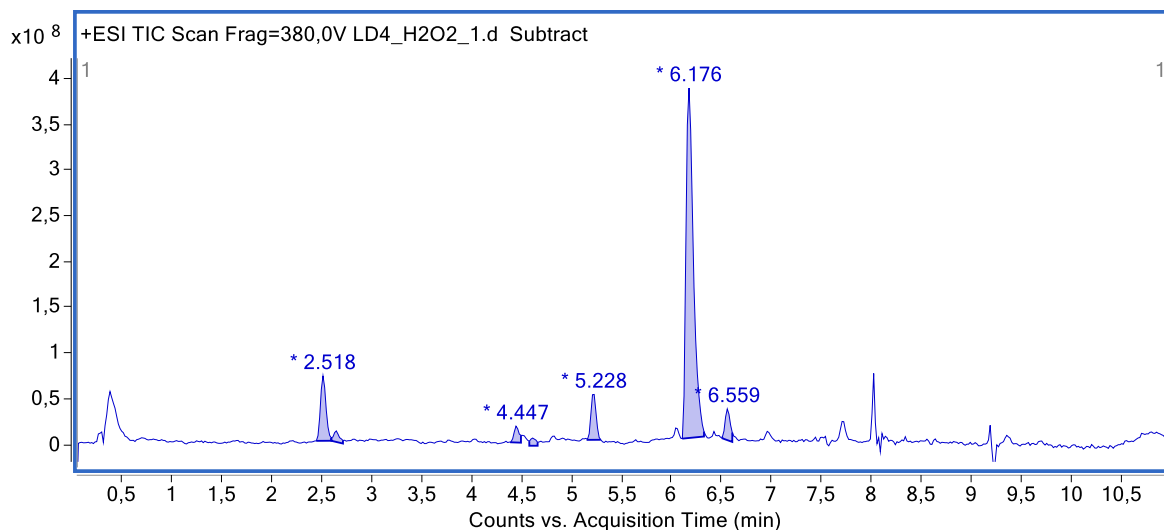


**Slika 4.2.** Kromatogram LD-4 u uvjetima kisele hidrolize (0,5 M HCl)

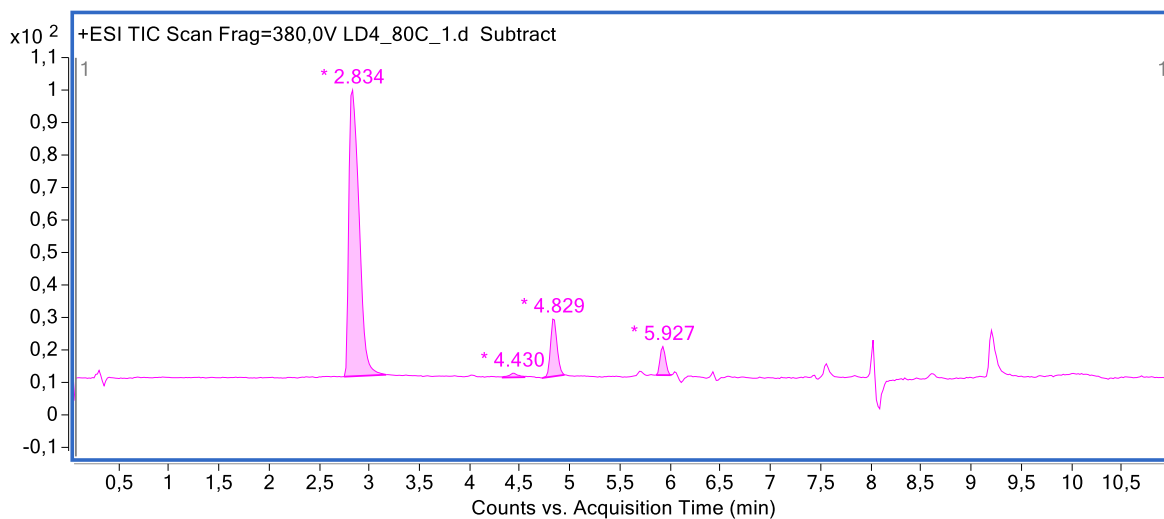


**Slika 4.3.** Kromatogram LD-4 u uvjetima bazne hidrolize (0,5 M NaOH)

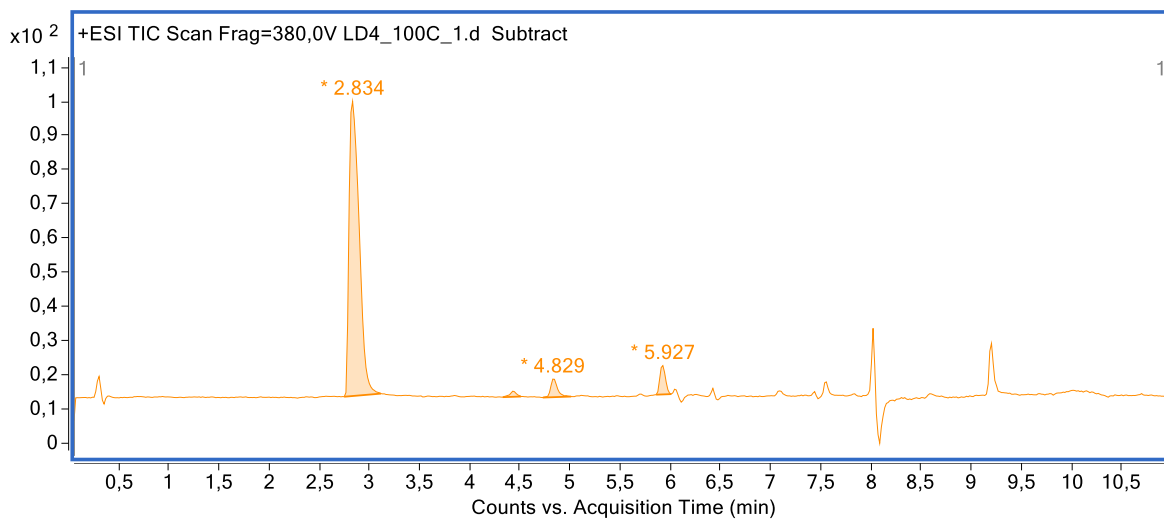
Iz kromatograma prikazanih na slici 4.2. i 4.3. vidljivo je da prisilnom razgradnjom LD-4 spoja u uvjetima kisele i bazne hidrolize nastaju isti razgradni produkti (na jednakim vremenima zadržavanja).



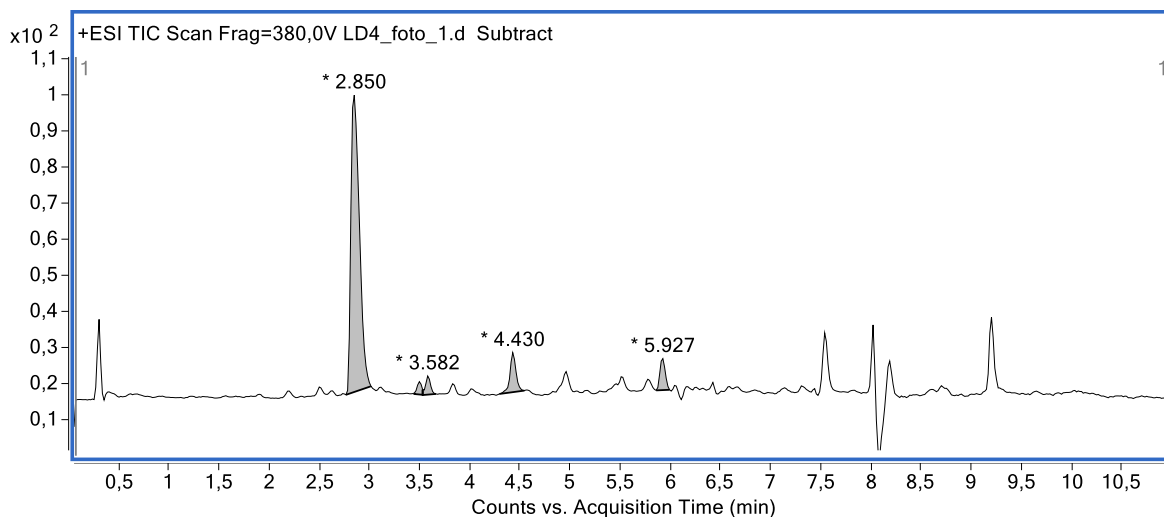
**Slika 4.4.** Kromatogram LD-4 u uvjetima oksidacije peroksidom (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



**Slika 4.5.** Kromatogram LD-4 u uvjetima povišene temperature (T=80°C)



**Slika 4.6.** Kromatogram LD-4 u uvjetima povišene temperature (T=100°C)

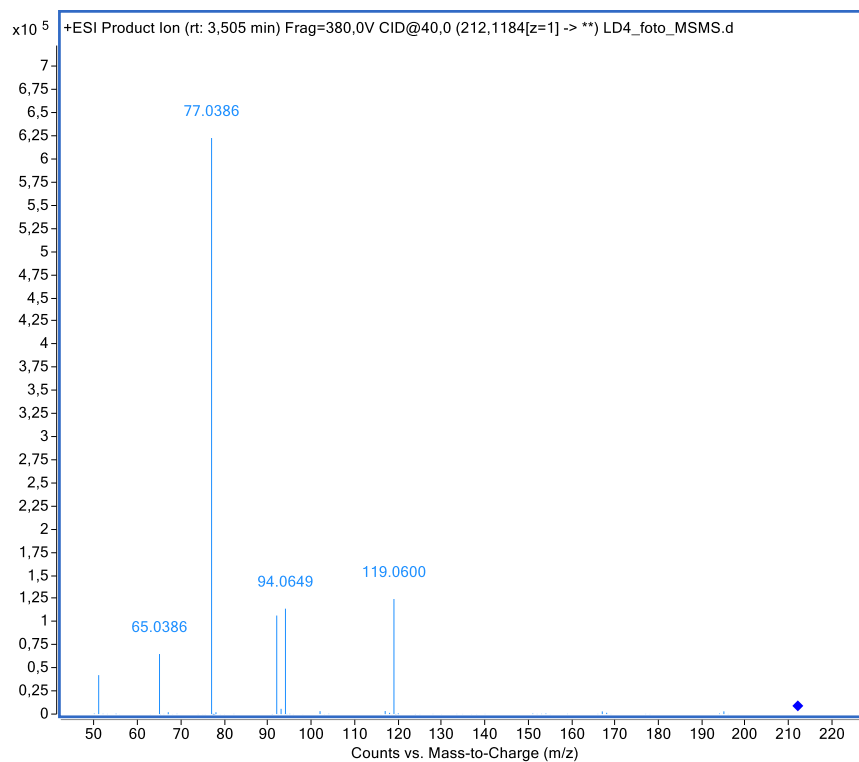


**Slika 4.7.** Kromatogram LD-4 izloženog fotolizi UV/VIS

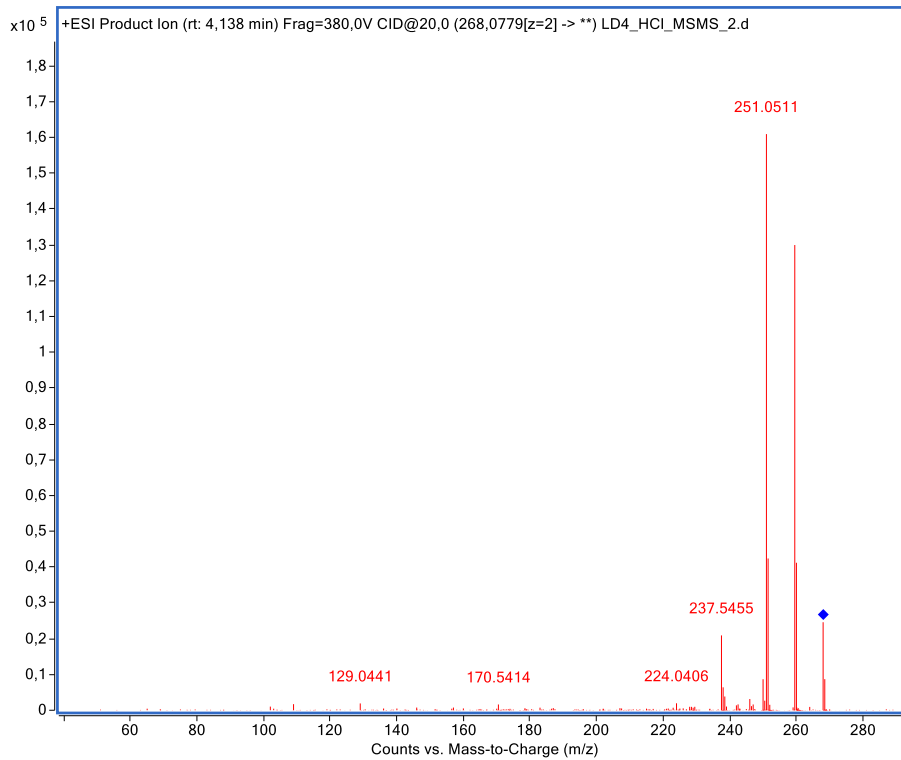
Nakon snimanja svih provedenih eksperimenata, utvrđeno je da se u uvjetima prisilne razgradnje LD-4 spoja pojavljuje 7 razgradnih produkata pri čemu najviše njih (čak 4) nastaje tijekom razgradnje prilikom oksidacije s 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Od spomenutih četiri (*m/z* 297, *m/z* 365, *m/z* 315 i *m/z* 299) nastalih prilikom oksidacije peroksidom, *m/z* 297 pojavljuje se i u uvjetima kisele i bazne hidrolize, toplinske razgradnje kao i pod uvjetima umjetne sunčeve svjetlosti. Prilikom razgradnje pod uvjetima kisele i bazne hidrolize pojavljuju se, uz već spomenuti *m/z* 297, još dva ista razgradna produkta, *m/z* 268 i *m/z* 303. U uvjetima toplinske razgradnje pri 100 °C kao i pri 80 °C pojavljuju se 2 ista razgradna produkta, već spomenuti *m/z* 297 i *m/z* 303, dok se prilikom razgradnje pod utjecajem umjetne sunčeve svjetlosti, uz *m/z* 297 i *m/z* 303, pojavljuje i *m/z* 212.

Za spomenutih sedam razgradnih produkata LD-4 spoja provedena je fragmentacija na osnovu koje je određena struktura produkata i predložen razgradni put spoja.

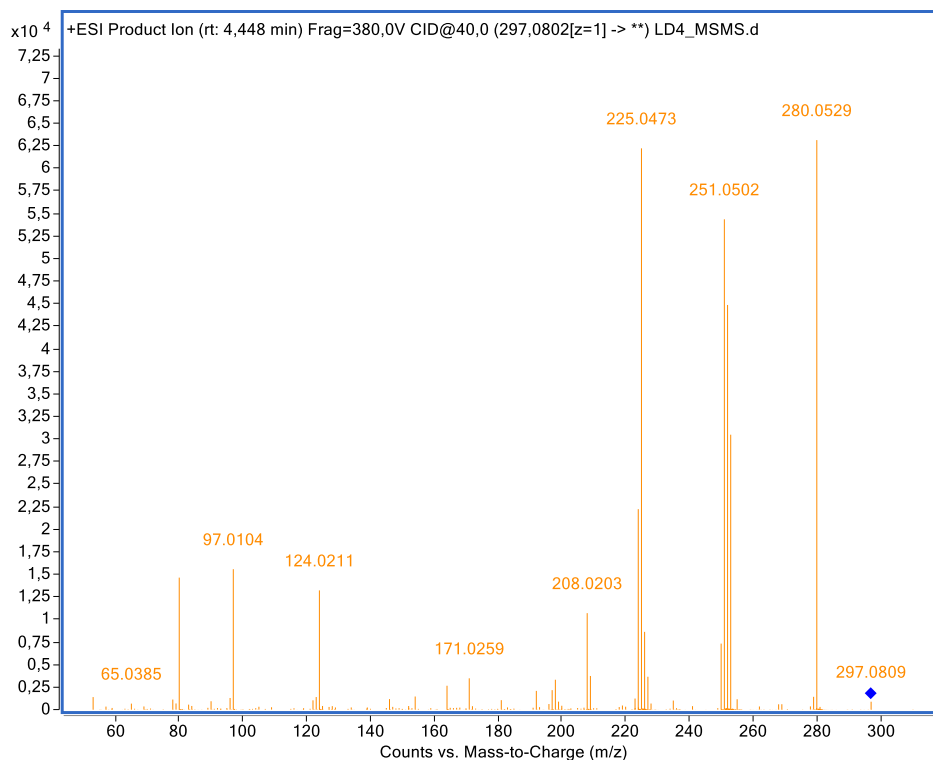
U nastavku su na slikama 4.8-4.14. prikazani spektri masa fragmentiranih razgradnih produkata s pripadajućim vremenima zadržavanja.



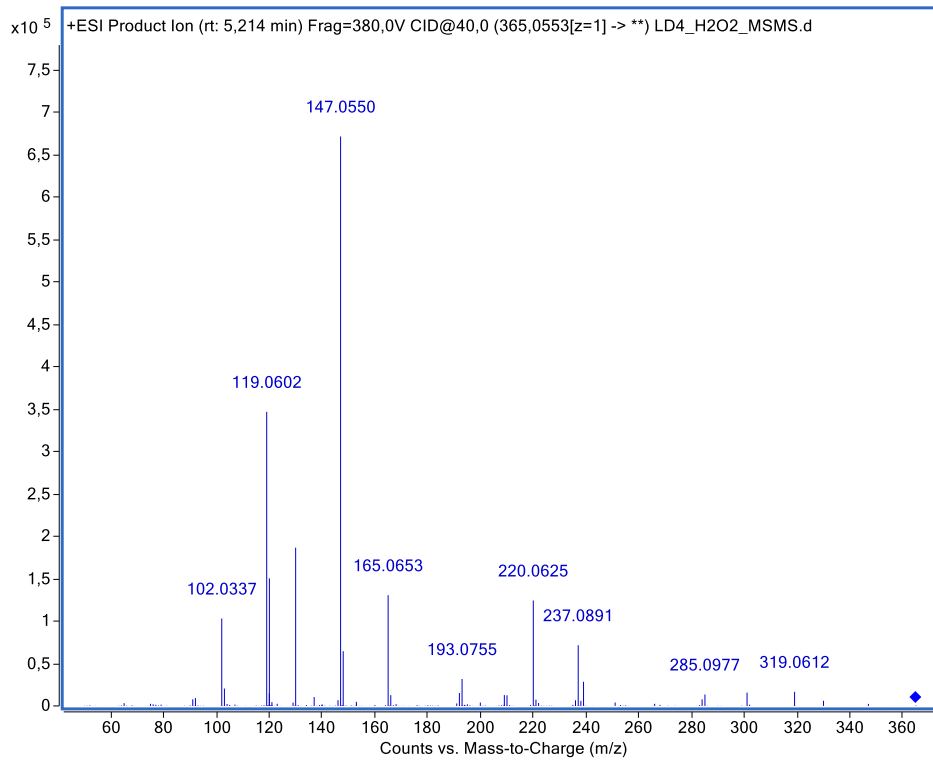
**Slika 4.8.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  212, vremena zadržavanja 3,488 min



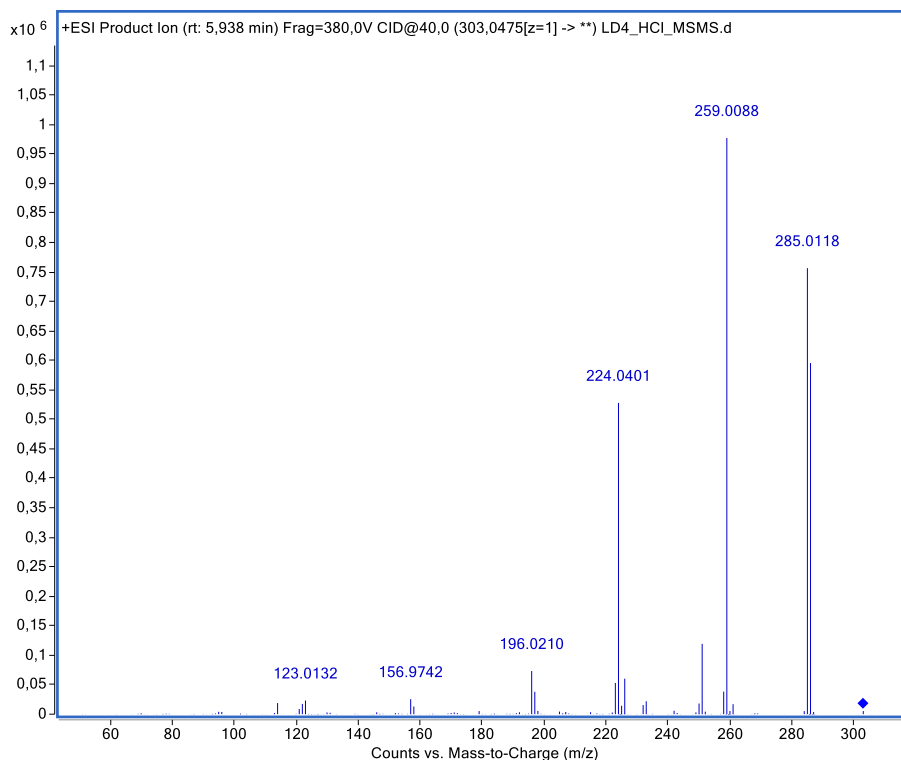
**Slika 4.9.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  268, vremena zadržavanja 4,130 min



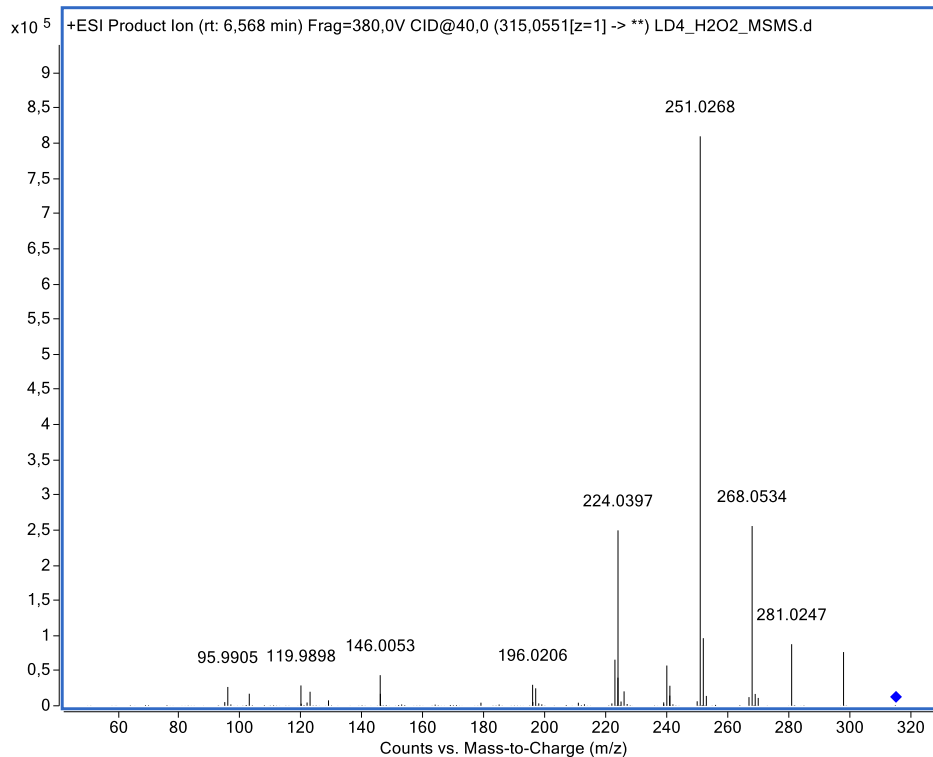
**Slika 4.10.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  297, vremena zadržavanja 4,461 min



**Slika 4.11.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  365, vremena zadržavanja 5,227 min

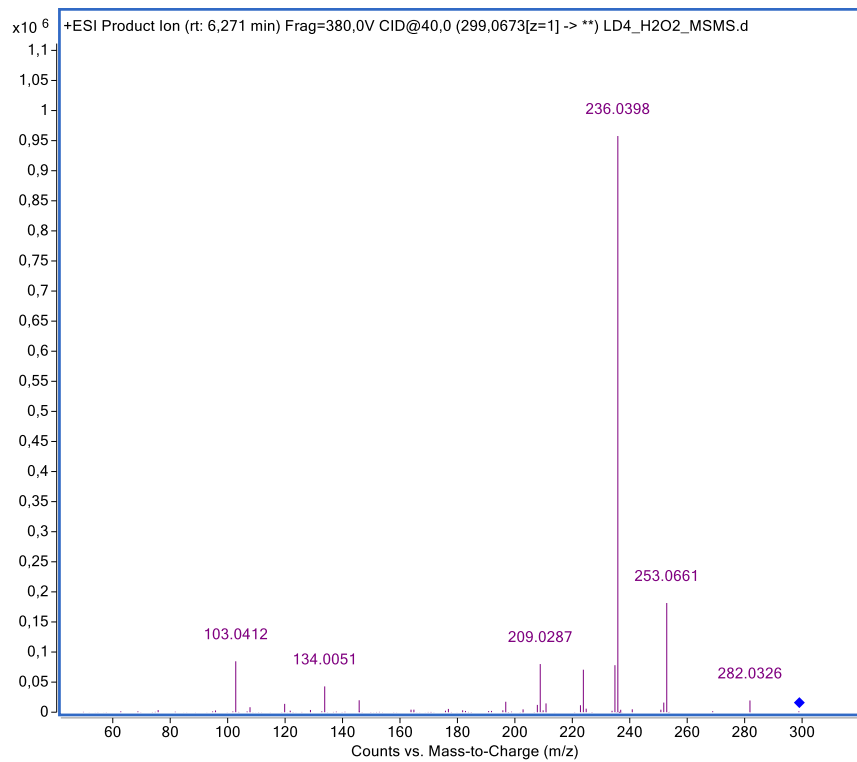


**Slika 4.12.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  303, vremena zadržavanja 5,951 min



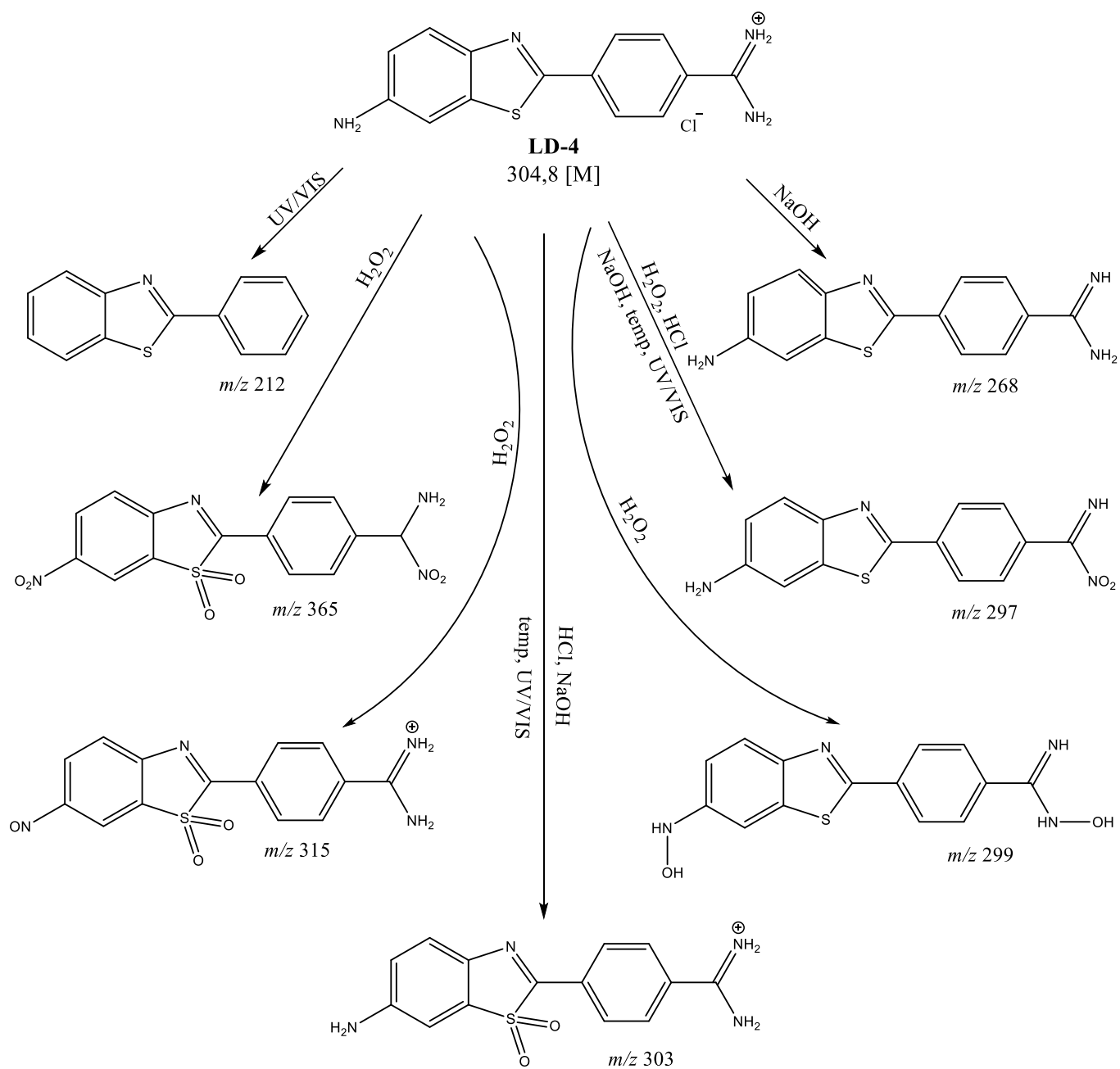
**Slika 4.13.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  315, vremena zadržavanja 6,182 min





**Slika 4.14.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  299, vremena zadržavanja 6,195 min

Na slici 4.15. prikazan je predloženi razgradni put LD-4 spoja.



**Slika 4.15.** Predloženi razgradni put spoja LD-4

**Tablica 4.1.** Udio nastalih razgradnih produkata LD-4 spoja

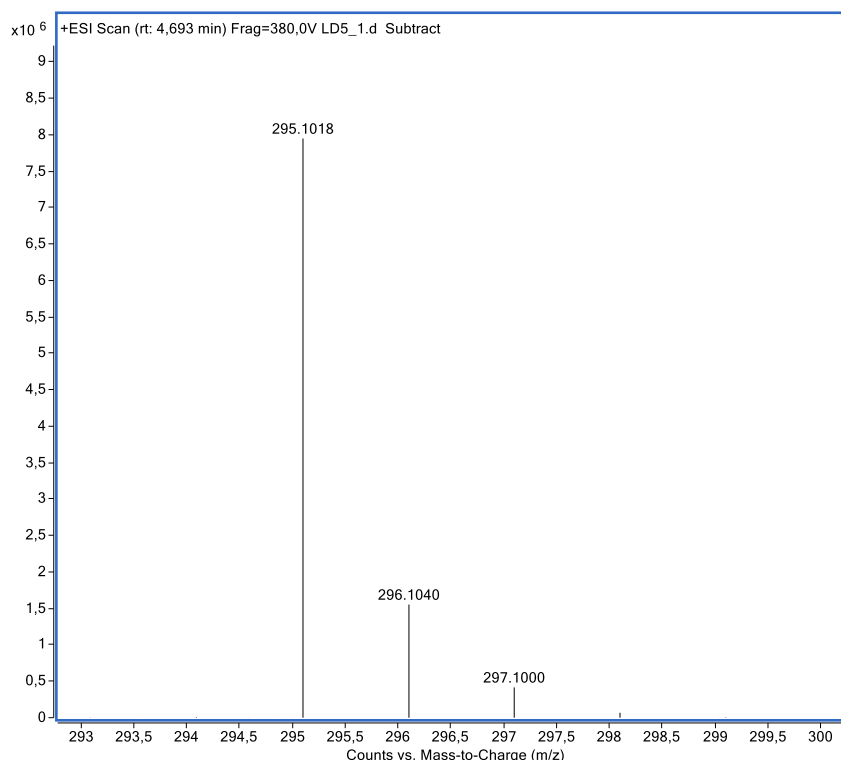
| Razgradni produkti | Udio nastalih razgradnih produkata u pojačanim uvjetima, % |  |                      |                       |                  |                             |                            |
|--------------------|--|--|----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                    | <i>m/z</i>   | Oksidacija, 10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidroliza, 0,5 M HCl | Hidroliza, 0,5 M NaOH | Fotoliza, UV/VIS | Termalna razgradnja, 100 °C | Termalna razgradnja, 80 °C |
| <b>212</b>         | -  | -  | -                    | -                     | 1,83             | -                           | -                          |
| <b>268</b>         | -  | 1,30   | 1,45                 | -                     | -                | -                           | -                          |
| <b>297</b>         | 2,30   | 1,00   | 0,80                 | 7,68                  | 1,12             | 1,10                        |                            |
| <b>365</b>         | 6,69   | -  | -                    | -                     | -                | -                           |                            |
| <b>303</b>         | -  | 5,76   | 4,72                 | 5,48                  | 4,92             | 4,48                        |                            |
| <b>315</b>         | 4,44   | -  | -                    | -                     | -                | -                           |                            |
| <b>299</b>         | 73,43  | -  | -                    | -                     | -                | -                           |                            |

Ispitivanje prisilne razgradnje LD-4 spoja rezultiralo je nastankom 7 razgradnih produkata od kojih je njih najviše nastalo prilikom oksidacije 10 %-tnim peroksidom. Na temelju rezultata prikazanih u tablici 4.1. vidljivo je da se prilikom oksidacije peroksidom 86,86 % LD-4 razgradi na četiri produkta od kojih u najvećem postotku nastaje *m/z* 299. Prisilnom razgradnjom u uvjetima kisele i bazne hidrolize nastala su tri ista razgradna produkta s otprilike jednakim udjelima. Produkti *m/z* 268 i *m/z* 297 nastali su u vrlo malom postotku (<2 %), a *m/z* 303 u nešto većem. Nadalje, produkta *m/z* 297 i *m/z* 303 nastalo je više tijekom kisele hidrolize, dok je *m/z* 268 nastalo više tijekom bazne hidrolize. Prilikom izlaganja spoja LD-4 umjetnoj sunčevoj svjetlosti, nastala su tri razgradna produkta s ukupnim udjelom od 14,99 %. Termalnom razgradnjom kod obje temperature nastaju dva ista razgradna produkta s vrlo sličnim udjelima. Iz svega navedenog, vidljivo je da se eksperiment proveden u uvjetima kisele i bazne hidrolize kao i eksperiment s čvrstom soli (T=100 °C) i otopinom spoja (T=80 °C) ponašaju približno identično.

Na temelju prikazanih rezultata, može se primijetiti da je glavni razgradni produkt LD-4 spoja *m/z* 297 budući da on nastaje u svim provedenim eksperimentima. Nadalje, LD-4 spoj najviše je podložan oksidaciji peroksidom s obzirom da razgradni produkti čine udio od 86,86 %, nakon koje slijedi razgradnja pod utjecajem UV/VIS s udjelom produkata od 14,99 %. LD-4 je podložan i razgradnji u uvjetima kisele i bazne hidrolize i povišene temperature, no u nešto manjoj mjeri s obzirom da je udio produkata u tim eksperimentima manji od 8,1 %.

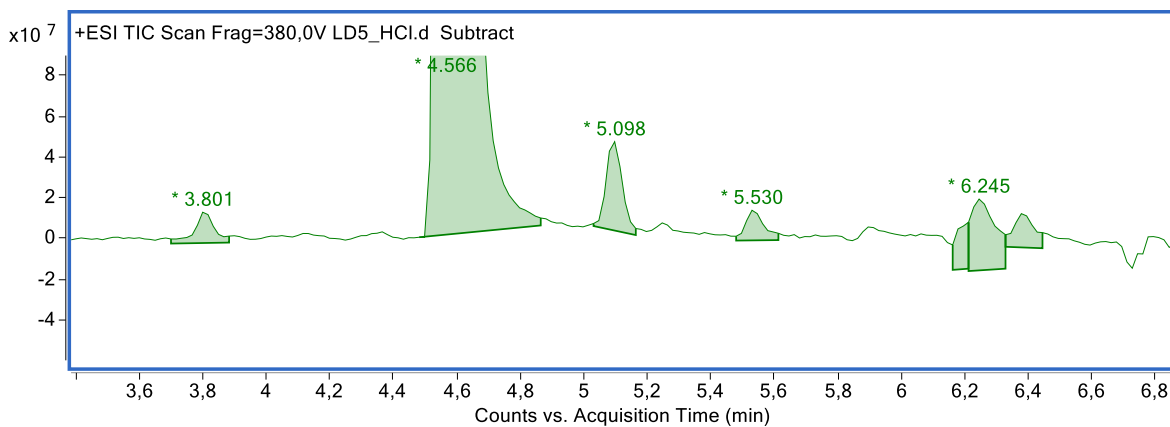
### 4.1.2. Identifikacija razgradnih produkata spoja LD-5

Na slici 4.16. prikazan je spektar masa nerazgrađenog osnovnog spoja LD-5, a iz kromatograma je vidljivo da se glavni pik koji odgovara spoju LD-5 pojavljuje na vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) od 4,693 minute.

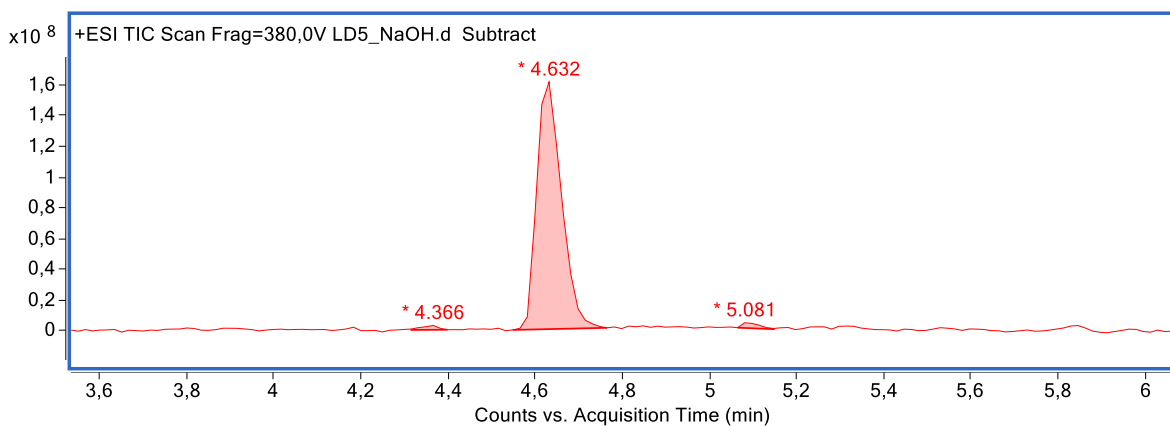


**Slika 4.16.** MS spektar osnovnog LD-5 spoja s vremenom zadržavanja  $t_R=4,693$  min (uvećani spektar)

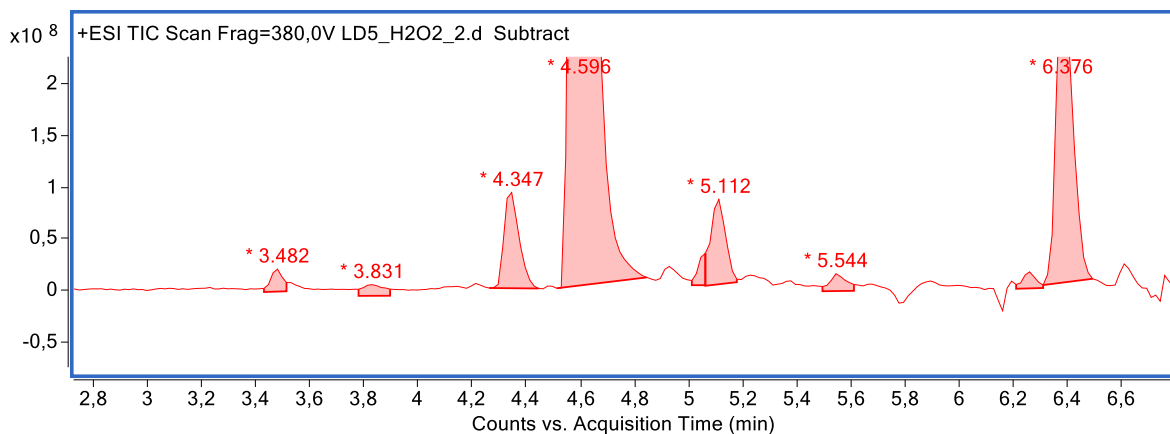
Nakon snimanja kromatograma osnovnog spoja, snimani su kromatogrami uzoraka LD-5 koji su bili podvrgnuti prisilnoj razgradnji s HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, povišenoj temperaturi te umjetnoj sunčevoj svjetlosti. Ispitivanja prisilne razgradnje pokazala su da je LD-5 podložan razgradnji pod svim navedenim uvjetima (slika 4.17.-4.22).



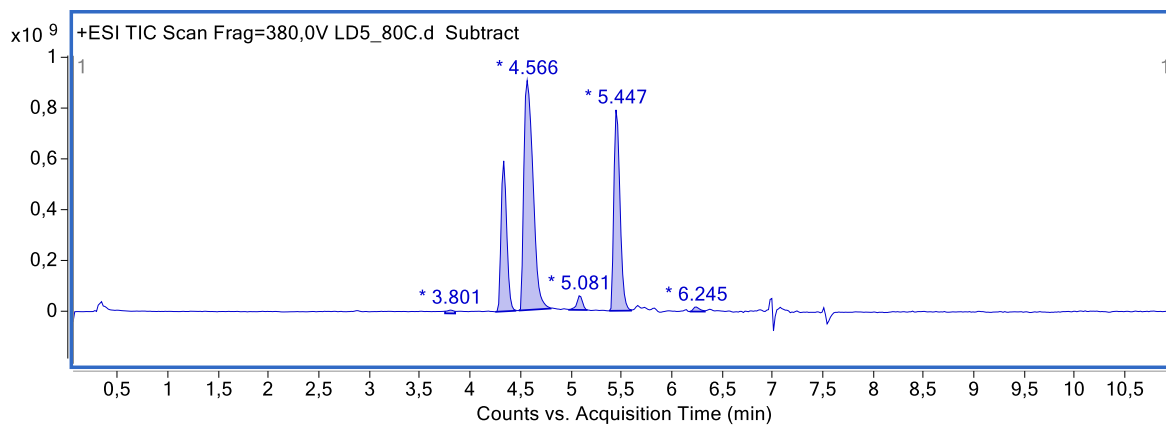
**Slika 4.17.** Kromatogram LD-5 u uvjetima kisele hidrolize (0,5 M HCl) (uvećani kromatogram)



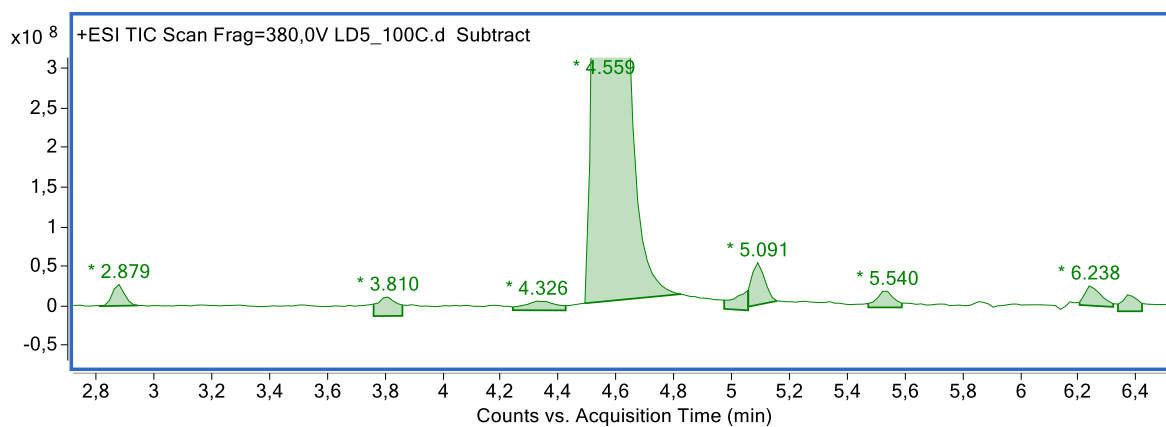
**Slika 4.18.** Kromatogram LD-5 u uvjetima bazne hidrolize (0,5 M NaOH) (uvećani kromatogram)



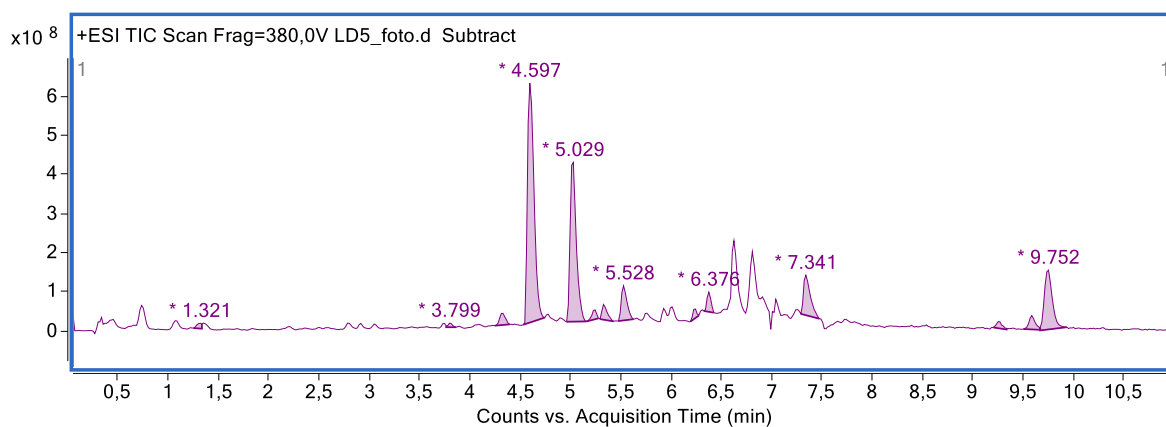
**Slika 4.19.** Kromatogram LD-5 u uvjetima oksidacije peroksidom (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (uvećani kromatogram)



**Slika 4.20.** Kromatogram LD-5 u uvjetima povišene temperature ( $T=80^{\circ}\text{C}$ )



**Slika 4.21.** Kromatogram LD-5 u uvjetima povišene temperature ( $T=100^{\circ}\text{C}$ ) (uvećani kromatogram)

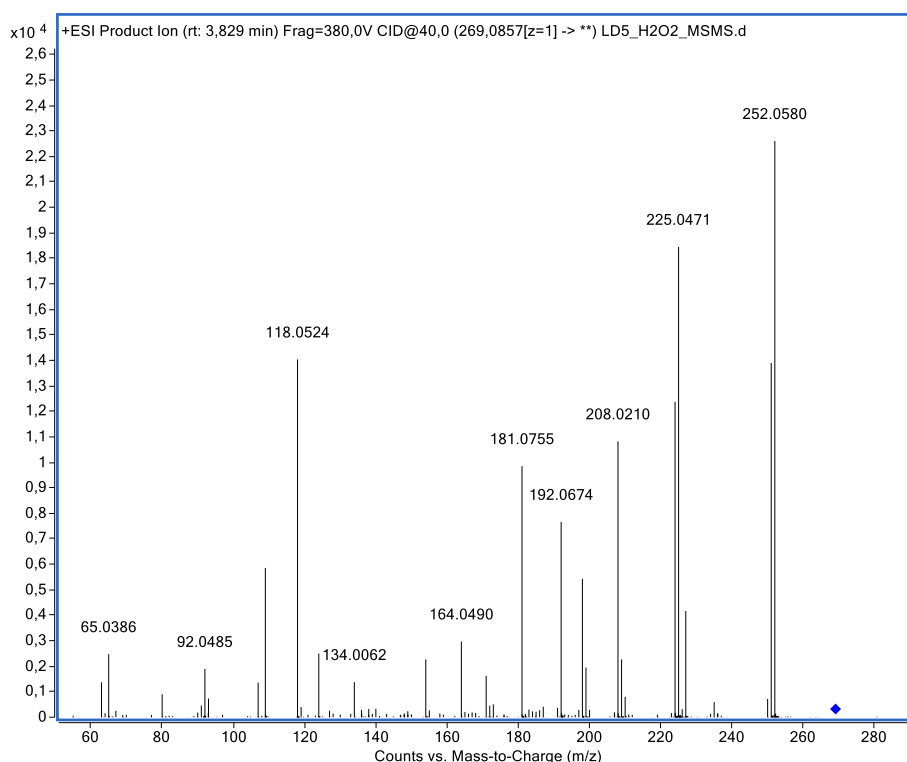


**Slika 4.22.** Kromatogram LD-5 izloženog fotolizi UV/VIS

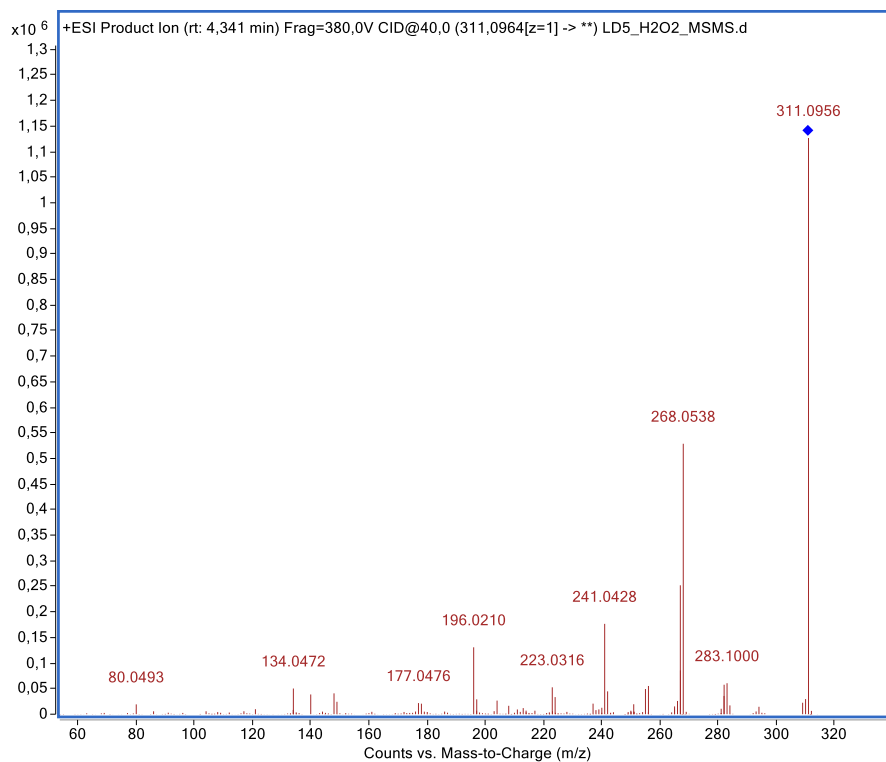
Nakon snimanja svih provedenih eksperimenata, utvrđeno je da se u uvjetima prisilne razgradnje LD-5 spoja pojavljuje 13 razgradnih produkata pri čemu najviše njih (čak 10) nastaje tijekom toplinske razgradnje (zajedno kod obje temperature). Od spomenutih deset razgradnih produkata,  $m/z$  293 pojavljuje se i u svim ostalim eksperimentima,  $m/z$  269 i  $m/z$  325 u uvjetima kisele hidrolize, prilikom oksidacije peroksidom te kod UV/VIS razgradnje, dok se  $m/z$  311 osim kod temperaturne razgradnje pojavljuje i tijekom oksidacije peroksidom i kod UV/VIS razgradnje. Prilikom razgradnje pod utjecajem umjetne sunčeve svjetlosti pojavljuje se ukupno 7 razgradnih produkata, prilikom oksidacije 10 %-tnim peroksidom njih 5, u uvjetima kisele hidrolize 3 razgradna produkta, a u uvjetima bazne hidrolize samo 2.

Za spomenutih trinaest razgradnih produkata LD-5 spoja provedena je fragmentacija na osnovu koje je određena struktura produkata i predložen razgradni put spoja.

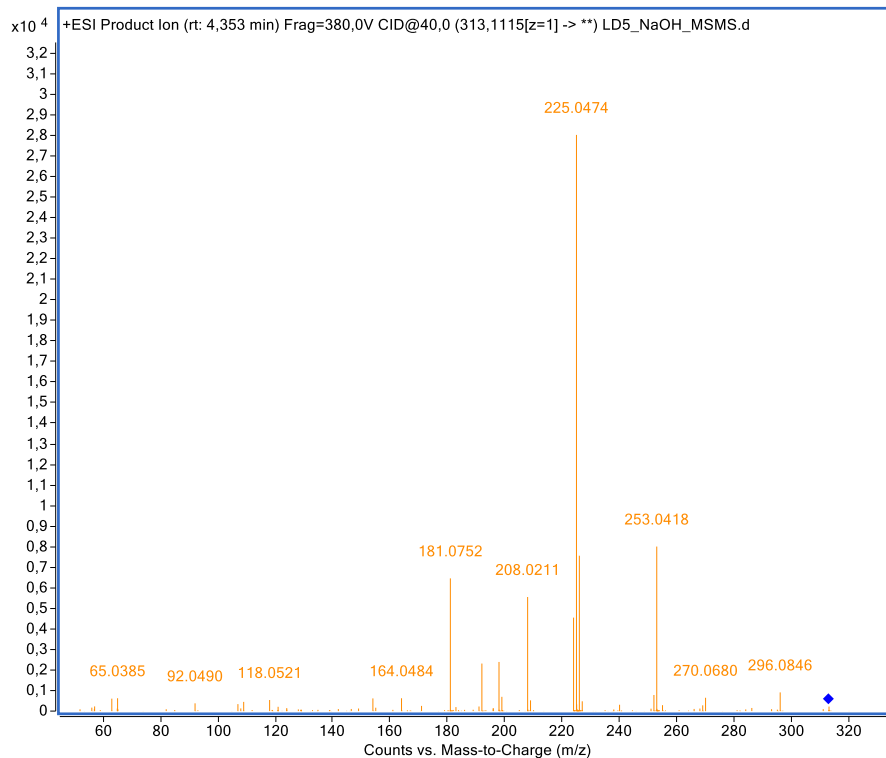
U nastavku su na slikama 4.23.-4.35. prikazani spektri masa fragmentiranih razgradnih produkata s pripadajućim vremenima zadržavanja.



**Slika 4.23.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  269, vremena zadržavanja 3,813 min

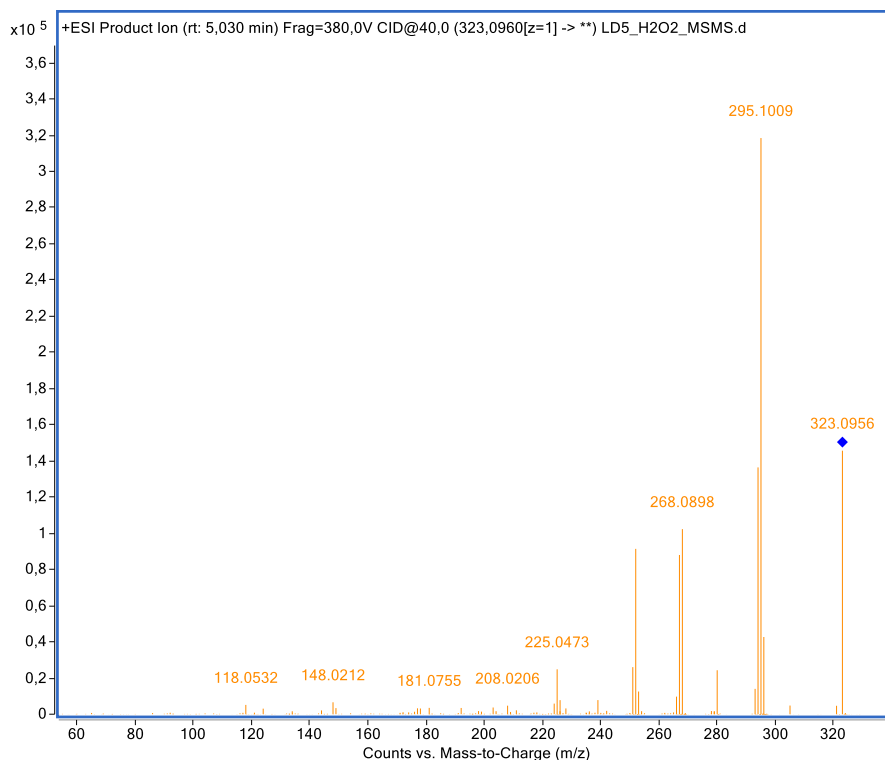


Slika 4.24. MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  311, vremena zadržavanja 4,325 min

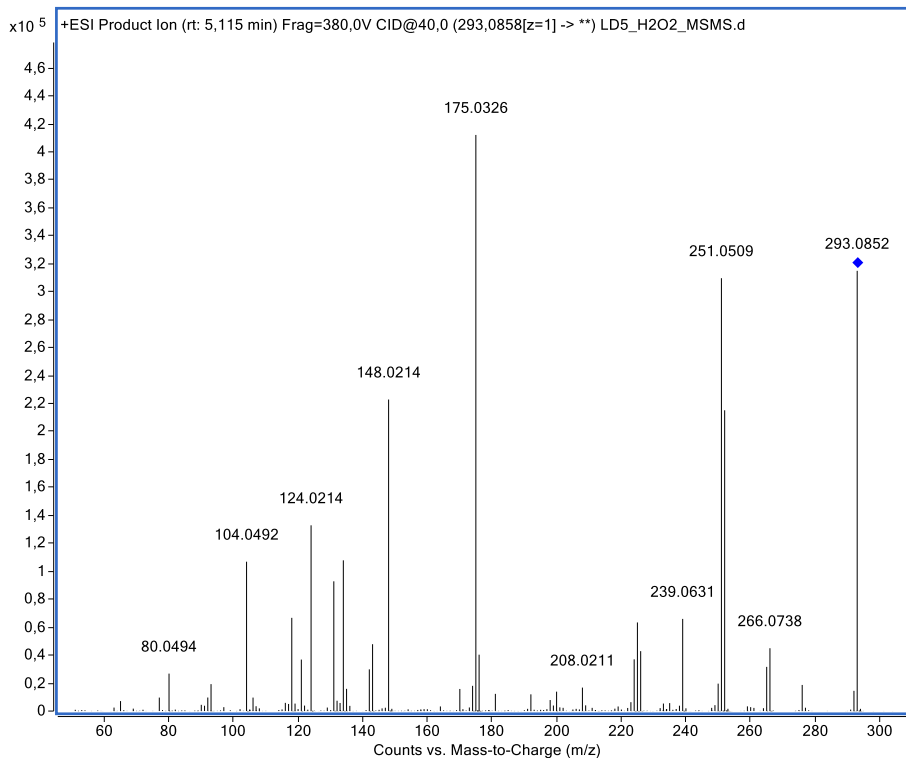


Slika 4.25. MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  313, vremena zadržavanja 4,366 min

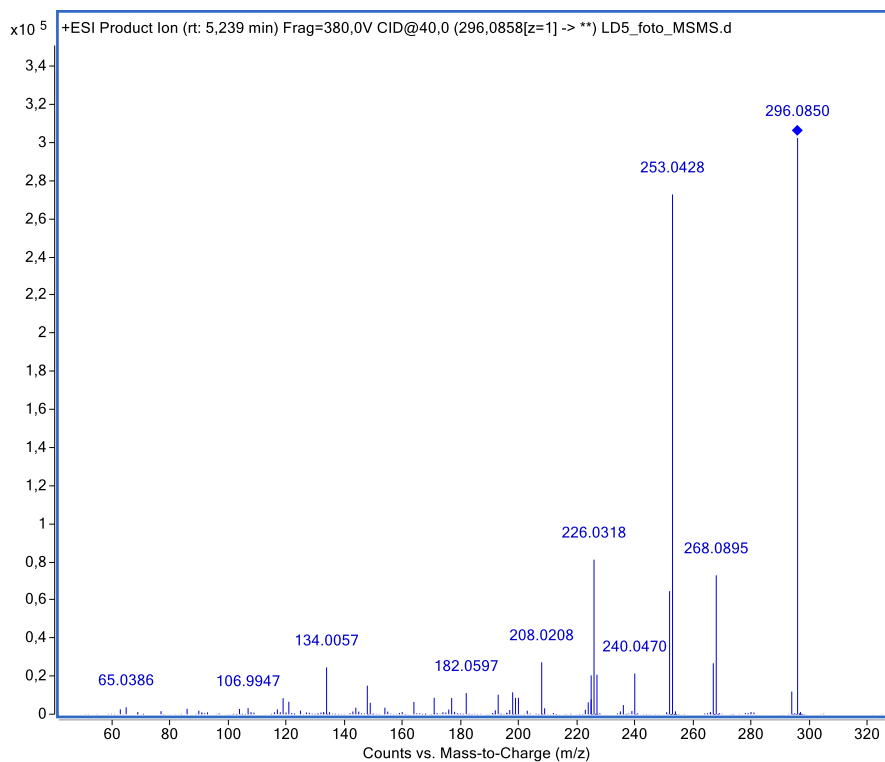




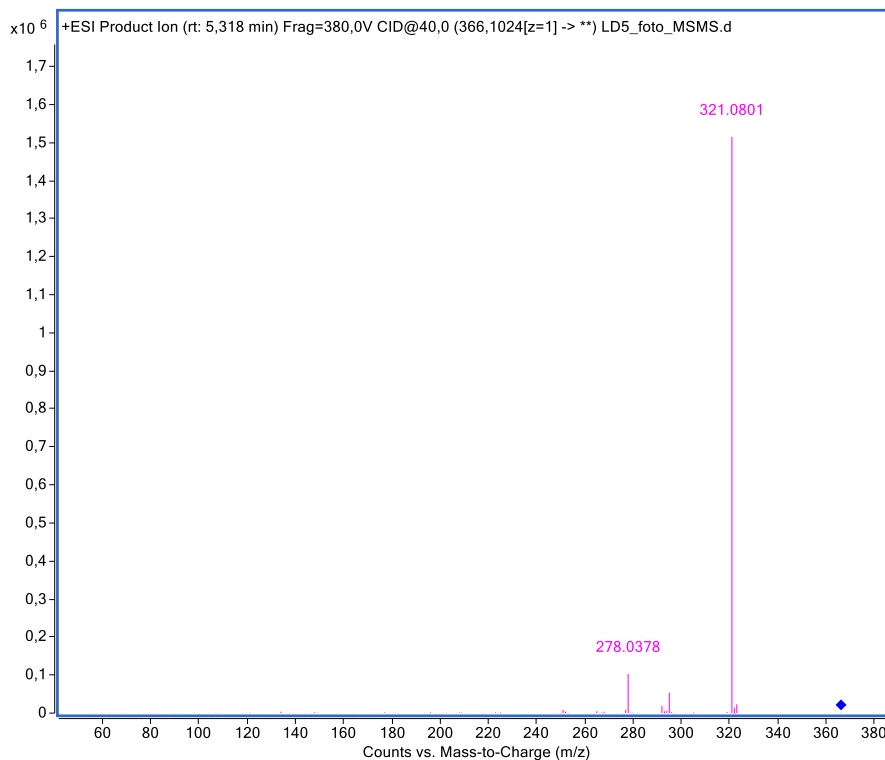
**Slika 4.26.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  323, vremena zadržavanja 5,022 min



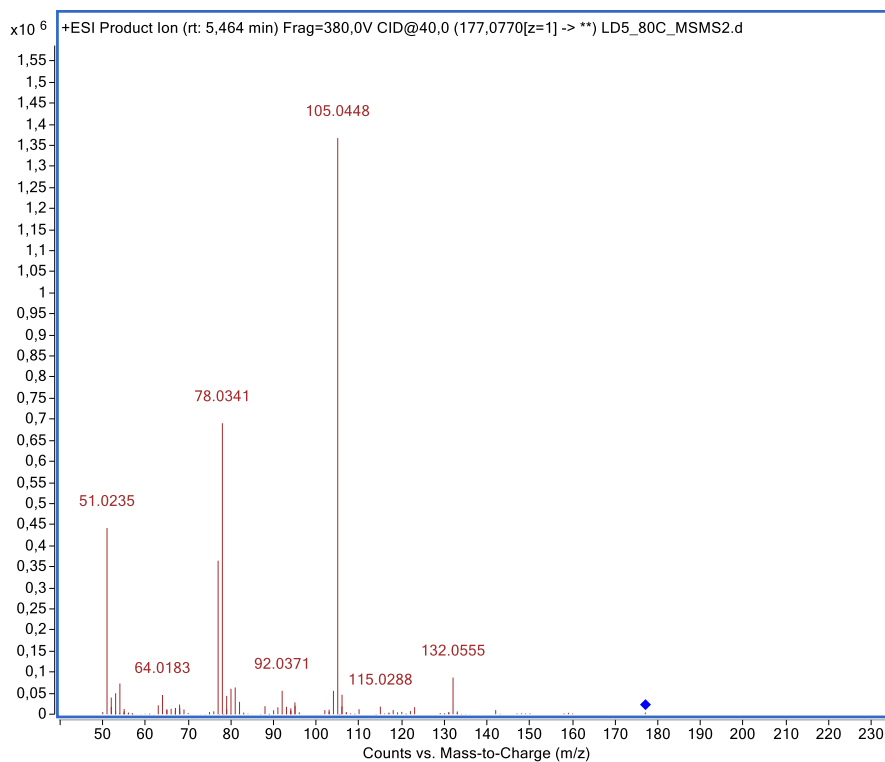
**Slika 4.27.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  293, vremena zadržavanja 5,099 min



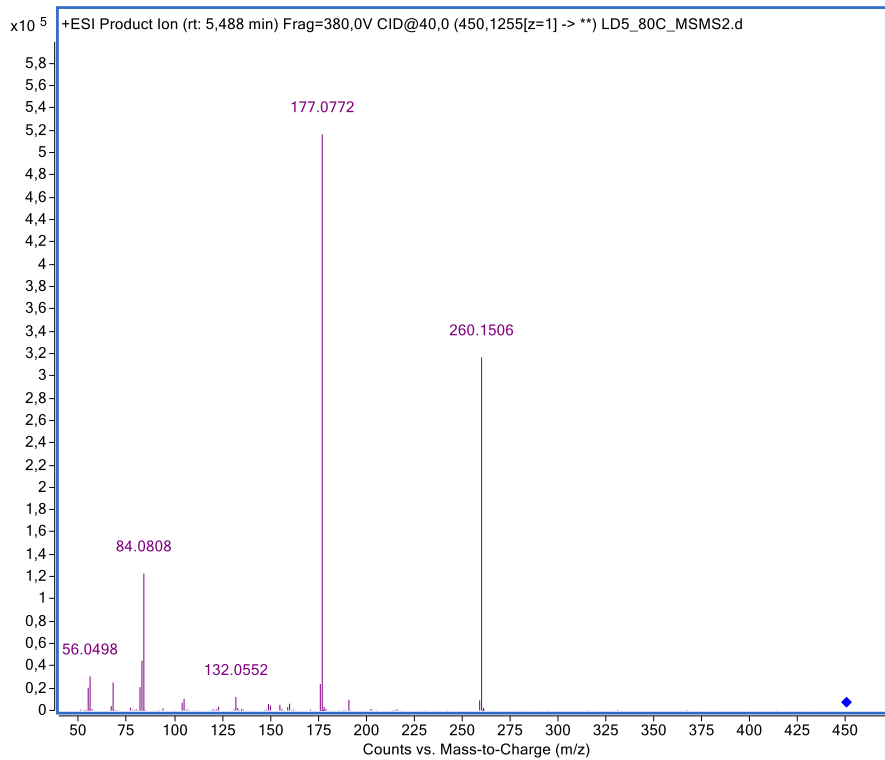
**Slika 4.28.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  296, vremena zadržavanja 5,222 min



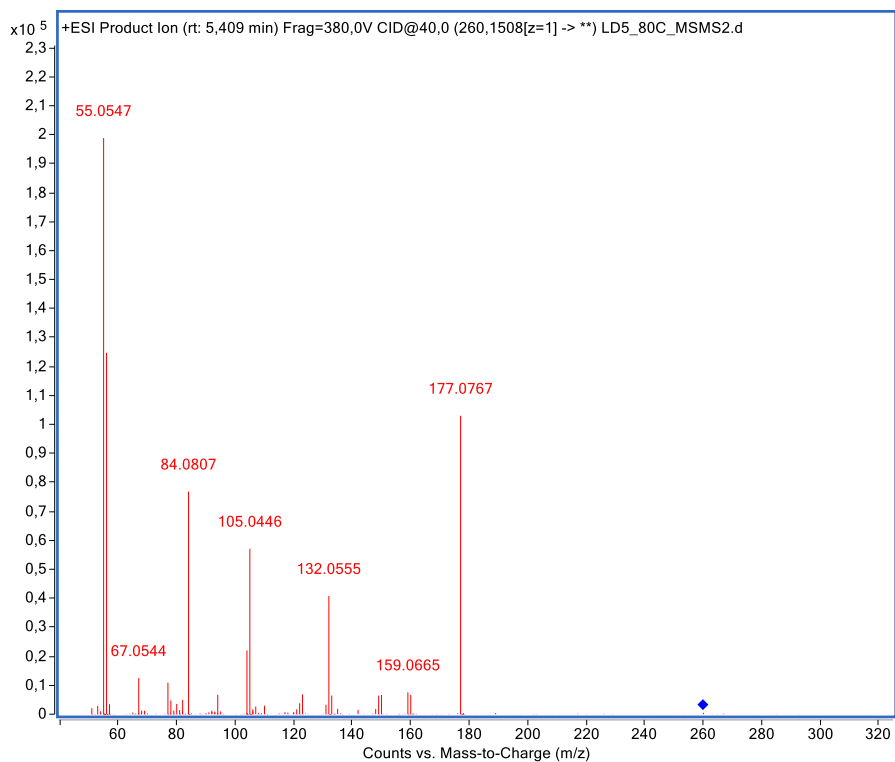
**Slika 4.29.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  366, vremena zadržavanja 5,302 min



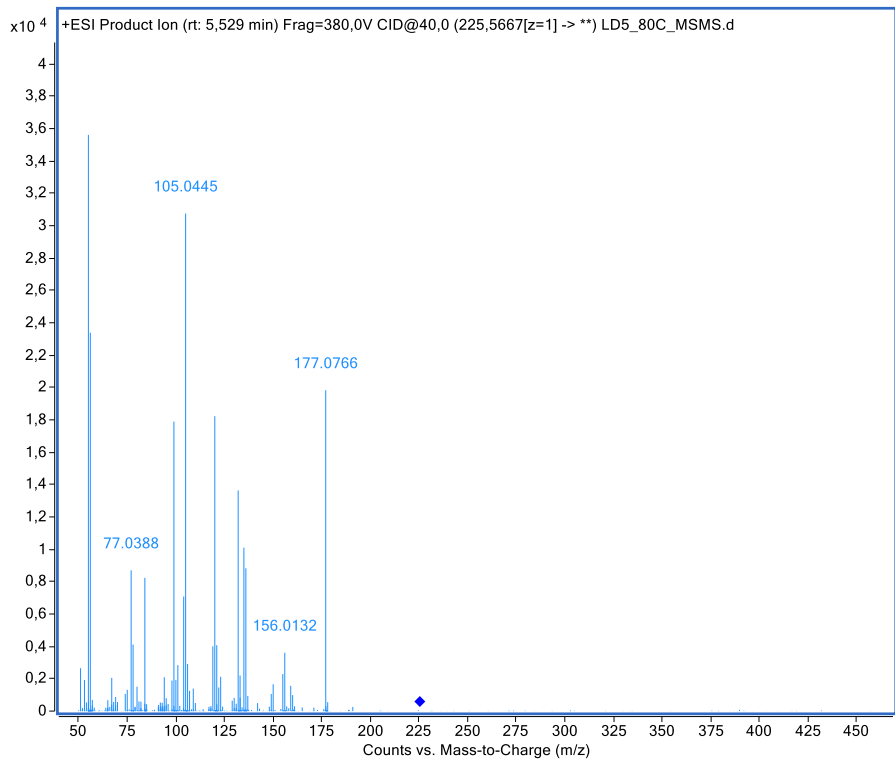
**Slika 4.30.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  177, vremena zadržavanja 5,447 min



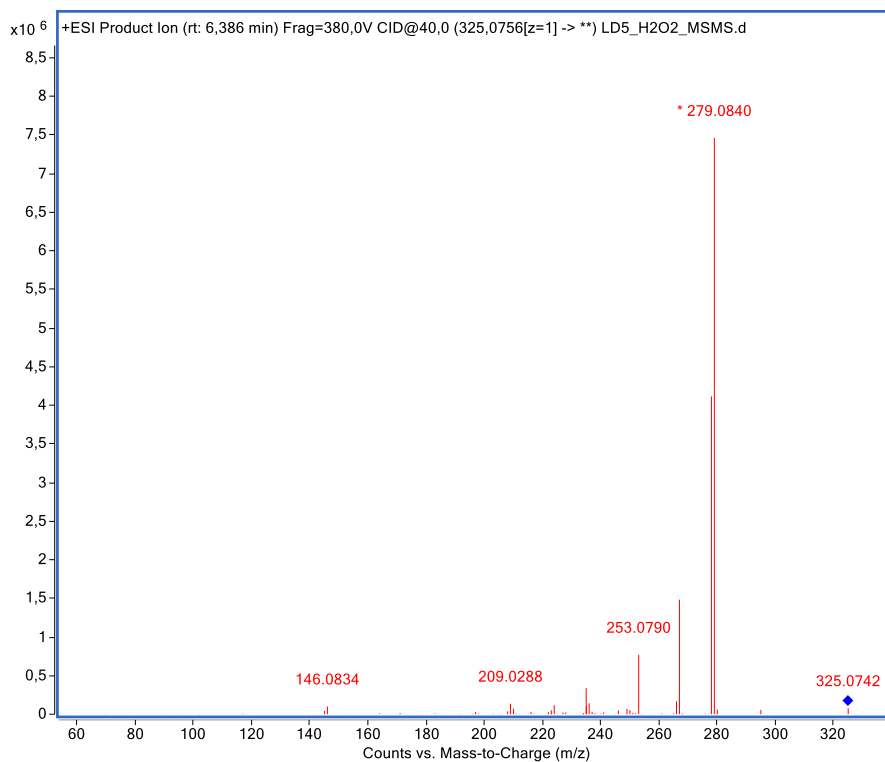
**Slika 4.31.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  450, vremena zadržavanja 5,472 min



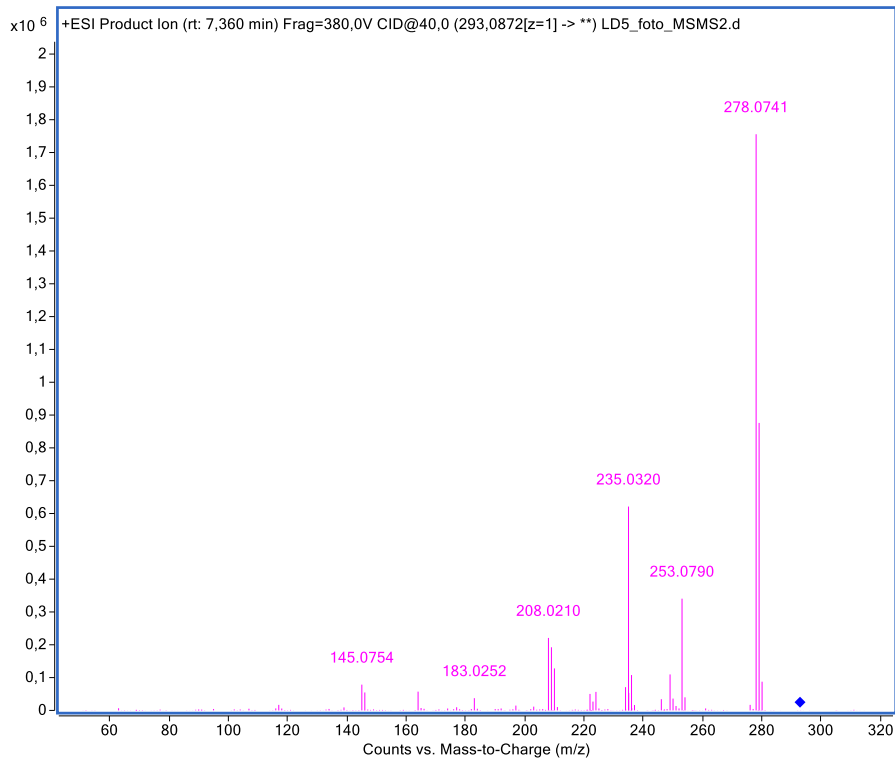
Slika 4.32. MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  260, vremena zadržavanja 5,497 min



Slika 4.33. MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  225, vremena zadržavanja 5,513 min

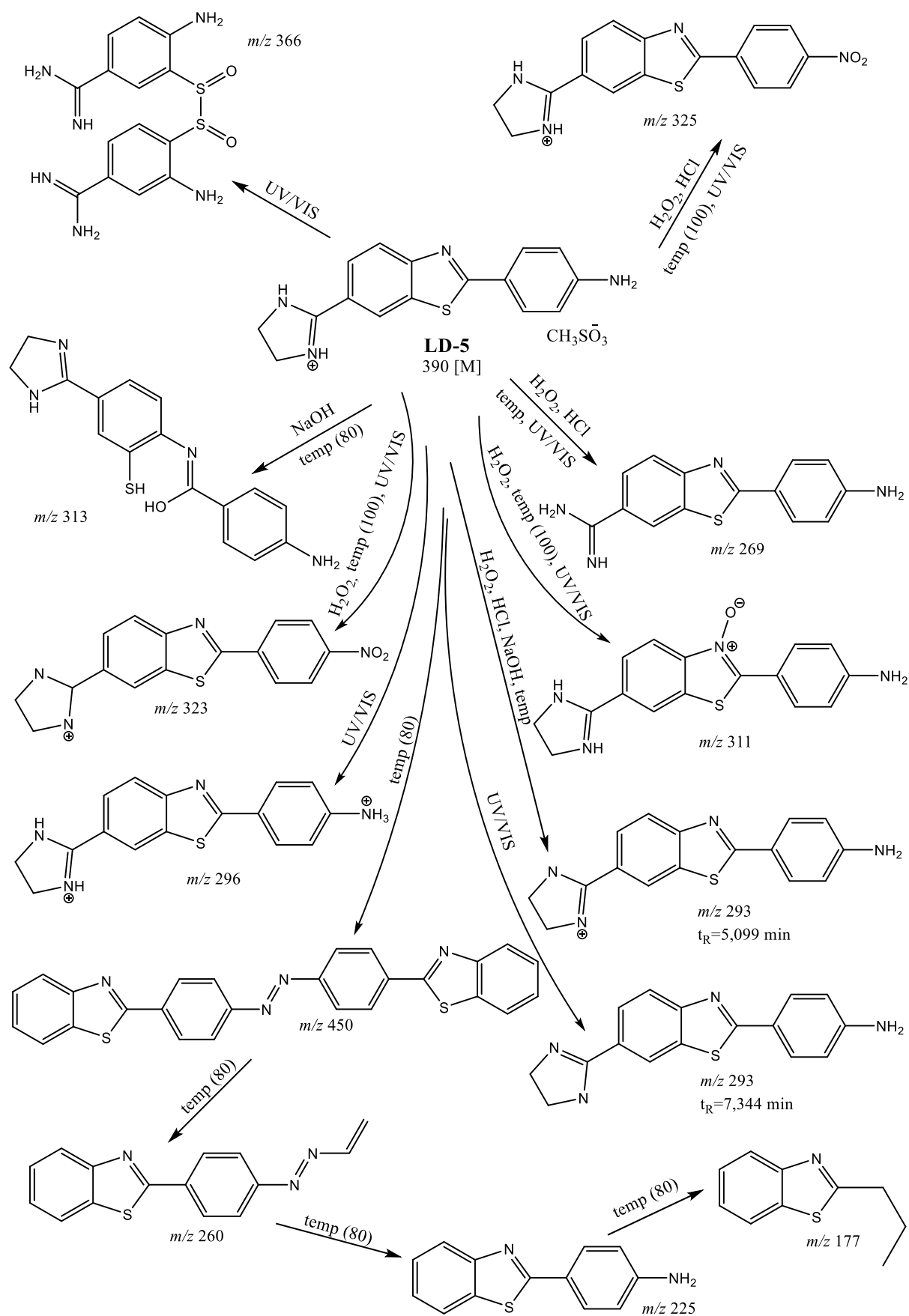


**Slika 4.34.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  325, vremena zadržavanja 6,369 min



**Slika 4.35.** MS/MS spektar fragmenta  $m/z$  293, vremena zadržavanja 7,344 min

Na slici 4.36. prikazan je predloženi razgradni put LD-5 spoja.



Slika 4.36. Predloženi razgradni put spoja LD-5

**Tablica 4.2.** Udio nastalih razgradnih produkata LD-5 spoja

| Razgradni produkti                                   | Udio nastalih razgradnih produkata u pojačanim uvjetima, % |                      |                       |                  |                             |                            |
|--|--|----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------|----------------------------|
|  | Oksidacija, 10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>             | Hidroliza, 0,5 M HCl | Hidroliza, 0,5 M NaOH | Fotoliza, UV/VIS | Termalna razgradnja, 100 °C | Termalna razgradnja, 80 °C |
| <b>m/z</b>   |  |                      |                       |                  |                             |                            |
| <b>269</b>   | 0,79   | 1,07                 | -                     | 0,44             | 1,50                        | 0,54                       |
| <b>311</b>   | 4,73   | -                    | -                     | 1,72             | 1,19                        | -                          |
| <b>313</b>   | -  | -                    | 1,16                  | -                | -                           | 19,69                      |
| <b>323</b>   | 0,73   | -                    | -                     | 24,90            | 1                           | -                          |
| <b>293</b><br><i>t<sub>R</sub></i> =5,099 min        | 4,17   | 2,49                 | 1,48                  | -                | 2,27                        | 1,88                       |
| <b>296</b>   | -  | -                    | -                     | 1,11             | -                           | -                          |
| <b>366</b>   | -  | -                    | -                     | 1,99             | -                           | -                          |
| <b>177</b><br><b>450</b><br><b>260</b><br><b>225</b> | -  | -                    | -                     | -                | -                           | 28,56                      |
| <b>325</b>   | 16,70  | 1,22                 | -                     | 1,99             | 1,03                        | -                          |
| <b>293</b><br><i>t<sub>R</sub></i> =7,344 min        | -  | -                    | -                     | 6,89             | -                           | -                          |

Ispitivanje prisilne razgradnje LD-5 spoja rezultiralo je nastankom 13 razgradnih produkata od kojih je njih najviše (čak 10) nastalo razgradnjom u uvjetima povišene temperature (ukupno pri obje temperature). Na temelju rezultata prikazanih u tablici 4.2. vidljivo je da se prilikom temperaturne razgradnje pri T=80 °C 50,67 % LD-5 razgradi na sedam produkata od kojih u najvećem individualnom postotku nastaje *m/z* 313 (19,69 %), a slijede ga *m/z* 177, *m/z* 450, *m/z* 260 i *m/z* 225 s ukupnim udjelom od 28,56 %. Termalnom razgradnjom pri T=100 °C nastaje ukupno pet razgradnih produkata od kojih dva nastaju i kod 80 °C (*m/z* 269 i *m/z* 293, *t<sub>R</sub>*=5,099 min), a tri su nova (*m/z* 311, *m/z* 323, *m/z* 325). Prisilnom razgradnjom uzrokovanom umjetnim sunčevim zračenjem (UV/VIS) 39,04 % LD-5 razgradi se na sedam produkata od kojih u najvećem postotku *m/z* 323 (24,9 %). Oksidacijom 10 %-tnim peroksidom nastalo je pet razgradnih produkata od kojih su *m/z* 269 i *m/z* 323 nastali u vrlo malom postotku (<1 %), dok su *m/z* 311, *m/z* 293 (*t<sub>R</sub>*=5,099 min) i *m/z* 325 nastali u nešto većem. Prisilnom razgradnjom u uvjetima kisele hidrolize nastala su tri razgradna produkta u vrlo malom udjelu (<1,3 %), uz izuzetak *m/z* 293 (*t<sub>R</sub>*=5,099 min) koji je nastao u udjelu 2,49

% . Baznom hidrolizom nastala su samo dva razgradna produkta,  $m/z$  293 ( $t_R=5,099$  min) i  $m/z$  313 u vrlo malo udjelu što pokazuje da LD-5 spoj u uvjetima bazne hidrolize nije previše podložan razgradnji.

Iz tablice je vidljivo da se  $m/z$  293 s vremenom zadržavanja  $t_R=5,099$  min pojavljuje kao razgradni produkt kisele i bazne hidrolize, oksidacije peroksidom i termalne razgradnje dok se  $m/z$  293 s vremenom zadržavanja  $t_R=7,344$  min pojavljuje kao produkt razgradnje uzrokovane umjetnim sunčevim zračenjem.

Uz spomenuti  $m/z$  293 ( $t_R=5,099$  min), kao razgradni produkt gotovo svih eksperimenata (oksidacije peroksidom, kisele hidrolize, fotolize i termalne razgradnje) pojavljuje se i  $m/z$  269 pa se može reći da su to dva glavna razgradna produkta LD-5 spoja. Valja spomenuti i  $m/z$  325 koji se kao razgradni produkt pojavljuje u četiri provedena eksperimenta (oksidacije peroksidom, kisele hidrolize, fotolize i termalne razgradnje pri  $100^\circ\text{C}$ ).

Zaključno, LD-5 spoj najviše je podložan razgradnji u uvjetima povišene temperature, nakon koje slijedi razgradnja pod utjecajem UV/VIS s udjelom produkata od 39,04 % te oksidacija peroksidom s udjelom od 27,12 %. LD-5 je podložan i razgradnji u uvjetima kisele i bazne hidrolize, no u nešto manjoj mjeri s obzirom da je udio produkata u tim eksperimentima manji od 5 %.

## 4.2. Procjena toksičnosti

Budući da su LD-4 i LD-5, potencijalno farmaceutski aktivni spojevi, potrebno je, uz ispitivanje njihove stabilnosti, procijeniti njihova svojstva koja mogu imati značajan utjecaj ne samo na ljude, već i životinje i okoliš. Tek nakon provedenih ispitivanja stabilnosti i svojstava, novosintetizirani spojevi mogu prijeći u fazu ispitivanja potencijalne implementacije u novim farmaceutskim proizvodima.

Za procjenu toksičnosti nerazgrađenih spojeva LD-4 i LD-5 kao i njihovih razgradnih produkata nastalih kao posljedica ispitivanja prisilne razgradnje korišten je T.E.S.T. računalni program kojim se procijenila vrijednost bioakumulacijskog faktora, razvojne toksičnosti i mutagenosti.

Bioakumulacijski faktor (BAF) definira se kao omjer koncentracije kemikalije u organizmu i koncentracije kemikalije u vodi, a rezultat je apsorpcije kemikalije u organizam iz okoliša s kojim je organizam u doticaju [47]. Vrijednost bioakumulacijskog faktora tako predviđa



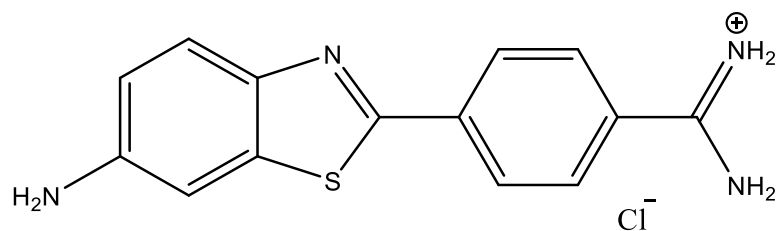
sklonost kemijske supstance ulasku u prehrambeni lanac, odnosno njenoj bioakumulaciji pa je tako <30 niska sklonost, 30-100 umjerena, 100-1000 visoka i >1000 vrlo visoka sklonost bioakumulaciji [48].

Razvojna toksičnost uključuje sve učinke kojima se remeti normalan razvoj nakon začeća, prije ili poslije rođenja, a koji su rezultat izloženosti roditelja prije začeća, izloženosti potomstva tijekom prenatalnog razvoja ili izloženosti potomstva postnatalno sve do spolnog sazrijevanja. Štetni učinci razvojne toksičnosti uključuju smrt organizma u razvoju, poremećaje rasta, strukturne anomalije i funkcionalne poremećaje [49].

Mutacija se definira kao trajna promjena strukture ili količine genetskog materijala stanice, bilo promjenama u DNK (specifične promjene baznih parova ili translokacije kromosoma) bilo genskim promjenama koje se očituju na razini fenotipa. Mutagena, odnosno genotoksična tvar mijenja, dakle, strukturu, informacijski sadržaj ili segregaciju DNK izazivajući tako učestaliju pojavu mutacija u populacijama stanica i/ili organizma [49].

Spojevi čija se toksičnost procijenjivala unijeti su u T.E.S.T. program unošenjem tekstualne datoteke strukture spoja tzv. SMILES formule koja se dobila crtanjem spojeva u programu *ChemDraw Professional*. Za procjenu vrijednosti toksičnosti gotovo svih spojeva koristila se konsenzus metoda koja predstavlja prosjek predviđenih vrijednosti toksičnosti dobivenih pomoću pet različitih QSAR modela (detaljnije u poglavlju 2.5.2.). Konsenzus metoda pruža najtočnije vrijednosti toksičnosti budući da uzima u obzir procjenu nekoliko metoda s vrlo malim razlikama u domeni prihvatljivosti. Nadalje, ako se toksičnost može procijeniti samo jednim QSAR modelom, konsenzus metoda ne daje pouzdane rezultate.

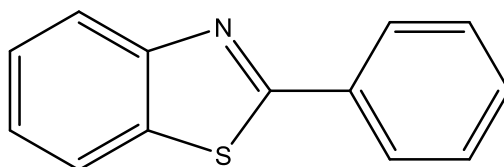
### 4.2.1. Procjena toksičnosti LD-4 i njegovih razgradnih produkata



Slika 4.37. Prikaz molekulske strukture spoja LD-4

Tablica 4.3. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora za osnovni LD-4

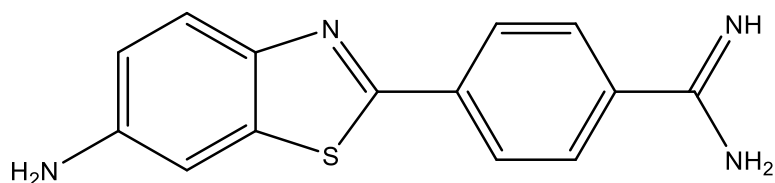
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,78                    | Toksično          |
| Mutagenost              | /                       | /                 |
| Bioakumulacijski faktor | 14,52                   | Niska sklonost    |



Slika 4.38. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  212

Tablica 4.4. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  212

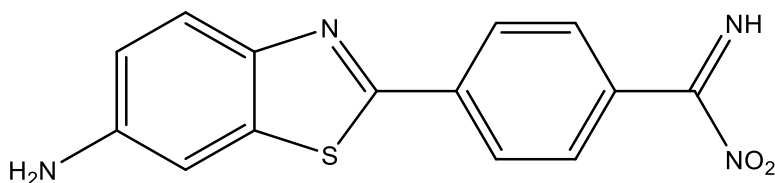
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,23                    | Nije toksično     |
| Mutagenost              | -0,48                   | Nije mutageno     |
| Bioakumulacijski faktor | 103,01                  | Visoka sklonost   |



**Slika 4.39.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 268

**Tablica 4.5.** Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 268

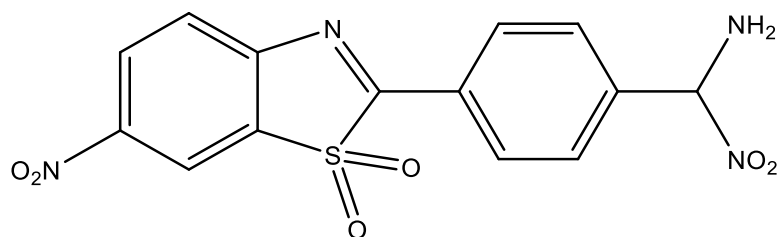
|                                | <b>Procijenjena vrijednost</b> | <b>Rezultat procjene</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,89                           | Toksično                 |
| <b>Mutagenost</b>              | -0,22                          | Nije mutageno            |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 15,39                          | Niska sklonost           |



**Slika 4.40.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 297

**Tablica 4.6.** Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 297

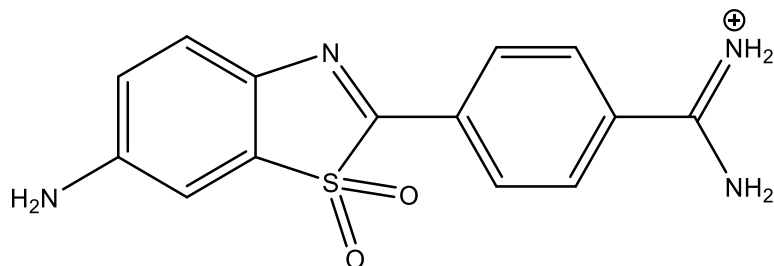
|                                | <b>Procijenjena vrijednost</b> | <b>Rezultat procjene</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,88                           | Toksično                 |
| <b>Mutagenost</b>              | -0,23                          | Nije mutageno            |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 23,48                          | Niska sklonost           |



**Slika 4.41.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 365

**Tablica 4.7.** Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 365

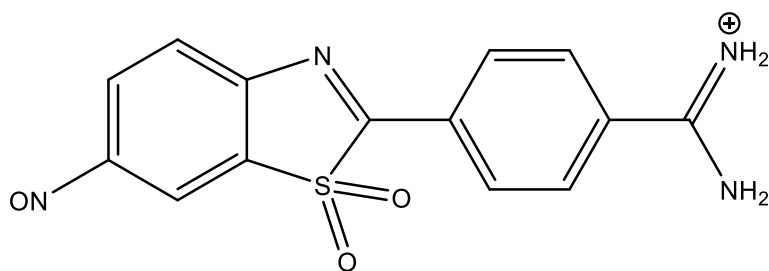
|                                | <b>Procijenjena vrijednost</b> | <b>Rezultat procjene</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,97                           | Toksično                 |
| <b>Mutagenost</b>              | 0,59                           | Mutageno                 |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 3,72                           | Niska sklonost           |



**Slika 4.41.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 303

**Tablica 4.8.** Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 303

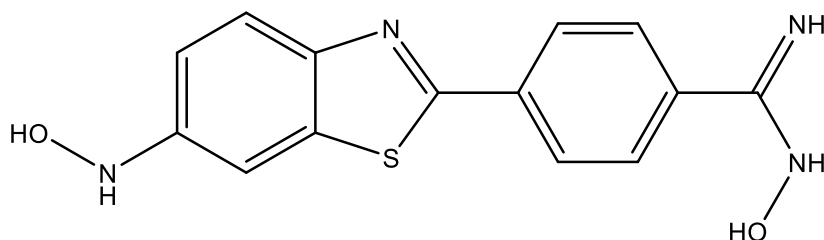
|                                | <b>Procijenjena vrijednost</b> | <b>Rezultat procjene</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 1,00                           | Toksično                 |
| <b>Mutagenost</b>              | /                              | /                        |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 1,95                           | Niska sklonost           |



Slika 4.42. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 315

Tablica 4.9. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 315

|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 1,10                    | Toksično          |
| Mutagenost              | /                       | /                 |
| Bioakumulacijski faktor | 3,36                    | Niska sklonost    |



Slika 4.43. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 299

Tablica 4.10. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 299

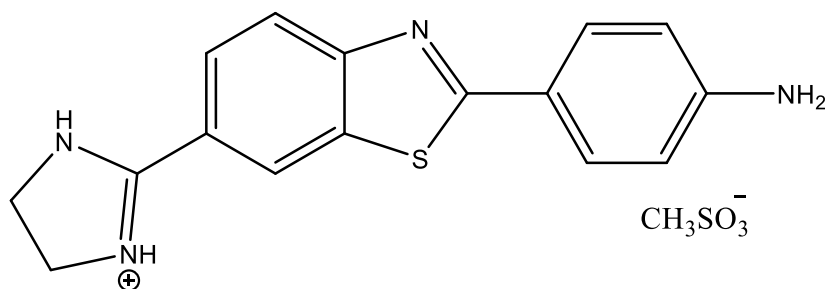
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,68                    | Toksično          |
| Mutagenost              | -0,39                   | Nije mutageno     |
| Bioakumulacijski faktor | 12,76                   | Niska sklonost    |

Na temelju procijenjenih rezultata toksičnosti pomoću T.E.S.T. programa, LD-4 spoj i svi njegovi razgradni produkti osim  $m/z$  212 smatraju se razvojno toksičnima s obzirom da su vrijednosti dobivenih bezdimenzijskih značajki razvojne toksičnosti veće od 0,5. Najveća vrijednost toksičnosti dobivena je za razgradni produkt  $m/z$  315 (1,10), dok je najmanja vrijednost dobivena za  $m/z$  299 (0,69) koji je ujedno i jedini razgradni produkt koji je pokazao manju toksičnost od osnovnog spoja, dok su svi ostali, izuzev  $m/z$  212 koji je netoksičan, pokazali veću vrijednost. Razvojna toksičnost osnovnog LD-4 spoja iznosi 0,78. Razgradni produkt  $m/z$  212 smatra se netoksičnim jer je njegova vrijednost bezdimenzijske značajke manja od 0,5, točnije ona iznosi 0,23.

Mutagenost osnovnog spoja i razgradnih produkata  $m/z$  303 i  $m/z$  315 nije se mogla odrediti nijednim QSAR modelom jer u bazi podataka nema dovoljno sličnih molekula za usporedbu. Potencijalnu mutagenost pokazao je samo  $m/z$  365, dok se  $m/z$  212,  $m/z$  268,  $m/z$  297 i  $m/z$  299 smatraju nemutagenim s negativnim vrijednostima bezdimenzijske značajke mutagenosti. Na temelju dobivenih vrijednosti bioakumulacijskih faktora, može se zaključiti da osnovni LD-4 spoj i svi njegovi razgradni produkti, izuzev  $m/z$  212, imaju nisku sklonost bioakumulaciji, odnosno ulasku u prehrambeni lanac živih organizama, s vrijednostima bioakumulacijskog faktora manjim od 30. Jedino je za  $m/z$  212 dobivena visoka vrijednost od 103,01 što ukazuje na visoku sklonost bioakumulaciji.

Zaključno,  $m/z$  212 jedini je razgradni produkt LD-4 spoja koji pokazuje svojstvo razvojne netoksičnosti i nemutagenosti, a s druge strane visoku sklonost bioakumulaciji. Produkt koji se pojavljuje u svim eksperimentima, ujedno i glavni razgradni produkt,  $m/z$  297 pokazuje veće vrijednosti toksičnosti i bioakumulacijskog faktora u odnosu na osnovni spoj pa se može reći da razgradnjom LD-4 nastaje razvojno toksičniji spoj s većom sklonosti bioakumulaciji, opasniji po žive organizme i okoliš.

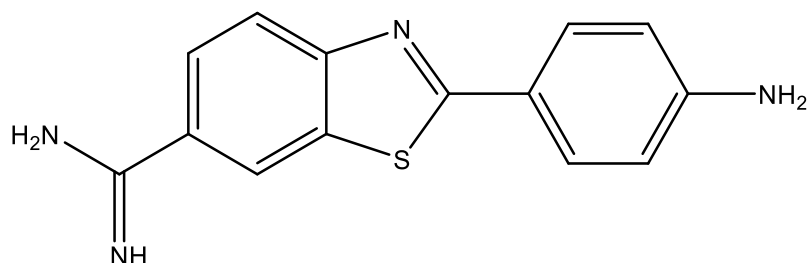
#### 4.2.2. Procjena toksičnosti LD-5 i njegovih razgradnih produkata



Slika 4.44. Prikaz molekulske strukture spoja LD-5

Tablica 4.11. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora za osnovni LD-5

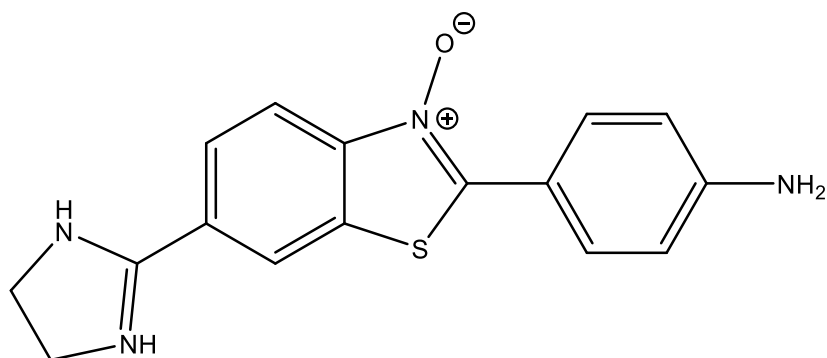
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,62                    | Toksično          |
| Mutagenost              | 0,71                    | Mutageno          |
| Bioakumulacijski faktor | 7,30                    | Niska sklonost    |



Slika 4.45. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 269

Tablica 4.12. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 269

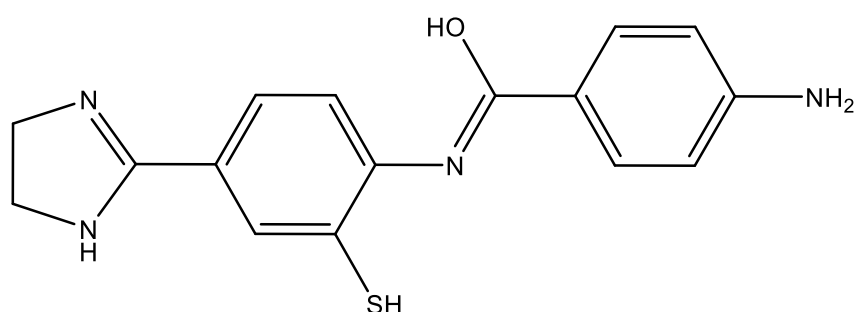
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,79                    | Toksično          |
| Mutagenost              | -0,16                   | Nije mutageno     |
| Bioakumulacijski faktor | 13,34                   | Niska sklonost    |



Slika 4.46. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  311

Tablica 4.13. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  311

|                                | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,64                    | Toksično          |
| <b>Mutagenost</b>              | 0,83                    | Mutageno          |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 13,76                   | Niska sklonost    |

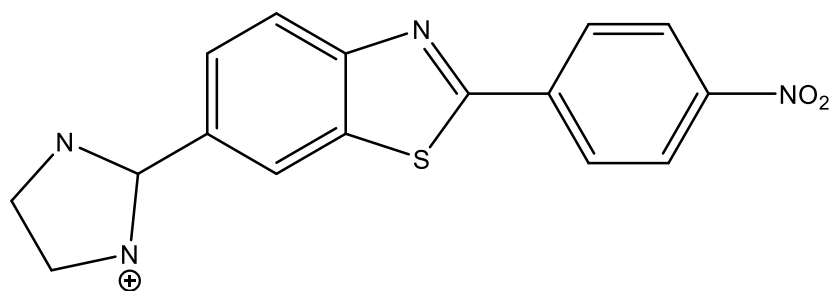


Slika 4.47. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  313

Tablica 4.14. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  313

|                                | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,81                    | Toksično          |
| <b>Mutagenost</b>              | /                       | /                 |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 3,08                    | Niska sklonost    |

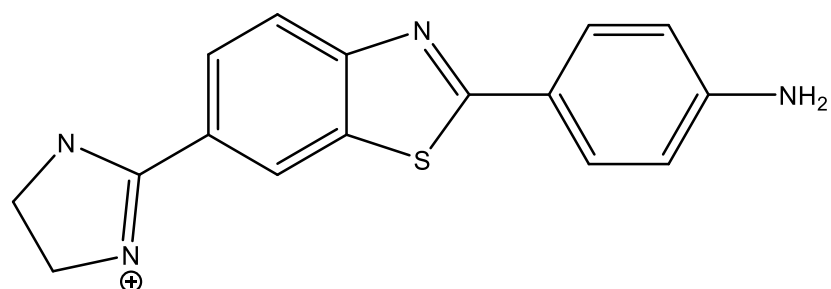




Slika 4.48. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  323

Tablica 4.15. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  323

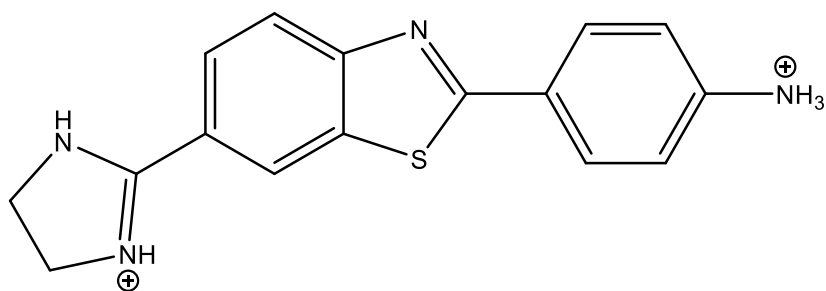
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,72                    | Toksično          |
| Mutagenost              | /                       | /                 |
| Bioakumulacijski faktor | 13,27                   | Niska sklonost    |



Slika 4.49. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  293 ( $t_R=5,099$  min)

Tablica 4.15. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  293 ( $t_R=5,099$  min)

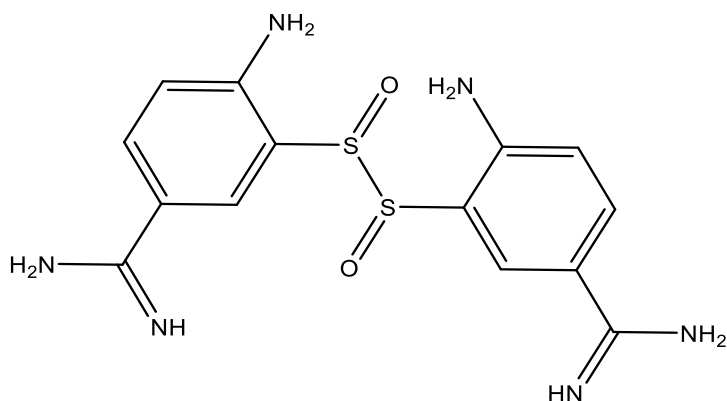
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,62                    | Toksično          |
| Mutagenost              | 0,71                    | Mutageno          |
| Bioakumulacijski faktor | 8,81                    | Niska sklonost    |



Slika 4.50. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  296

Tablica 4.16. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  296

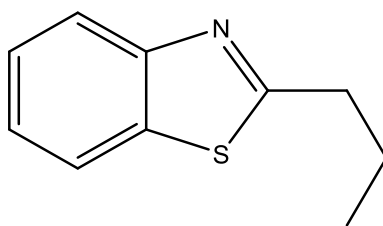
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,61                    | Toksično          |
| Mutagenost              | /                       | /                 |
| Bioakumulacijski faktor | 11,50                   | Niska sklonost    |



Slika 4.51. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  366

Tablica 4.17. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  366

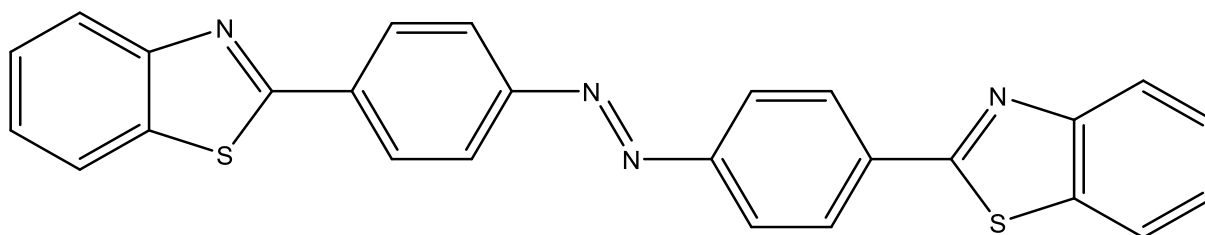
|                         | Procijenjena vrijednost         | Rezultat procjene |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | /                               | /                 |
| Mutagenost              | 0,33 (metoda najbližeg susjeda) | Nije mutageno     |
| Bioakumulacijski faktor | /                               | /                 |



Slika 4.52. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  177

Tablica 4.18. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  177

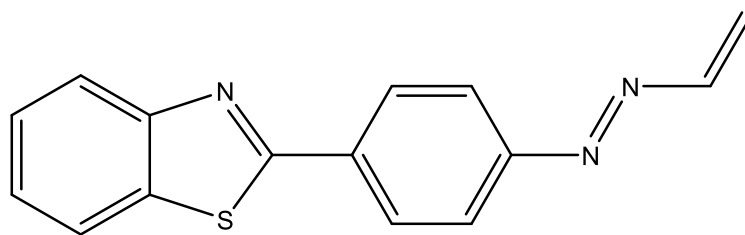
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,68                    | Toksično          |
| Mutagenost              | -0,34                   | Nije mutageno     |
| Bioakumulacijski faktor | 45,20                   | Umjerena sklonost |



Slika 4.53. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  450

Tablica 4.19. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  450

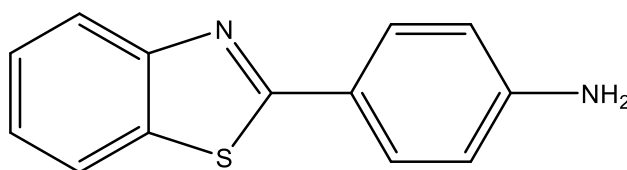
|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,68                    | Toksično          |
| Mutagenost              | 0,75                    | Mutageno          |
| Bioakumulacijski faktor | 21,26                   | Niska sklonost    |



**Slika 4.54.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 260

**Tablica 4.20.** Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 260

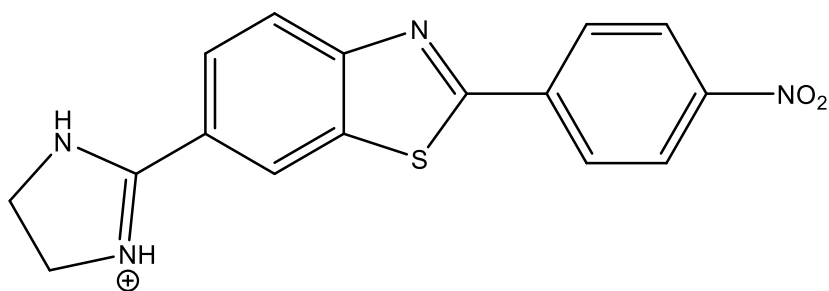
|                                | <b>Procijenjena vrijednost</b> | <b>Rezultat procjene</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,53                           | Toksično                 |
| <b>Mutagenost</b>              | 1,14                           | Mutageno                 |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 108,32                         | Visoka sklonost          |



**Slika 4.55.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta *m/z* 225

**Tablica 4.21.** Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta *m/z* 225

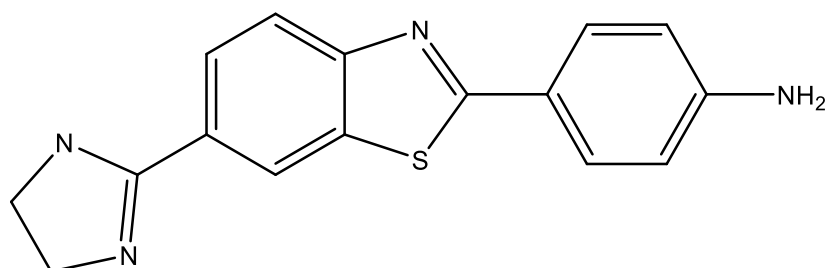
|                                | <b>Procijenjena vrijednost</b> | <b>Rezultat procjene</b> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>Razvojna toksičnost</b>     | 0,37                           | Nije toksično            |
| <b>Mutagenost</b>              | 0,84                           | Mutageno                 |
| <b>Bioakumulacijski faktor</b> | 43,91                          | Umjerena sklonost        |



Slika 4.56. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  325

Tablica 4.22. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  325

|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,76                    | Toksično          |
| Mutagenost              | 0,79                    | Mutageno          |
| Bioakumulacijski faktor | 11,32                   | Niska sklonost    |



Slika 4.57. Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta  $m/z$  293 ( $t_R=7,344$  min)

Tablica 4.23. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta  $m/z$  293 ( $t_R=7,344$  min)

|                         | Procijenjena vrijednost | Rezultat procjene |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| Razvojna toksičnost     | 0,56                    | Toksično          |
| Mutagenost              | -0,48                   | Nije mutageno     |
| Bioakumulacijski faktor | 10,78                   | Niska sklonost    |

Uspoređujući vrijednost razvojne toksičnosti osnovnog spoja LD-5 s vrijednostima razvojne toksičnosti razgradnih produkata vidljivo je da  $m/z$  311,  $m/z$  293 ( $t_R=5,099$  min),  $m/z$  296,  $m/z$  260,  $m/z$  225 i  $m/z$  293 ( $t_R=7,344$  min) pokazuju nižu vrijednost, dok svi ostali razgradni produkti pokazuju neznatno višu vrijednost toksičnosti u odnosu na osnovni spoj. Nadalje, nerazgrađeni LD-5 i svi njegovi razgradni produkti, osim  $m/z$  225, spadaju u skupinu razvojno toksičnih spojeva. Spomenuti  $m/z$  225 s vrijednosti bezdimenzijske značajke razvojne toksičnosti od 0,37 klasificira se kao netoksičan spoj.

$M/z$  269,  $m/z$  177 i  $m/z$  293 ( $t_R=7,344$  min) procijenjeni su kao nemutageni spojevi, a spojevima  $m/z$  313,  $m/z$  323 i  $m/z$  296 mutagenost se nije mogla odrediti nijednim QSAR modelom jer u bazi podataka nema dovoljno sličnih molekula na temelju kojih bi se provela usporedba. Svi ostali razgradni produkti, a s njima i osnovni LD-5, spadaju u skupinu mutagenih spojeva. Procijenjene vrijednosti mutagenosti tih razgradnih produkata više su od vrijednosti osnovnog LD-5 spoja, s tim da  $m/z$  260 pokazuje najvišu vrijednost od 1,14.

Vrijednost bioakumulacijskog faktora osnovnog LD-5 vrlo je niska (7,3), a nižu vrijednost od njegove ima samo  $m/z$  313 (3,08). Također, i svi ostali razgradni produkti LD-5 spoja, osim  $m/z$  177,  $m/z$  260 i  $m/z$  225, imaju nisku sklonost bioakumulaciji s vrijednostima bioakumulacijskog faktora  $<30$ .  $M/z$  177 i  $m/z$  225 pokazuju umjerenu sklonost, dok  $m/z$  260 s vrijednosti bioakumulacijskog faktora od 108,32 pokazuje visoku sklonost bioakumulaciji.

Razgradnom produktu  $m/z$  366 vrijednost razvojne toksičnosti i bioakumulacijskog faktora nije se mogla odrediti nijednom QSAR metodom, dok se mutagenost odredila metodom najbližeg susjeda koja je prihvatljiva za procjenu mutagenosti, ali ima manju pouzdanost od konsenzus metode [47]. S obzirom da su sve vrijednosti ostalih razgradnih produkata određene konsenzus metodom, vrijednost  $m/z$  366 nije se uzimala u obzir prilikom rasprave dobivenih rezultata. No, valja naglasiti da je metodom najbližeg susjeda  $m/z$  366 procijenjen kao nemutageni spoj s vrijednošću mutagenosti od 0,33.

Zaključno, nijedan razgradni produkt LD-5 spoja ne pokazuje istovremeno svojstvo razvojne netoksičnosti i nemutagenosti. S druge strane, produkt koji se pojavljuje u gotovo svim eksperimentima, ujedno jedan od triju glavnih razgradnih produkata,  $m/z$  325 pokazuje veće vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora u odnosu na osnovni spoj pa se može reći da razgradnjom LD-5 nastaje sveobuhvatno toksičniji spoj.

## **5. ZAKLJUČAK**

Svrha ovog rada bila je određivanje razgradnih produkata amino i amidino supstituiranih 2-benzotiazola s ciljem određivanja njihove sveobuhvatne toksičnosti, odnosno utjecaja ne samo na ljude, već i na životinje i okoliš. Ranije sintetizirani spojevi LD-4 i LD-5, točnije kloridna i mesilatna sol amino-amidinskog 2-fenilbenzotiazola, podvrgnuti su uvjetima prisilne razgradnje, a identifikacija produkata provedena je pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti povezanim sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (HPLC-QTOF). Na osnovu dobivenih spektara masa određena je struktura razgradnih produkata i predložen razgradni put osnovnih spojeva.

Uzorci LD-4 i LD-5 spojeva analizirani su u uvjetima kisele hidrolize (0,5 M HCl), bazne hidrolize (0,5 M NaOH), oksidacije peroksidom (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), povišene temperature (80 °C i 100 °C) te umjetne sunčeve svjetlosti (500 Wh/m<sup>2</sup>). Na temelju provedenih eksperimenata doneseni su slijedeći zaključci:

- Spoj LD-4 razgradio se pri svim navedenim uvjetima prisilne razgradnje pri čemu je nastalo ukupno 7 razgradnih produkata. Najviše njih (čak 4) nastalo je prilikom oksidacije 10 %-tnim peroksidom što ukazuje na to da je LD-4 najviše podložan razgradnji upravo pri tim uvjetima. Na osnovi dobivenih rezultata, zaključuje se da je glavni razgradni produkt LD-4 spoja  $m/z$  297 s obzirom da on nastaje u svim provedenim eksperimentima.
- Prisilnom razgradnjom LD-5 spoja nastalo je ukupno 13 razgradnih produkata. Spoj je također podložan razgradnji pri svim eksperimentalnim uvjetima, a najviše razgradnih produkata (njih 10 ukupno) nastalo je prilikom termalne razgradnje pri 80 °C i 100 °C na temelju čega se zaključuje da je LD-5 najnestabilniji upravo pri povišenoj temperaturi. Kao razgradni produkti gotovo svih eksperimenata pojavljuju se  $m/z$  293 ( $t_R=5,099$  min),  $m/z$  269 i  $m/z$  325 koji tako predstavljaju tri glavna razgradna produkta LD-5 spoja.



Na temelju određene strukture razgradnih produkata procijenjene su vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i biakumulacijskog faktora pomoću T.E.S.T. softverskog programa i doneseni su slijedeći zaključci:

- Spoj LD-4 i svi njegovi razgradni produkti, osim *m/z* 212, procijenjeni su kao razvojno toksični spojevi s vrijednostima razvojne toksičnosti većim od 0,5. Od nastalih razgradnih produkata samo *m/z* 299, i *m/z* 212 koji je netoksičan, pokazuju manju vrijednost razvojne toksičnosti u odnosu na osnovni nerazgrađeni spoj.
- Mutagenost LD-4, *m/z* 303 i *m/z* 312 nije se mogla odrediti nijednim QSAR modelom jer u bazi podataka ne postoji dovoljno sličnih molekula na temelju kojih bi se usporedba provela, a potencijalnu mutagenost pokazuje samo razgradni produkt *m/z* 365.
- Jedino razgradni produkt *m/z* 212 pokazuje visoku sklonost bioakumulaciji, dok svi ostali razgradni produkti i osnovni nerazgrađeni spoj pokazuju nisku tendenciju ulaska u prehrambeni lanac živih organizama.
- *M/z* 212 pokazuje svojstvo istovremene razvojne netoksičnosti i nemutagenosti, ali s druge strane visoku sklonost bioakumulaciji.
- Glavni razgradni produkt LD-4 spoja, *m/z* 297 pokazuje veće vrijednosti razvojne toksičnosti i biakumulacijskog faktora u odnosu na osnovni spoj pa se može zaključiti da razgradnjom LD-4 nastaje razvojno toksičniji spoj s većom sklonosti bioakumulaciji, opasniji po žive organizme i okoliš.
- Nerazgrađeni LD-5 i svi njegovi razgradni produkti, osim *m/z* 225, spadaju u skupinu razvojno toksičnih spojeva, dok se *m/z* 225 klasificira kao razvojno netoksičan spoj.
- Osnovni LD-5 procijenjen je kao mutageni spoj, a svi njegovi razgradni produkti koji su također procijenjeni kao potencijalno mutageni, pokazuju veće vrijednosti mutagenosti u odnosu na LD-5.

- Većina razgradnih produkata pa i sam LD-5 pokazuju nisku sklonost bioakumulaciji. Tek dva produkta ( $m/z$  177 i  $m/z$  225) pokazuju umjerenu sklonost, a jedan produkt ( $m/z$  260) pokazuje visoku sklonost ulasku u prehrambeni lanac.
- Nijedan razgradni produkt LD-5 spoja ne pokazuje svojstvo razvojne netoksičnosti i nemutagenosti istovremeno.
- Jedan od triju glavnih razgradnih produkata LD-5,  $m/z$  325, pokazuje veće vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora u odnosu na osnovni spoj pa se može zaključiti da razgradnjom LD-5 nastaje sveobuhvatno toksičniji spoj.

Zaključno, na temelju dobivenih procijenjenih vrijednosti razvojne toksičnosti i mutagenosti može se zaključiti da ranije sintetizirani spojevi LD-4 i LD-5, kao i njihovi razgradni produkti, predstavljaju potencijalnu opasnost za ljude, životinje i okoliš. Prije upotrebe tih spojeva u farmaceutskoj, kemijskoj ili bilo kojoj drugoj industriji svakako bi se trebala provesti detaljnija istraživanja i ispitivanja fizikalnih i kemijskih svojstava navedenih spojeva.

## **6. LITERATURA**

- [1] Blessy M, Ruchi D. Patel, Prajesh N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **4** (3) (2014) 159–165.
- [2] V. Mikulčić, Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MD tehnikom, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2017.
- [3] <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (pristup travanj 2021.)
- [4] I. Ursić, Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
- [5] D.W. Reynolds, K.L. Facchine, J.F. Mullaney, et al., Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies, *Pharm. Technol.* **26** (2) (2002) 48–56.
- [6] H. Brummer, How to approach a forced degradation study, *Life Sci. Technol. Bull.* **31** (2011) 1–4.
- [7] M. Kats, Forced degradation studies: regulatory considerations and implementation, *BioPharm Int.* **18** (2005) 1–7.
- [8] S. Singh, M. Bakshi, Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs, *Pharm. Technol.* **24** (2000) 1–14.
- [9] K. M. Alsante, A. Ando, R. Brown, et al., The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59** (1) (2007) 29–37.
- [10] Min Li, *Organic Chemistry of Drug Degradation*, Royal Society of Chemistry, 2012.
- [11] F. Qiu, D. L. Norwood, Identification of pharmaceutical impurities, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **30** (2007) 877–935.
- [12] A. R. Mladenović, Proučavanje stabilnosti donepezil-hidroklorida različitim analitičkim

metodama, Doktorski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Sveučilište u Beogradu, 2015.

[13] I. Ahmad, S. Ahmed, Z. Anwar, M. A. Sheraz, M. Sikorski, Photostability and photostabilization of drugs and drug products, *International Journal of Photoenergy* (2016); Article ID 8135608

[14] International conference of harmonization (ICH), Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), listopad 2006.

[15] International conference of harmonization (ICH), Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3B (R2), lipanj 2006.

[16] International conference of harmonization (ICH), Harmonised Tripartite Guideline, Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R6), listopad 2016.

[17] <http://struna.ihjj.hr/naziv/benzotiazol/42097/> (pristup travanj 2021.)

[18] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7222#section=2D-Structure> (pristup srpanj 2021.)

[19] P. Zahradnik, *Chem. Papres* **44** (1990)

[20] I. Čaleta, G. Karminski-Zamola, Sinteza i djelovanje derivata benzotiazola, *Kem. Ind.* **57** (6) (2008) 307-319.

[21] L. Racane, M. Kralj, L. Šuman, R. Stojković, V. Tralić-Kulenović, G. Karminski-Zamola, Novel amidino substituted 2-phenylbenzothiazoles: Synthesis, antitumor evaluation in vitro and acute toxicity testing in vivo, *Bioorganic & Medical Chemistry* **18** (2010) 1038-1044.

[22] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13439#section=Structures> (pristup srpanj 2021.)

[23] L. Racane, R. Stojković, V. Tralić-Kulenović, H. Cerić, M. Đaković, K. Ester, A. Mišir

Krpan, M. Radić Stojković, Interactions with polynucleotides and antitumor activity of amidino and imidazolanyl substituted 2-phenylbenzothiazole mesylates, *European Journal of Medicinal Chemistry* **86** (2014) 406-419.

[24] M. Zelen, Prislina razgradnja ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika, Završni specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.

[25] N. Galić, V. Drevenkar, Kromatografija, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.

[26] kromatografija. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. (<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34154> , pristupljeno 3. 5. 2021.)

[27] F. Rouessac, A. Rouessac, Chemical Analysis: Modern Instrumental Methods and Techniques, 2nd Ed., Willey&Sons, New York, 2007.

[28] [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (pristup svibanj 2021.)

[29] M. Thammana, A review on high-performance liquid chromatography (HPLC). Res. Rev.: *J.Pharm. Anal.* **5** (2016) 22–28.

[30] D. M. Rode, N. N. Rao, A review on development and validation of stability indicating HPLC methods for analysis of acid drugs, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, Vol 11, Issue 4, 2019.

[31] D. Džambić, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Završni rad, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2019.

[32] M. Jalžabetić, Analitički i regulatorni aspekt ispitivanja stabilnosti tableta od razvoja do odobrenja za stavljanje lijeka u promet, Završni specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016

- [33] <https://slideplayer.com/slide/10522003/> (pristup svibanj 2021.)
- [34] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI and Commonly Used Mass Analyzers, *Appl. Spectrosc. Rev.* **44** (2009) 210–230.
- [35] K. N. Patel, J. K. Patel, M. P. Patel, G. C. Rajput, H. A. Patel, Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy, *Pharm. Methods* **1** (2010) 2–13.
- [36] P. Novak, T. Jednačak, Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013. str. 78 – 88.
- [37] J. Gašperov, Spregnuti sustavi u analizi lijekova, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2018.
- [38] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/> (pristup svibanj 2021.)
- [39] <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm> (pristup svibanj 2021.)
- [40] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry Principles and Applications, Chichester: John Wiley & Sons, 2007; 85-6. str
- [41] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina Flum.* **45** (3) (2009) 218-232.
- [42] <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/maseni-spektrometar> (pristup svibanj 2021.)
- [43] T. Marković, Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa, Diplomski rad, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.

[44] T. Sofilić, H. Makić, Toksikologija, Interna skripta, Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Sisak 2019.

[45] [https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=243050](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=243050) (pristup srpanj 2021.)

[46]

[https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/When\\_to\\_Use\\_QSAR\\_for\\_Chemical\\_Substance\\_Registration\\_and\\_Common\\_QSAR\\_Models.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/When_to_Use_QSAR_for_Chemical_Substance_Registration_and_Common_QSAR_Models.html) (pristup srpanj 2021.)

[47] T. Martin, User' Guide for T.E.S.T. (version 4.2.) (Toxicity Estimation Software Tool), EPA document, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 2016., str. 3., 8.-10.

[48] C. Franke, G. Studinger, G. S. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg, U. Jöhncke, The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere* **29** (7) (1994) 1501-1514.

[49] Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Pravilnik o razvrstavanju, označavanju, obilježavanju i pakiranju opasnih kemikalja, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011\\_06\\_64\\_1423.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011_06_64_1423.html) (pristup kolovoz 2021.)



## **7. ŽIVOTOPIS**

## EMA PAVIĆ

Ema Pavić [REDACTED] Godine 2012. završava Osnovnu školu Ljudevita Gaja i upisuje Srednju školu Krapina u Krapini. Upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemijsko inženjerstvo 2016. godine. Stručnu praksu odradila je u Pliva Hrvatska d.o.o., odjel Istraživanje i razvoj, gdje je najviše vremena provela u radu s HPLC uređajem. Sveučilišni preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva završila je 18. rujna 2019. obranom rada na temu „Desorpcija hidroklorokina i metoklopramida s prirodnih uzoraka tla“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović. U rujnu 2019. upisuje diplomski studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijske tehnologije i proizvodi. U okviru projekta „CeSaR na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije“ dodijeljena joj je potvrda o sudjelovanju na radionici za studente pod nazivom „Priprema za proces traženja posla“.

Od listopada 2018. član je udruge BEST Zagreb (engl. Board of European Students of Technology), gdje aktivno sudjeluje u organizaciji najvećeg europskog inženjskog natjecanja EBEC. Od stranih jezika koristi se engleskim jezikom govorno i pismeno te osnovama njemačkog jezika. U računalnom radu aktivno se koristi programima *Microsoft Office* paketa, a osnovno je upoznata s programima Matlab, ChemDraw, T.E.S.T. i ChemCAD.