

Ispitivanje stabilnosti amino supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina spektrometrijom masa visoke razlučivosti

Gotovuša, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:149:439331>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Gotovuša

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Gotovuša

**ISPITIVANJE STABILNOSTI AMINO SUPSTITUIRANIH
BENZIMIDAZO[1,2-*a*]KINOLINA SPEKTROMETRIJOM MASA
VISOKE RAZLUČIVOSTI**

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, rujan 2020.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na stručnoj pomoći, savjetima te riječima potpore i razumijevanja prilikom pisanja i izrade ovoga rada. Hvala na ukazanom povjerenju i svim pruženim prilikama tijekom mojeg studiranja.

Hvala prof. dr. sc. Marijani Hranjec te dr. sc. Nataši Perin te članovima Zavoda za organsku kemiju na sintetiziranim spojevima na kojima su provedena analitička ispitivanja.

Zahvaljujem se asistentici Kristini Tolić, mag. appl. chem. te tehničarkama Tanji Ivančić i Slavici Kos sa Zavoda za analitičku kemiju na svojoj pomoći i savjetima tijekom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala dr. sc. Mislavu Runji na svom trudu i angažmanu prilikom snimanja pripremljenih uzoraka u Plivi.

Zahvalu upućujem i izv. prof. Tatjani Gazivodi Kraljević sa Zavoda za organsku kemiju na pomoći pri identificiranju struktura razgradnih produkata.

Ovom prilikom zahvaljujem svima koji su tijekom studiranja, a napose na posljednjoj godini diplomskog studija prepoznali u meni potencijal te mi pružili priliku za učenjem i dodatnim edukacijama.

Hvala prijateljima i kolegama na pruženoj podršci tijekom mojeg školovanja.

Naposljetku, najveće hvala mojoj mami, bez čije nesebične potpore i beskrajne ljubavi, i u najtežim životnim trenucima, ne bih bila ono što jesam. Mama, naučila si me da budem zahvalna na svemu što imam i na svakom životnom iskustvu.

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

ISPITIVANJE STABILNOSTI AMINO SUPSTITUIRANIH BENZIMIDAZO[1,2-*a*]KINOLINA SPEKTROMETRIJOM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI

Znanstvena istraživanja u području organske kemije i biokemije u novije su vrijeme usmjerena pronalaženju odgovarajućih sintetskih mehanizama kojima bi se dobili spojevi poželjne biološke aktivnosti. Potencijalnim kemoterapeuticima pokazali su se heterociklički spojevi, konkretno u ovom radu ispitivani derivati spojeva iz skupine benzimidazola. Ovi spojevi posjeduju biološki aktivna svojstva uslijed mehanizma interkalacije kojem podliježu u reakcijama s biološkim makromolekulama, poput deoksiribonukleinske kiseline, ribonukleinske kiseline i proteina. Postupak istraživanja i razvoja ovih lijekova podrazumijeva provedbu eksperimenata prisilne razgradnje, u okolišnim uvjetima u kojima se oni mogu naći tijekom transporta i skladištenja. Hidrolitička, termalna, fotolitička te razgradnja u prisutnosti vodikovog peroksida eksperimentalni su postupci kojima su se u ovom radu podvrgnuli novosintetizirani spojevi. Nastali razgradni produkti detektirani su i identificirani primjenom spektrometrije masa visoke razlučivosti, a pripadajuće strukturne formule dobivene su primjenom računalnog programa ChemDRAW. Nad dobivenim strukturama primijenjeni su i računalni modeli u sklopu programa TEST, u cilju procjene bioakumulacijskog faktora, toksičnosti i mutagenosti analiziranih spojeva.

Ključne riječi: benzimidazoli, prisilna razgradnja, razgradni produkti, bioakumulacijski faktor, toksičnost, mutagenost

ABSTRACT

STABILITY INVESTIGATION OF AMINO SUBSTITUTED BENZIMIDAZO[1, 2-*a*]QUINOLINES BY HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

In recent years, scientific research in the field of organic chemistry and biochemistry has mainly focused on finding appropriate synthetic mechanisms by which the compounds of desirable biological activity can be obtained. Heterocyclic compounds have been proven to be potential chemotherapeutics, specifically the benzimidazole derivatives of the compounds tested in this thesis. These compounds possess biologically active properties due to the intercalation mechanism which they are subject to in reactions with biological macromolecules, such as deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and proteins. The process of research and development of these drugs involves the implementation of forced degradation experiments, in the environmental conditions in which they can be found during transport and storage. Hydrolytic, thermal, photolytic and degradation in the presence of hydrogen peroxide are experimental methods to which the newly synthesized compounds were subjected. The detection and identification of resulting degradation products was performed using high-resolution mass spectrometry, and the corresponding structural formulas were obtained with the application of a software ChemDRAW. Computer models within the TEST program were applied to the obtained structures, in order to assess the bioaccumulation factor, toxicity and mutagenicity of the analysed compounds.

Key words: benzimidazoles, forced degradation, degradation products, bioaccumulation factor, toxicity, mutagenicity

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1. Benzimidazoli | 2 |
| 2.1.1. Amino supstituirani benzimidazo[1,2- <i>a</i>]kinolini..... | 3 |
| 2.1.2. Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti izveden 3D (QSAR) | 5 |
| 2.1.3. Svojstva vezivanja na DNA..... | 6 |
| 2.1.4. Biološka aktivnost i antitumorsko djelovanje derivata benzimidazola .. | 8 |
| 2.2. Onečišćenja u lijekovima..... | 11 |
| 2.2.1. Klasifikacija onečišćenja | 11 |
| 2.2.2. Razlozi praćenja i kontrole onečišćenja | 12 |
| 2.2.2.1. Organska onečišćenja..... | 12 |
| 2.2.2.2. Anorganska onečišćenja..... | 12 |
| 2.2.2.3. Otapala | 13 |
| 2.3. Prisilna razgradnja..... | 13 |
| 2.4. Regulatorne smjernice za provedbu postupka prisilne razgradnje..... | 14 |
| 2.5. Analitičke metode primijenjene u procesima prisilne razgradnje..... | 17 |
| 2.5.1. Kromatografija vezana na spektrometre masa kao detektore..... | 17 |
| 2.6. Toksičnost..... | 18 |
| 2.6.1. Računalni softveri za procjenu toksičnosti..... | 19 |
| 2.6.1.1. TEST (<i>Test Estimation Software Tool</i>)..... | 19 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 21 |
| 3.1. Materijali..... | 21 |
| 3.1.1. Kemikalije | 21 |
| 3.1.2. Farmaceutski aktivne tvari - amino supstituirani benzimidazo[1,2- <i>a</i>]kinolini..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Instrumenti | 22 |
| 3.2.1. Analitička vaga | 22 |
| 3.2.2. Ultrazvučna kupelj | 23 |
| 3.2.3. Sušionik | 23 |
| 3.2.4. Fitolizer..... | 24 |
| 3.2.5. Tekućinska kromatografija vezana na spektrometar masa (LC/ESI-QTOF) | 25 |
| 3.3. Opis rada..... | 26 |
| 3.3.1. Priprema standardnih otopina uzoraka..... | 26 |
| 3.3.2. Provedba postupaka prisilne razgradnje..... | 26 |
| 3.3.2.1. Hidroliza..... | 26 |
| 3.3.2.2. Oksidacija..... | 26 |
| 3.3.2.3. Termalna razgradnja | 27 |
| 3.3.2.4. Fitoliza..... | 27 |
| 3.3.3. Analiza uzoraka spektrometrijom masa visoke razlučivosti (QTOF)... | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 30 |
| 4.1. Analiza uzoraka aktivnog spoja N-1 spektrometrijom masa..... | 30 |
| 4.2. Analiza uzoraka aktivnog spoja N-2 spektrometrijom masa..... | 37 |
| 4.3. Predloženi putevi razgradnje..... | 42 |
| 4.3.1. Razgradni putevi spoja N-1 po eksperimentima..... | 42 |
| 4.3.2. Razgradni putevi spoja N-2 po eksperimentima..... | 46 |
| 4.3.3. Procjena krajnjih točaka toksičnosti spoja N-1 i njegovih razgradnih produkata | 50 |
| 4.3.4. Procjena krajnjih točaka toksičnosti spoja N-2 i njegovih razgradnih produkata | 60 |
| 5. ZAKLJUČAK | 66 |
| 6. LITERATURA | 70 |
| 7. ŽIVOTOPIS | 73 |

1. UVOD

Sadašnja kao i prethodno provedena istraživanja iz područja organske i medicinske kemije usmjerena su ka pronalaženju prikladnih sintetskih puteva te ispitivanju biološke aktivnosti spojeva koji bi se u budućnosti mogli koristiti kao potencijalni kemoterapeutici za liječenje zloćudnih bolesti, ponajprije raka. Potreba za liječenjem ovakvih bolesti iziskuje od znanstvenika da interes usmjere proučavanju spojeva koji posjeduju značajniju biološku aktivnost. Na to koliko će pojedini spoj biti biološki aktivan upućuje upravo njegova struktura. Naime, biološke makromolekule poput DNA, RNA te proteina ciljane su molekule i biološke mete za razradu strategija razvoja antitumorskih lijekova, čije se djelovanje upravo bazira na interakciji ispitivanih antitumorskih agensa s dijelovima strukture spomenutih biomolekula.

Skupina spojeva koja se pritom pokazala najzanimljivijom su heterociklički spojevi, kao i u ovom radu ispitivani derivati spojeva iz skupine benzimidazola. Općenito je razumijevanje mehanizma interakcije malih heteroaromatskih organskih molekula sa spomenutim biološkim makromolekulama na molekularnom nivou od ključnog značaja prilikom razvoja aktivnih te što selektivnijih antitumorskih agensa. U slučaju spomenutih spojeva riječ je o mehanizmu interkalacije između susjednih parova baza molekule deoksiribonukleinske kiseline, gdje se organskim interkalatorima smatraju policiklički aromatski spojevi, obično sastavljeni od kondenziranih planarnih aromatskih i heteroaromatskih jezgri. Kombinacijom benzimidazola s drugim heteroaromatskim jezgrama mogu se dobiti spojevi poboljšanih bioloških svojstava.

Cilj ovog rada je novosintetizirane biološki aktivne organske spojeve podvrgnuti procesima prisilne razgradnje te ispitati njihovu stabilnost u različitim okolišnim uvjetima u kojima bi se dotični spojevi mogli naći od trenutka njihove sinteze, odnosno tijekom vremena njihova transporta ili skladištenja. U tu su svrhu provedeni eksperimenti hidrolitičke, oksidacijske, termalne te fotolitičke razgradnje, a tretirani su uzorci potom analizirani kvadripolnim spektrometrom masa s vremenom preleta (*eng.* QTOF-MS¹). Iz dobivenih spektara masa određene su formule produkata razgradnje nastalih određenim razgradnim mehanizmom.

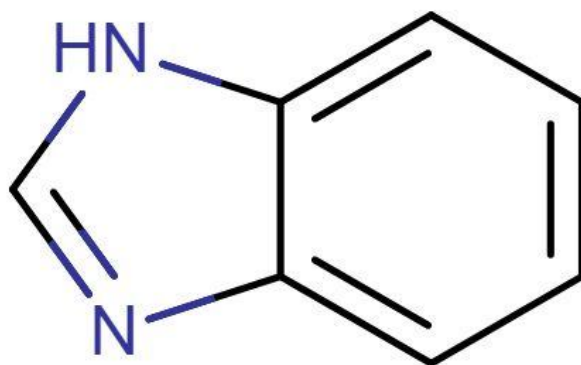
¹ *Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer*

2. OPĆI DIO

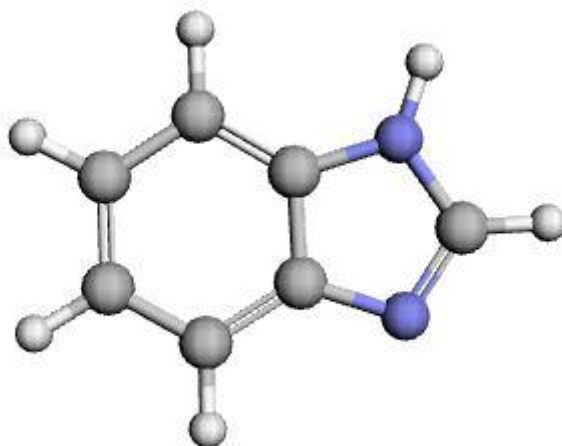
2.1. Benzimidazoli

Benzimidazoli su organski spojevi koji sadrže benzenski prsten kondenziran s imidazolnim prstenom, točnije peteročlanim prstenom koji sadrži 2 atoma dušika, 3 atoma ugljika te dvije dvostruke veze. [1]

Kemijska je formula molekule benzimidazola $C_7H_6N_2$, dok je molarna masa ovog spoja 118,139 g/mol. [2] Slikama 1. i 2. dani su planarni i 3D strukturni prikazi molekule benzimidazola.



Slika 1. Strukturna formula molekule benzimidazola [3]



Slika 2. Trodimenzionalni strukturni prikaz molekule benzimidazola [4]

Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika koji pripadaju ovoj skupini spojeva dana su Tablicom 1.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva benzimidazola [1]

| Svojstvo | Vrijednost |
|--------------------------|------------------|
| Agregatno stanje | krutina |
| Boja [2] | bezbojni |
| Talište / °C | 170,5 |
| Vrelište / °C | > 360 |
| Topljivost u vodi / mg/L | 2010 (pri 20 °C) |
| log <i>P</i> | 1,32 |
| p <i>K</i> _a | 5,3 (pri 25 °C) |
| Dipolni moment [5] | 3,93 |

2.1.1. Amino supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolini

Neki od farmaceutika koji pripadaju skupini benzimidazola poznati su između ostaloga i po svojem antiproliferativnom djelovanju. Naime, ovakvi spojevi sprječavaju razmnožavanje tumorskih stanica. [6] Prethodna istraživanja ovakvog načina djelovanja benzimidazola na Fakultetu provedena su na Zavodu za organsku kemiju, gdje je antiproliferativno djelovanje novih derivata benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila s različitim amino bočnim lancima testirano na staničnim linijama tumora debelog crijeva, dojki i pluća. Selektivnost prema tumorskim stanicama strukturno najzanimljivijih spojeva iz ove skupine spojeva ispitana je na ljudskim epitelnim stanicama. Potom su dobiveni rezultati uspoređeni s poznatim antitumorskim agensima i lijekovima doksorubicinom i etopozidom.

Od ispitivanih 2-amino supstituiranih derivata, eksperimentalno se pokazalo kako su tri spoja snažno inhibirala rast svih staničnih linija. 4-metil-1-piperazinil i 3,5-dimetil-1-piperazinil supstituirani spojevi imali su najjače citotoksično djelovanje. Nadalje, kod promatranja korelacije između antiproliferativnog djelovanja i duljine bočnih amino lanaca uvidjelo se

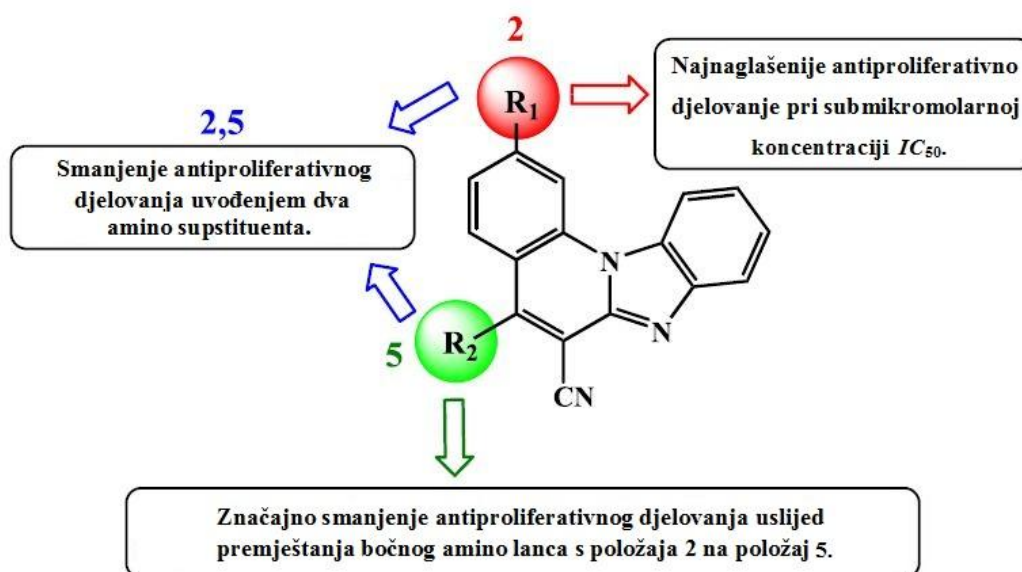
kako povećanjem duljine lanca opada aktivnost, najvjerojatnije uslijed povećanja amfifilnog momenta molekule te neuravnotežene raspodjele njezinih hidrofobnih područja.

Kod drugih ispitivanih spojeva, poput 3,5-dimetil-1-piperazinil supstituiranog derivata, visoka antiproliferativna aktivnost mogla se objasniti prisutnošću dodatnog dušikova heteroatoma, koji doprinosi interakcijama s potencijalnim biološkim metama.

Također, zapaženo je kako nižu antiproliferativnu aktivnost pokazuju derivati s tercijarnim amino bočnim lancima, u odnosu na one sa sekundarnim, što je potvrda literaturnih spoznaja o većem utjecaju sekundarnih lanaca na povećanja antiproliferativne aktivnosti određenog spoja.

Dakle, spomenuta istraživanja dovela su do zaključaka da antiproliferativno djelovanje jako ovisi, kako o vrsti, tako i o duljini te položaju amino supstituenta na tetracikličnom kosturu. Najperspektivnijim antiproliferativnim agensima pokazali su se amino supstituirani derivati sa supstituentima na položaju 2, dok je pomicanje amino bočnog lanca iz položaja 2 u položaj 5 uvelike smanjilo biološku aktivnost. Kada su se, međutim, uvela dva amino supstituenta na položajima 2 i 5, u odnosu na 2-supstituirane derivate, došlo je do neznatnog smanjenja antiproliferativnog djelovanja. [7]

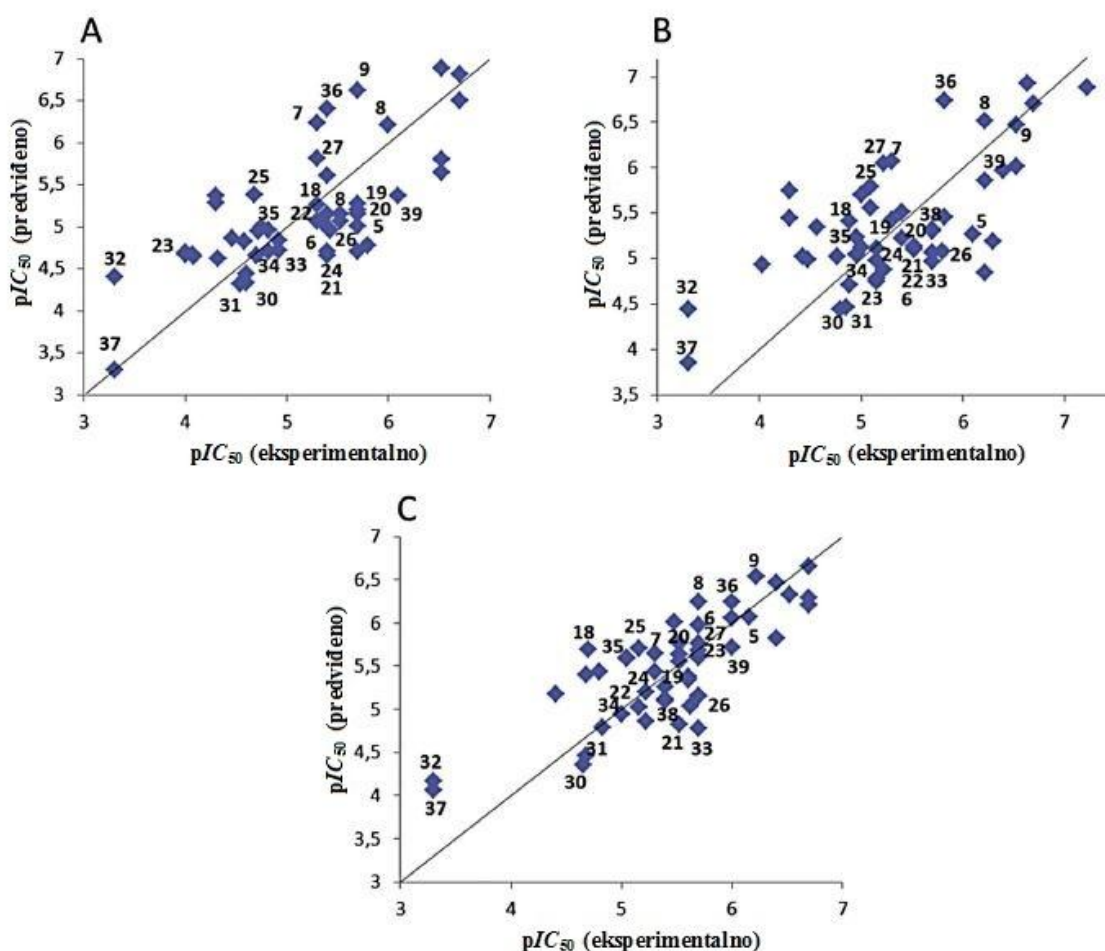
Utjecaj amino supstituenata na antiproliferativno djelovanje benzimidazola predložen je Slikom 3.



Slika 3. Utjecaj amino supstituenata na antiproliferativno djelovanje ispitivanog derivata benzimidazola - benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrila (prilagođeno prema referenci [7])

2.1.2. Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (3D QSAR)

Istraživanja koja su prethodno provedena na temu ispitivanja antitumorskog djelovanja derivata iz skupine spojeva benzimidazola pokazala su kako na antiproliferativno djelovanje na tri ispitivane stanične linije imaju najznačajniji utjecaj molekulska svojstva poput hidrofobnosti, molekulske fleksibilnosti, svojstava poteklih od prisutnosti vodikovih veza te raspodjele hidrofobnih dijelova u molekuli. S ciljem utvrđivanja načina djelovanja ovih fizikalnih i kemijskih svojstava, u istraživanjima je provedena 3D-QSAR analiza. Ona je iznjedrila modele kojima su u korelaciju stavljeni podatci predviđeni pomoću modela u ovisnosti o eksperimentalno dobivenim podatcima. Primjeri primjene ovakvih modela dani su Slikom 4. [7]

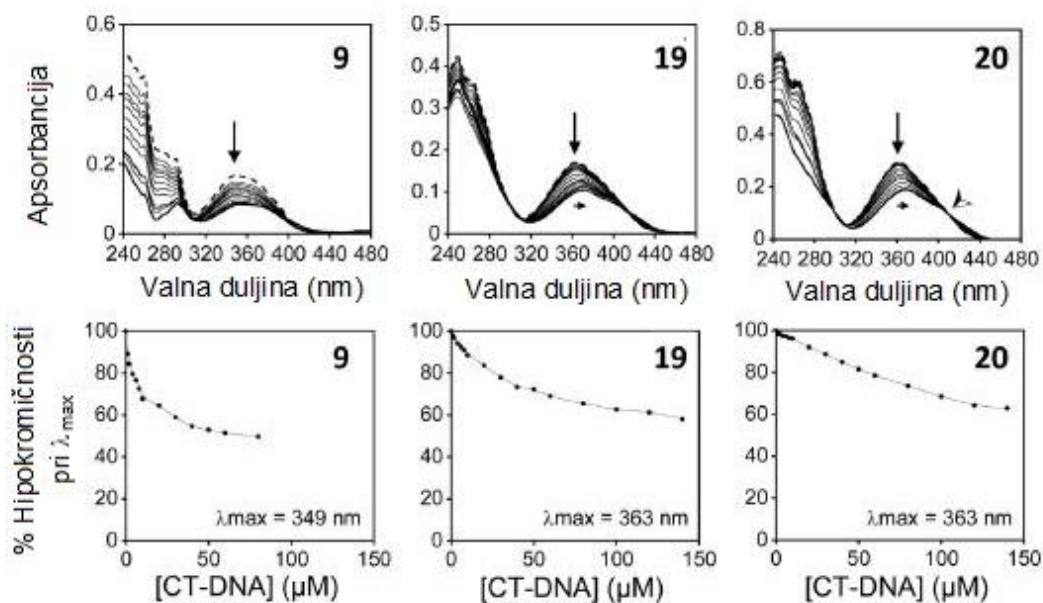


Slika 4. Usporedba predviđena u odnosu na eksperimentalnu antiproliferativnu aktivnost, iskazana kao pIC_{50} – negativan logaritam vrijednosti koncentracije koja uzrokuje 50 % rasta inhibicije linija tumorskih stanica (prilagođeno prema referenci [7])

Dakle, grafički prikazi dani Slikom 4. nastali su kao posljedica ispitivanja antiproliferativne aktivnosti konkretno analiziranih spojeva u usporedbi sa spojevima sličnih svojstava. Tako je, primjerice, ustanovljeno da kod modela 1 (Slika 4. A), stanične linije naziva H460, najveći pozitivan utjecaj na antiproliferativno djelovanje imaju svojstva poput proteinskog vezivanja, molekularne fleksibilnosti, hidrofobnosti te deskriptora vezanih uz vodikove veze. S druge strane, najnegativniji utjecaj na ispitivano djelovanje na dotičnu staničnu liniju pokazali su deskriptori poput postotka ujedinenih specija pri različitim pH-vrijednostima, vrijednosti amfifilnog momenta (vektora koji povezuje središte hidrofobnih sa središtem hidrofilnih regija) te omjera molekularnog volumena i molekularne površine. Analogno je određen pozitivan te negativan utjecaj pojedinih deskriptora na preostale dvije ispitivane stanične linije te se generalno moglo zaključiti kako povećanje jačine vodikovih veza, hidrofobnosti te fleksibilnosti, odnosno smanjenje neravnomjerne raspodjele hidrofobnih i hidrofilnih regija u molekuli dovodi do porasta antiproliferativne aktivnosti na sve tri ispitivane stanične linije. Dakle, ista su svojstva kod sve tri stanične linije imala najveći pozitivan i najveći negativan utjecaj na antiproliferativnu aktivnost. [7]

2.1.3. Svojstva vezivanja na DNA

Literaturni izvori navode kako su na derivatima benzimidazola provedena i ispitivanja koja se tiču vezivanja sintetiziranih spojeva na makromolekulu deoksiribonukleinske kiseline te je ustanovljeno kako su neki od dobivenih spojeva potencijalno snažni interkalatori. Ove studije sastojale su se od analiza poput UV/VIS apsorpcijske i fluorimetrijske spektroskopije, određivanja temperature taljenja [8] te cirkularnog dikroizma.



Slika 5. Primjer grafičkih rezultata UV/VIS spektroskopske analize te postotka hipokromičnosti pri utvrđenoj maksimalnoj valnoj duljini (prilagođeno prema referenci [8])

Slikom 5. dan je primjer prikaza rezultata UV/VIS spektroskopske analize tri ispitivana spoja prethodno provedenih istraživanja, kojom je utvrđeno da ispitivani spojevi pokazuju batokromični i/ili hipokromični efekt poslije vezivanja na molekulu CT-DNA rastuće koncentracije, što je vidljivo na grafovima ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini. Gornjim je grafičkim prikazima kvantificiran hipokromični efekt pri različitim koncentracijama CT-DNA, u odnosu na apsorbanciju samog lijeka pri označenom maksimumu emisije. Rezultati eksperimenata ukazali su kako sintetizirani spojevi imaju različite „mete“, kada je u pitanje vezanje na ovu biološku makromolekulu. Naime, iako se više spojeva pokazalo kao snažni interkalatori, samo neki su ulazili u stanicu i lokalizirali se u jezgri, dok su se drugi uglavnom zadržavali u staničnoj citoplazmi, sugerirajući da molekula DNA ipak nije njihova primarna „meta“. Tako, primjerice, dimetil-*N*-piperazinil supstituirani spoj nema mogućnost ulaska u stanicu čime posjeduje malu aktivnost kod stanične proliferacije, dok je uočeno kako su određeni fluorescentni spojevi citotoksični za ispitivane stanične linije ili, pak, lokalizirani u citoplazmi. [8]

2.1.4. Biološka aktivnost i antitumorsko djelovanje derivata benzimidazola

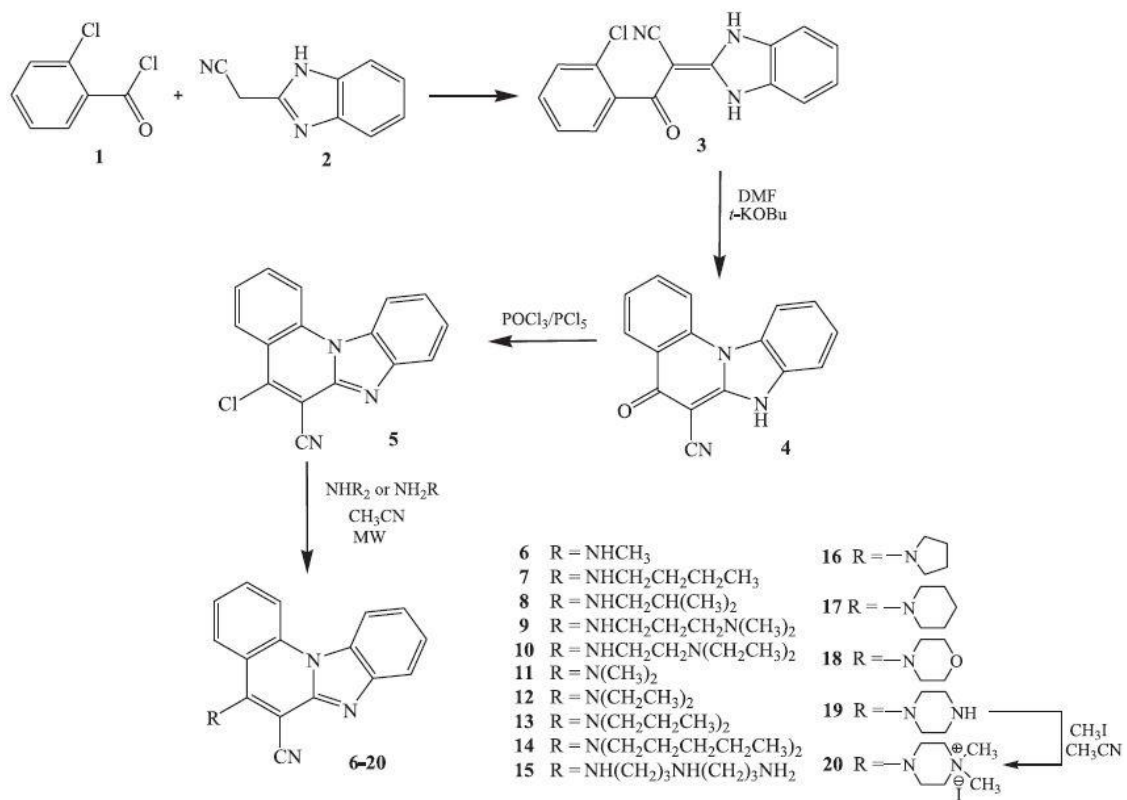
Derivati benzimidazola, poput bioaktivnih prirodnih produkata, kao i brojni sintetski kemijski i biokemijski agensi [7], poznati su po svojim različitim biološkim [9], kemijskim i farmakološkim svojstvima [7], što objašnjava sve veći interes znanstvenika usmjeren prema njihovoj sintezi. [9] Naime, postoji strukturna sličnost između ove heterocikličke jezgre i prirodnih nukleotida bioloških makromolekula, čime njihovi derivati imaju ključnu ulogu u djelovanju spojeva prisutnih u živim organizmima ili, pak, u interakciji s istima, poput DNA, RNA ili proteina. [7] Deoksiribonukleinska kiselina ciljano je najbitnija biološka makromolekula kod razrada strategija razvoja novih lijekova koji bi, prvenstveno, bili usmjereni liječenju zloćudnih bolesti poput raka. S ciljem dobivanja selektivnijih antitumorskih agensa, nužno je razumijevanje temeljnih spoznaja o molekulskim interakcijama malih heteroaromatskih organskih molekula s DNA. [9] Većina kemoterapeutskih agensa uključuje molekule poput interkalatora, alkilirajućih agensa ili „groove bindersa“ koje upravo mogu stupiti u interakciju s DNA. Organski interkalatori čine skupinu policikličkih aromatskih spojeva, obično sastavljenih od planarnih i kondenziranih aromatskih i heteroaromatskih prstenova, koji se mogu umetnuti ili interkalirati između dvaju susjednih parova baza dvostruke uzvojnice DNA. [7] Toj skupini pripadaju i kondenzirani derivati benzimidazola, koji imaju sposobnost interkaliranja između susjednih parova baza deoksiribonukleinske kiseline uslijed posjedovanja visoko konjugiranih planarnih kromofora [9] te inhibicije njezine biosinteze. S druge strane, visoki intenzitet fluorescencije i izvrsne spektroskopske karakteristike čine ih posebno prikladnima kod detekcije biološki važnih molekula ili proteina u postupcima medicinske dijagnostike. Tome dodatno doprinosi i prisutnost kinolinskog prstenastog sustava kod velikog broja alkaloida te sintetskih analoga različitog biološkog djelovanja. Kinolinski derivati benzimidazola pokazali su se obećavajućim tetracikličkim interkalatorima kroz studije njihovih bioloških aktivnosti, koje uključuju citostatsku procjenu, interakciju DNA/RNA, inhibiciju topoizomeraze I i II i proteomsko profiliranje. [7] U tu su svrhu na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta provedena brojna istraživanja na temu potencijalne biološke aktivnosti novosintetiziranih spojeva benzimidazola, podijeljenih u nekoliko grupa – pozitivno nabijene amidino supstituirane benzimidazo[1,2-*a*]kinoline i njihove heteroaromatske analoge te svestrane benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrile. Sposobnost interkalacije unutar dvolančanih zavojnica DNA i RNA pokazala se glavnim indikatorom potencijalnog antitumorskog djelovanja ovih spojeva, prvenstveno pozitivno nabijenih amidino supstituiranih analoga benzimidazo[1,2-*a*]kinolina,

konkretno 2-imidazolinil-supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina. Navedeni spojevi pokazali su naglašenu selektivnost prema tumorskim stanicama debelog crijeva. Međutim, nenabijeni ili pozitivno nabijeni diamino supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolini samo djelomično interkaliraju s DNA ili, pak, dolazi do njihove aglomeracije duž dvostrukog DNA heliksa. Analizom spomenutih spojeva pomoću fluorescentne mikroskopije utvrđena je njihova citoplazmatska raspodjela koja ukazuje na činjenicu da sama molekula DNA primarno nije ciljana molekula njihove biološke aktivnosti.

Supstitucijom benzimidazo[1,2-*a*]kinolina s jezgrama piperidina, pirolidina te piperazina, proučavana su njihova spektroskopska svojstva, s naglaskom na intenzitet fluorescencije u prisutnosti ct-DNA. Značajno povećana fluorescencijska emisija ovih spojeva opravdava njihovu potencijalnu primjenu kao fluorescentnih probi specifičnih za detekciju DNA. Nadalje, istraživanja su bila usmjerena i prema ispitivanju utjecaja duljine amino lanaca supstituenata na promjenu interkalacijskih puteva u odnosu na dosadašnje puteve interkalacije, pri čemu su svi ispitivani spojevi pokazali visoko citotoksično djelovanje naspram nekolicine linija ljudskih tumorskih stanica. 6-(1-piperidil)-etilamino supstituirani derivat s najduljim bočnim lancem pokazao je najveću aktivnost u odnosu na ljudski osteogen sarkom MG-63 u nanomolarnoj koncentraciji, IC_{50} 30 nM.

Također, studije su pokazale kako alkilaminski supstituenti, bilo ciklički ili aciklički, povećavaju antitumorsku aktivnost ovih spojeva, u usporedbi s prije ispitivanim nitro i amino supstituiranim benzimidazo[1,2-*a*]kinolinima. [9]

Tijek reakcije sinteze amino supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina predložen je Slikom 6.



Slika 6. Sinteza amino supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina [8]

2.2. Onečišćenja u lijekovima

2.2.1. Klasifikacija onečišćenja



Slika 7. Shematski prikaz kategorizacije farmaceutskih onečišćenja (prilagođeno prema referenci [10])

Slikom 7. shematski je prikazana literaturna podjela najčešćih potencijalnih onečišćenja koja se mogu pronaći u farmaceutskim spojevima. Za organska je onečišćenja zanimljivo kako mogu biti podrijetlom ili iz samog procesa, ili ispitivanog spoja. Dakle, izvor njihova nastanka je bilo proces proizvodnje ili, pak, proces skladištenja nosintetiziranog spoja. Takva onečišćenja mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapiva ili nehlapiva, a dijele se na spojeve kako je dano shemom na prethodnoj slici.

Anorganska onečišćenja rezultat su proizvodnog procesa te su obično poznata i identificirana.

Otapala su anorganske ili organske kapljevine koje se koriste kao sredstva za pripremu otopina ili suspenzija korištenih u sintezi novih farmaceutski aktivnih supstanci. Zbog svoje obično poznate toksičnosti, njihov je odabir relativno jednostavan.

Uz prethodno sistematizirana, u nosintetiziranim spojevima moguća su i neka druga onečišćenja. Ona mogu uključivati slučajna vanjska onečišćenja, polimorfne oblike, kao i enantiomerna onečišćenja. [10]

2.2.2. Razlozi praćenja i kontrole onečišćenja [10]

2.2.2.1. Organska onečišćenja

Proces praćenja svih onečišćenja, pa tako i organskih, u novosintetiziranim farmaceuticima zahtjeva sistematizaciju stvarnih te potencijalnih onečišćenja do čije pojave može doći tijekom sinteze, pročišćavanja ili skladištenja novih lijekova. Prethodno proizlazi iz analize samog sustava – kemijskih reakcija sinteze, onečišćenja vezanih uz polazne sirovine koja bi mogla utjecati na pripadajuće profile onečišćenja kod gotovih lijekova te mogućih razgradnih produkata. Potrebno je skupiti i dokumentaciju o prethodnim studijama provedenima na temu prisutnosti onečišćenja u dotičnom farmaceutiku. Ta bi dokumentacija trebala sadržavati rezultate testiranja šarži dobivenih tijekom procesa razvoja farmaceutika, kao i onih poteklih iz predloženog komercijaliziranog procesa. Na to se upravo nadovezuju ispitivanja stabilnosti te prisilne razgradnje novodobivenog spoja do koje bi moglo doći tijekom procesa skladištenja. Bitno je profile onečišćenja dobivene iz predloženog komercijaliziranog procesa usporediti s onima iz procesa istraživanja i razvoja farmaceutika.

Nadalje, poslije provedbe studija karakterizacije strukture stvarno prisutnih onečišćenja u novosintetiziranom spoju potrebno je njihovu koncentraciju usporediti s identifikacijskim pragom. Ukoliko koncentracija prisutnog onečišćenja iz bilo koje šarže proizašle iz predloženih komercijaliziranih procesa, nadilazi prag identifikacije, potrebno ju je dokumentirati. Dapače, navedeno je nužno učiniti za sva prisutna onečišćenja. Neovisno je li provedbom ovakvih studija uspješno kvantificirana prisutna količina onečišćenja ili ne, primjerice uslijed prisutne koncentracije koja ne prelazi razinu detekcije, neophodno je rezultate dobivenih eksperimenata dokumentirati. Međutim, identifikacija takvih onečišćenja u tragovima nije nužna, izuzev slučajeva kod kojih može doći do njihovog potencijalno snažnog toksičnog i farmakološkog utjecaja pri danoj koncentraciji.

2.2.2.2. Anorganska onečišćenja

Detekcija te kvantifikacija anorganskih onečišćenja obično se provodi korištenjem farmakopejskih ili drugih metoda. Mogućnost prijenosa katalizatora s ciljem primjene na novosintetiziranom spoju procjenjuje se tijekom procesa razvoja lijekova, dok se kriterij prihvatljivosti temelji na određenim farmakopejskim standardima ili poznatim sigurnosnim podacima.

2.2.2.3. Otapala

Tijekom proizvodnog procesa postoji i mogućnost zaostajanja suviška otapala na ispitivanoj aktivnoj farmaceutskoj supstanci. Procesi praćenja i kontrole ovakvih onečišćenja dani su u standardiziranim vodičima i smjernicama specifičnima upravo za ostatna otapala.

2.3. Prisilna razgradnja [11]

Sintezu aktivnih farmaceutskih supstanci slijedi ispitivanje stabilnosti novodobivenih spojeva u uvjetima u kojima bi se oni našli poslije proizvodnje, odnosno tijekom njihova skladištenja ili primjene. Ovime se želi prevenirati potencijalno nastajanje nusprodukata razgradnje čije djelovanje može biti ne samo neterapeutsko, već i toksično. Stoga postoje propisani analitički postupci ispitivanja degradacijskih procesa sintetiziranih farmaceutika u svrhu procjene njihove stabilnosti u određenim okolišnim uvjetima. Preliminarne studije razgradnje farmaceutskih supstanci daju korisne informacije koje se kasnije mogu primijeniti u razvoju metoda za indiciranje stabilnosti, korištenih tijekom kliničkih studija. Dostupne regulatorne smjernice koje se mogu naći u studijama o razgradnim procesima daju brojne korisne, no uglavnom općenite informacije, u kojima često nije specificiran točan opseg, vrijeme i najbolja metoda ispitivanja razgradnje konkretnog spoja. S obzirom da vjerojatnost razgradnje određenog spoja ovisi o njegovoj stabilnosti, uglavnom se govori o razinama identifikacije razgradnih produkata, stabilnosti mješavina različitih spojeva, stereokemijskoj stabilnosti, polimorfizmu i kristalnim oblicima te bilanci tvari, dok se samo pronalaženje rješenja u kontekstu degradacijskih procesa isključuje. Općenito, kod razumijevanja razgradnih procesa, potrebno je uzeti u obzir i krajnje slučajeve kod kojih je određen spoj, primjerice, slabo topljiv ili je, pak, iznimno stabilan, što ukazuje na važnost specificiranja dopuštene razine primjene stresa u procesima prisilne razgradnje. Naime, primjena ekstremnih ispitnih uvjeta na spoj nije rješenje jer takvi okolišni uvjeti vjerojatno nisu realni niti reprezentativni tijekom skladištenja ili su irelevantni za sam razvoj metode. Dakle, ključna je razina primjene sile (stresa), a ne nužno vrijeme izlaganja eksperimentalnim uvjetima razgradnje.

U slučaju postojanja malog broja poznatih podataka o potencijalnim razgradnim produktima određenog spoja, najčešće se pristupa provedbi postupka prisilne (forsirane) razgradnje ili testiranja na stres. Ovime je moguće prikupiti specifične informacije o spoju prije razvoja metoda za ispitivanje stabilnosti, kao i željene spoznaje o putovima razgradnje te potencijalnim razgradnim produktima, do čije pojave može upravo doći tijekom procesa

skladištenja. Studije imaju i veliki značaj kod opisivanja kemijskog ponašanja lijeka tijekom njegova istraživanja i razvoja, odnosno razvoja formulacije te proizvodnje, što u konačnici skraćuje put od sirove aktivne farmaceutske supstance do konačnog proizvoda.

2.4. Regulatorne smjernice za provedbu postupaka prisilne razgradnje

S ciljem razvoja i validacije metoda za procjenu stabilnosti, određivanja razgradnih puteva farmaceutika te nastalih razgradnih produkata, prepoznavanja produkata razgradnje u formulacijama srodnima ispitivanoj supstanci naspram onima u sklopu pomoćnih tvari, kao i dobivanja informacija o strukturi ili intrinzičkoj molekularnoj stabilnosti, primjenjuju se postupci s točno definiranim stupnjevima. Ovi koraci uključuju provođenje uglavnom šaržnih procesa u otopini i/ili u čvrstom stanju, gdje se u, danom mediju, analiziraju mehanizmi hidrolitičke, oksidacijske, termalne ili fotolitičke razgradnje, uz primjenu ekstremnijih uvjeta od onih kod ubrzanog testiranja (primjerice pri temperaturi od 40 °C, relativnoj vlazi od 75 %, u uvjetima visokog ili niskog pH, prekomjernog svjetlosnog zračenja, oksidacije i drugog).

Prilikom njihove registracije, Američka agencija za hranu i lijekove zahtjeva određene postupke provedbe studija razgradnje farmaceutski aktivnih supstanci. Oni uključuju: podvrgavanje mase tvari u krutom stanju intenzivnijim pojedinačnim ili kombiniranim uvjetima temperature i vlage u odnosu na iste kod uvjeta ubrzane razgradnje; podvrgavanje ispitivane tvari u otopini ili suspenziji kiselim, alkalnim ili oksidacijskim uvjetima; izolaciju i/ili potpunu karakterizaciju strukture, po mogućnosti, svih značajnih razgradnih produkata pomoću instrumentalnih analitičkih metoda poput spektrometrije masa, nuklearne magnetske rezonancije ili UV analize. Nadalje, potrebno je dobiti informacije vezane i uz mehanizme i kinetičke profile formiranja, optimalno, svakog razgradnog produkta; fotolitičku razgradnju krutog lijeka ili otopljenog u otopini, izloženog ICH uvjetima; ili, pak, fizikalno-kemijsku karakterizaciju razgradnih produkata.

Ukoliko se, međutim, govori o postupcima za testiranje razgradnih produkata, onda oni trebaju uključivati: njihovu izolaciju, karakterizaciju kemijske strukture i identifikaciju te pročišćavanje, kao i opisivanje reakcija u mehanizmu nastajanja konkretnim redoslijedom. Ako je moguće, navode se i fizikalna i kemijska svojstva nastalih spojeva, a prikupljanje ovih informacija treba se vršiti neovisno radi li se o čistim razgradnim produktima ili onima iz pomoćnih tvari, odnosno tvari dobivenih ekstraktivnom razgradnjom. Ključno je doći i do

spoznaja o razlikama između razgradnih produkata podrijetlom iz aktivnih farmaceutskih supstanci ili onih dobivenih iz spojeva koji to nisu. Sukladno ispitivanjima na polaznom spoju, i na produktima razgradnje potrebno je provesti fotolitičke analize poput izlaganja produkata uvjetima suviška ICH svjetlosti. [11]

Gore opisani predloženi postupci analize spojeva sumirani su donjom tablicom.

Tablica 2. Generalni protok provedbe studija prisilne razgradnje aktivnih farmaceutskih supstanci i njihovih razgradnih produkata [11]

| Eksperimentalni uvjeti | Aktivna farmaceutska supstanca | | Razgradni produkti | |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| | Krutina | Otopina/suspencija | Krutine (tablete, kapsule, mješavine) | Otopine (IV, oralne suspencije) |
| Kiselina/baza | | + | | - |
| Oksidans | - | + | + | + |
| Fotostabilnost | + | - | + | + |
| Termalna razgradnja | + | | + | + |
| Kombinacija temperature i vlage | + | | + | |

Slikom 8. dan je uvid u raznolika područja primjene metoda prisilnog testiranja farmaceutika (testiranja na stres).



Slika 8. Uloge primjene metoda prisilnog testiranja u različitim područjima farmaceutske industrije (prilagođeno prema referenci [12])

Poslije odabira ciljanog područja za provedbu prisilne razgradnje, slijedi realizacija odabrane metode. Uz dobro poznate instrumentalne analitičke metode, za provedbu ovakvih studija, ključno je poznavanje i uvjeta prisilne razgradnje u kojima određeni spojevi imaju tendenciju podlijevanja određenim razgradnim putevima uslijed vlastite nestabilnosti. Dakle, neovisno o području primjene, neophodno je specificirati vrstu primijenjene sile, vrijeme i doseg provedbe testiranja, a sve s ciljem simuliranja što realnijih uvjeta u kojima bi se spojevi mogli potencijalno naći. Kao što je već spomenuto ranije u ovom radu, nepotrebno izlaganje farmaceutika ekstremnim uvjetima može samo dovesti do nekontrolirane razgradnje ili, pak, uzrokovati nastajanje sekundarnih razgradnih produkata koji u realnim okolišnim uvjetima ili onima kod analiza ubrzane razgradnje ne bi ni nastali. S druge strane, primjena premale sile za rezultat daje neadekvatnu razgradnju ispitivanog spoja. Na prethodno se nadovezuje i preporuka da se spojevi manjih molekulskih masa izlažu oksidativnom ili drugom testiranju na vrijeme od 24 sata te 14 dana, kako bi se doseglo 5 do 20 % razgradnje dovoljne za razvoj pojedine metode za procjenu stabilnosti. [12]

2.5. Analitičke metode primijenjene u procesima prisilne razgradnje

Analitičke metode primijenjene u procesima prisilne razgradnje trebale bi indicirati na stabilnosti spoja, omogućavajući njezino praćenje tijekom faze istraživanja i razvoja farmaceutskih dozirnih oblika. Plasiranjem lijeka na tržište, iste metode primjenjuju se u svrhu kontinuiranog praćenja i provođenja studija stabilnosti. U cilju pružanja informacija o vremenskom utjecaju različitih okolišnih uvjeta (temperature, vlažnosti i svjetla), procjenjivanja vijeka trajanja te preporučenih uvjeta skladištenja, moguće je razviti metode kojima će se kvantificirati količina preostalog lijeka i/ili količina lijeka koja se razgradila uz pojavu razgradnih produkata. [13]

Postupak profiliranja nečistoće započinje detektiranjem nečistoća pomoću tankoslojne kromatografije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti ili plinske kromatografije. Standardni uzroci nečistoća, dostavljeni od strane organskih kemičara, uključuju posljednji intermedijer sinteze, produkte predvidljivih sporednih reakcija, produkte razgradnje ukoliko ih ima i slično. U slučaju neuspjele identifikacije sa standardnim uzorcima, najprimjereniji način određivanja strukture nečistoće započinje ispitivanjem UV spektra, lako dobivenih pomoću HPLC-a s nizom dioda i kvantificiranih pomoću denzitometra. U izuzetnim slučajevima, uz potpuno znanje o sintezi lijekova, struktura nečistoće može se generirati na osnovi spektralnih podataka NMR-a. [14]

2.5.1. Kromatografija vezana na spektrometre masa kao detektore

U slučaju kada podatci dobiveni iz UV spektara nisu dovoljni, idući korak u postupku profiliranja nečistoće snimanje je njezina spektra masa. Općenito, razvoj metode obično zahtijeva odabir nepokretne i pokretne faze, detektora ili, pak, metoda kvantifikacije. Razvoj metode može biti potaknut nekim od narednih čimbenika: netočnost postojeće metode, sklonost onečišćenju ili nepouzdanost (slaba točnost ili preciznost). Postojeća metoda može biti preskupa, dugotrajna, energetska gledano zahtjevnija ili teška za automatizaciju. Nadalje, postojeće metode možda ne daju odgovarajuću osjetljivost ili selektivnost u uzorcima od interesa. [14]

Spektroskopske tehnike poput nuklearne magnetske rezonantne spektrometrije (NMR), spektrometrije masa (MS), spektrofotometrije u bliskom infracrvenom području (NIR), Raman spektroskopije, infracrvene (IR) spektrofotometrije te ultraljubičasta i vidljiva (UV-

Vis) spektrofotometrija, često se kombiniraju sa separacijskim metodama, u svrhu postizanja što boljih rezultata te uvida u strukturu samog onečišćenja. Neke od tih tehnika uključuju parove metoda: plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS), tekućinska kromatografija – spektrometrija masa (LC-MS i LC-MS/MS), kapilarna elektroforeza – spektrometrija masa (CE-MS), tekućinska kromatografija – nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija (HPLC-NMR). [15]

Konkretno, metoda korištena u ovom radu je tekućinska kromatografija vezana na spektrometriju masa s vremenom preleta (LC/ESI-QTOF).

2.6. Toksičnost

Vrlo važna tema u toksikologiji je potraga i procjena *in vitro* i *in vivo* modela koji su prediktivni za štetne učinke koje kemikalije mogu imati na ljude, kada su izloženi njima. [16] Upravo su ekotoksikološke metode usredotočene na istraživanje štetnih učinaka kemikalija (akutnih i kroničnih), kao i opasnosti od njihovih svojstava, poput kancerogenosti, mutagenosti, zapaljivosti, eksplozivnosti ili, pak, nagrizajućeg djelovanja, koje se može javiti kod određene koncentracije. Bioluminiscentna metoda DIN 38412-L34 koristi luminescentna svojstva bakterija, konkretno *Vibrio fischeri*, a pripada testovima kratkog trajanja, kod kojih je trajanje do 30 min. Rezultati dobiveni ovakvim testovima mogu se prikazati grafički, pri čemu se na os ordinatu stavlja postotak inhibirane kulture u danom vremenu, a na os apscisu logaritam koncentracije otopine određenog zagađivala. [17]

Narednom je jednadžbom prikazan način izračuna jedinice toksičnosti (*TU*), iz vrijednosti masene koncentracije koja uzrokuje 50% inhibicije bakterijske kulture (EC_{50}):

$$TU = 100 \cdot (EC_{50})^{-1}$$

Nadalje, iz tako dobivenog grafičkog prikaza moguće je očitati i vrijednost masene koncentracije koja uzrokuje 20% inhibicije bakterijske kulture, kao i vrijednost najniže koncentracije koja izaziva vidljiv štetni učinak (*LOEC*). [17]

Ova bakterija pripada gram-negativnim bakterijama, nađenim u morskom okolišu, koje u njemu mogu obitavati samostalno ili u simbiozi s određenim vrstama liganja i riba. Informacije o poznavanju metaboličkih puteva ove bakterije te njezina utjecaja na

kolonizaciju domaćina, bitne su kao i one vezane uz rast i preživljavanje slobodno obitavajućih bakterija. [18]

2.6.1. Računalni softveri za procjenu toksičnosti

Procjena toksičnosti kemijskih supstanci moguća je i primjenom odgovarajućih računalnih softvera, čija je uloga i određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava temeljem molekulske strukture. Procijenjene vrijednosti toksičnosti i fizikalnih svojstava mogu se koristiti za pružanje podataka potrebnih za poboljšanje održivosti dizajna kemijskih procesa (koristeći algoritme poput *Waste Reduction Algorithm*) ili za odabir zelenijih otapala (primjerice softver *Paris III*). [19]

2.6.1.1. TEST (*Toxicity Estimation Software Tool*)

Korištenjem raznolikih QSAR metodologija, računalni program TEST omogućava korisniku da procjeni toksičnost bez potrebe za upotrebom ikakvih vanjskih programa. Korisnik ima mogućnost unosa kemijske tvari koju procjenjuje njezinim crtanjem u pripadajući prozor kemijske skice, unosom strukture u obliku tekstualne datoteke ili uvozom iz uključene baze podataka. Također, vrijedi napomenuti da program ne zahtijeva molekularne deskriptore iz vanjskih softverskih paketa, to jest svi se potrebni deskriptori izračunavaju unutar samog programa. [19]

Metodologije odnosa kvantitativne strukturalne aktivnosti (QSAR²) u suštini su matematički modeli, također poznati i kao molekularni deskriptori, koji računaju toksičnost kemikalija korištenjem jednostavne linearne funkcije:

$$\textit{Toksičnost} = ax_1 + bx_2 + c$$

gdje su x_1 i x_2 nezavisne deskriptorske varijable, dok su a , b i c fitani parametri. Molekularna masa te koeficijent razdvajanja oktanol-voda primjeri su molekularnih deskriptora. U QSAR metodologije može se, primjerice, ubrojiti hijerarhijska metoda, metoda FDA, metoda jedinstvenog modela, metoda doprinosa grupe, koncensus metoda i druge. [20]

Najčešće korištena QSAR metoda je koncensusna metoda uslijed činjenice da se njome dobivaju najtočnije predikcije. Uzimajući prosjek vrijednosti predviđene toksičnosti dobivenih hijerarhijskom i FDA metodom, kao i metodama jedinstvenog modela, modela

² engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*

doprinosa grupa te metodom najbližeg susjeda, ova metoda djeluje pod uvjetom da su predviđanja unutar odgovarajućih domena primjenjivosti.

Kod hijerarhijske metode, toksičnost za određeni upitni spoj procjenjuje se korištenjem ponderiranog prosjeka predviđanja iz nekoliko različitih modela klastera. FDA metoda djeluje na principu da se predviđanje svake ispitivane kemikalije vrši korištenjem novog modela koji odgovara kemikalijama koje su najslabije ispitivanom spoju. Svaki se model generira za vrijeme izvršavanja. U slučaju metode jedinstvenog modela predviđanja se rade korištenjem multilinearog regresijskog modela, prikladnog za ispitivani set podataka (koristeći molekularne deskriptore kao neovisne varijable). Na primjeni iste vrste regresijskog modela temelji se i metoda doprinosa grupa, međutim ovdje se kao neovisne varijable koriste molekularni fragmenti. Naposljetku, metoda najbližeg susjeda bazira se na procjeni predviđene toksičnosti uzimanjem prosjeka vrijednosti triju kemikalija ispitivanog seta koje su najslabije ispitivanoj kemikaliji.

Uz spomenute, postoje i druge metode u sklopu ovog softwera, poput metode Random forest, kod koje se predviđena toksičnost procjenjuje analizom pomoću stabla odlučivanja. Pritom su korištene varijable odluke molekularni deskriptori, a metoda je za sada primjenjiva samo u slučaju procjene razvojne toksičnosti. [21]

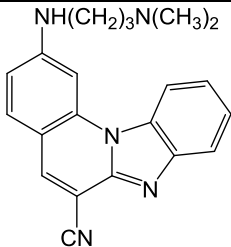
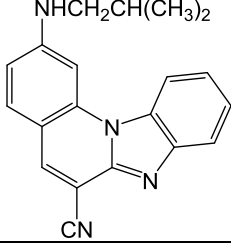
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela ovoga rada, korištene su sljedeće kemikalije, dane Tablicom 3.

Tablica 3. Kemikalije korištene prilikom provedbe eksperimentalnog dijela rada

| ID/Ime | | Formula | Proizvođač | Stupanj čistoće |
|-----------------------|---|--|-----------------------------|-----------------|
| N-1 | 2-[<i>N,N,N</i> -dimetilaminopropil-1-amino]benzimidazo[1,2- <i>a</i>]kinolin-6-karbonitril |  <chem>CN(C)CCNc1ccc2c(c1)c3ccccc3n2C#N</chem> | novosintetizirani spoj | - |
| N-2 | 2,5-Bis[(2-metilpropil)-amino]benzimidazo[1,2- <i>a</i>]kinolin-6-karbonitril |  <chem>CC(C)CNc1ccc2c(c1)c3ccccc3n2C#NCC(C)N</chem> | novosintetizirani spoj | - |
| metanol | | CH ₃ OH | J. T. Baker | HPLC |
| vodikov peroksid | | H ₂ O ₂ | Gram-mol, Zagreb (Hrvatska) | 30% (p. a.) |
| klorovodična kiselina | | HCl | Honeywell, Fluka (Austrija) | p. a. |
| natrijeva lužina | | NaOH | Gram-mol, Zagreb (Hrvatska) | p. a. |

3.1.2. Farmaceutski aktivne tvari – amino supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolini

U radu ispitivane farmaceutski aktivne tvari novosintetizirani su organski spojevi, to jest statički nabijene krutine, pri čemu je spoj N-1 u obliku sitnih žućkastih listića, molarne mase

343,4 g/mol, dok je spoj N-2 pahuljaste prirode te tamno žute boje, a molarna mu masa iznosi 314,4 g/mol.

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga



Slika 9. Analitička vaga Mettler Toledo XA105

Analitička vaga Mettler Toledo XA105 zbog svoje je preciznosti korištena prilikom vaganja 1 miligrama uzorka potrebnog za pripremu standardnih otopina. S preciznošću od 0,01 miligrama te radnim rasponom temperature od 5 do 40 °C, ova vaga može podnijeti maksimalne odvage od 120 grama. Nadalje, postoje i određena ograničenja vezana uz primjenu prikazane vage u uvjetima određene temperature i vlažnosti zraka. Relativna vlažnost zraka od 80 % maksimalna je dopuštena vrijednost vlažnosti zraka ukoliko se vaga primjenjuje na temperaturi od 31 °C. Međutim, prilikom primjene vage u uvjetima temperature od 40 °C, dopuštena vrijednost relativne vlažnosti zraka linearno se smanjuje na vrijednost od 50%. [22, 23]

3.2.2. Ultrazvučna kupelj



Slika 10. Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digital 10 P

Ultrazvučna kupelj dana Slikom 10. korištena je kod pospješivanja otapanja teško topljivih novosintetiziranih spojeva u metanolu. Volumnog kapaciteta od 3 litre te snage od 140 W, prikazana kupelj ima mjerač vremena u rasponu od 1 do 99 minuta, ugrađeni sustav grijanja unutar čeličnog kućišta koji radi u temperaturnom području između 20 i 80 °C, kao i integrirani termometar točnosti $\pm 1,5$ °C. Program koji može raditi na 10 različitih načina omogućuje precizan i reproducibilan laboratorijski rad. [24]

3.2.3. Sušionik



Slika 11. Sušionik Instrumentaria

Slikom 11. prikazan je sušionik u kojim se proveo dio eksperimentalnog postupka vezan uz termalnu razgradnju ispitivanih uzoraka. To je sušionik proizvođača Instrumentaria.

3.2.4. Suntest CPS+



Slika 12. Fotelizer Atlas Suntest CPS+

Jedan od postupaka prisilne razgradnje korišten s ciljem analitičkih ispitivanja novosintetiziranih spojeva je i fotoliza. Za tu je potrebu korišten fotolizer tipa Atlas Suntest CPS+. Ovaj uređaj svoju svrhu pronalazi prilikom testiranja promjena svojstava ispitivanih tvari, koje nastaju tijekom kratkog vremenskog razdoblja kao posljedica djelovanja Sunčeve svjetlosti, temperature i vlage. Njime se unutar nekoliko tjedana mogu simulirati promjene u svojstvima, poput blijedenja, žućenja ili promjena u krhkosti, koje se u realnom vremenu zbivaju u okolišnim uvjetima tijekom perioda od nekoliko mjeseci do više godina. Neke od specifikacija ovoga instrumenta su dimenzije 90 x 35 x 35 cm, s područjem izlaganja od 560 cm² te jednom zrakom hlađenom ksenonovom lampom snage 1500 W. Također, raspon zračenja seže od 30 do 65 W/m² pri valnoj duljini od 300 do 400 nm, dok je za valno područje od 300 do 800 nm, raspon zračenja od 250 do 765 W/m². Uz posjedovanje svjetlosnih monitora spomenutih raspona valnih duljina, uređaj radi i sa senzorom vlage u svrhu mjerenja relativne vlažnosti zraka tijekom testiranja. [25]

Uređaj se, dakle, koristi u procesima prisilne razgradnje provođenima prema ICH smjernicama u svrhu utvrđivanja sveukupne osjetljivosti materijala za potrebe razvoja metoda i/ili razjašnjenja razgradnih puteva najčešće čvrstih lijekova te otopina podložnijima procesima razgradnje. [26] Otopine ispitivanih spojeva osvjetljavane su umjetnim Sunčevim zračenjem u posudicama od kvarcnog stakla kako bi se potaknuo fotooksidacijski mehanizam slobodnih radikala te njihova fotolitička razgradnja.

3.2.5. Tekućinska kromatografija vezana na spektrometar masa (LC/ESI-QTOF)

Snimanje uzoraka nakon provedbe prisilne razgradnje provedeno je na dvodimenzionalnom UHPLC sustavu vezanom sa spektrometrom masa visoke razlučivosti. Korišten je sustav 2-D-UHPLC Agilent 1290 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) s kvarternom pumpom i kromatografskom kolonom C-18 uz detektor s nizom dioda i spektrometar masa visoke razlučivosti koji mjeri vrijeme preleta (Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF) (Slika 13). Uređaj se još sastoji od vakuumske degazera, automatskog dodavača uzorka, termostata i binarne pumpe.



Slika 13. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnih programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za QTOF B.01.04 (B84) i Chemstation.

3.3. Opis rada

3.3.1. Priprema standardnih otopina uzoraka

Standardne otopine uzoraka pripremljene su otapanjem 1,00 mg pojedinog novosintetiziranog spoja u 5 mL odabranog otapala. Kao potencijalno sredstvo za razrjeđivanje, odnosno otapalo, uzeti su acetonitril te metanol. Pritom je uočeno kako su spojevi N-1 i N-2 izuzetno teško topljivi, a njihova topljivost je veća ukoliko se kao otapalo koristi metanol. Točnije, kod uzoraka spoja N-1 metanol je bio 40%-tni, dok je za uzorke spoja N-2 korišten 100%-tni metanol. S ciljem dodatnog pospješivanja otapanja uzoraka prije njihova izlaganja postupcima prisilne razgradnje, otopine uzoraka uronjene su u ultrazvučnu kupelj.

Iz standardne je otopine pojedinog uzorka pripremljena otopina koncentracija 1 mg/L za snimanje spektrometrom masa.

3.3.2. Provedba postupaka prisilne razgradnje

3.3.2.1. Hidroliza

Hidrolitička razgradnja uzoraka ispitivana je u kiselobaznim uvjetima. Za potrebe praćenja ovog tipa prisilne razgradnje pripremljene su otopine na način da je 1 mg pojedinog uzorka, otopljenom u 2 mL odgovarajućeg otapala, dodano 500 μ L klorovodične kiseline, odnosno natrijeve lužine, koncentracije 0,5 mol/L. Svaka od pripremljenih otopina ostavljena je da stoji u mraku, na sobnoj temperaturi, kroz vremenski period od oko 6 h.

Poslije proteklog vremena od 6 h, otopine su neutralizirane s po 500 μ L natrijeve lužine u prvom slučaju, odnosno klorovodične kiseline u drugom te nadopunjene redestiliranom vodom, odnosno otapalom do oznake od 5 mL.

3.3.2.2. Oksidacija

Oksidativna razgradnja ispitivanih spojeva provedena je nad otopinama pripremljenim otapanjem 1 mg pojedinog spoja u 2 mL otapala, uz dodatak po 1 mL 10%-tnog vodikovog peroksida. Otopine su ostavljene na sobnoj temperaturi u mraku, tijekom perioda od oko 6 h, a potom su tikvice od 5 mL nadopunjene do oznake.

3.3.2.3. Termalna razgradnja

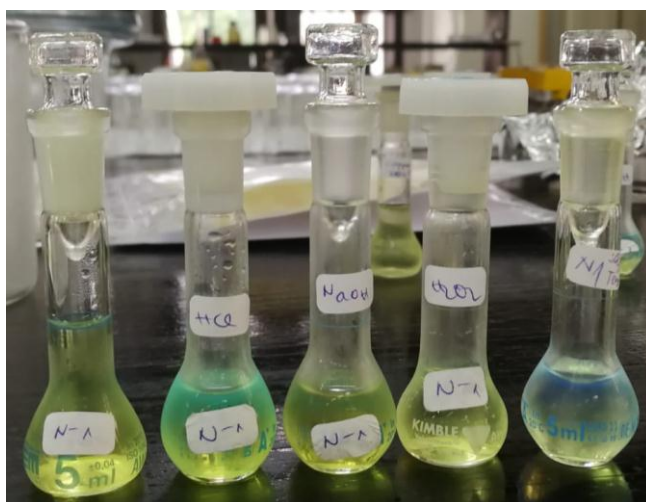
S ciljem praćenja utjecaja temperature na novosintetizirane spojeve, otopine uzoraka pripremljene su na sljedeći način. U prvom slučaju je 1 mg krutine pojedinog uzorka stavljen u sušionik na temperaturu od 100 °C, na vremenski period od 24 sata, nakon čega je uslijedilo njegovo otapanje u odgovarajućem otapalu u tikvici od 5 mL.

U drugom slučaju je 2 mL standardne otopine pojedinog uzorka, koncentracije 200 mg/L, stavljeno u vodenu kupelj na temperaturu od 80 °C, kroz vremenski period od oko 6 sati te nadopunjeno s 40%-tnim, odnosno 100%-tnim metanolom do oznake od 5 mL na tikvici.

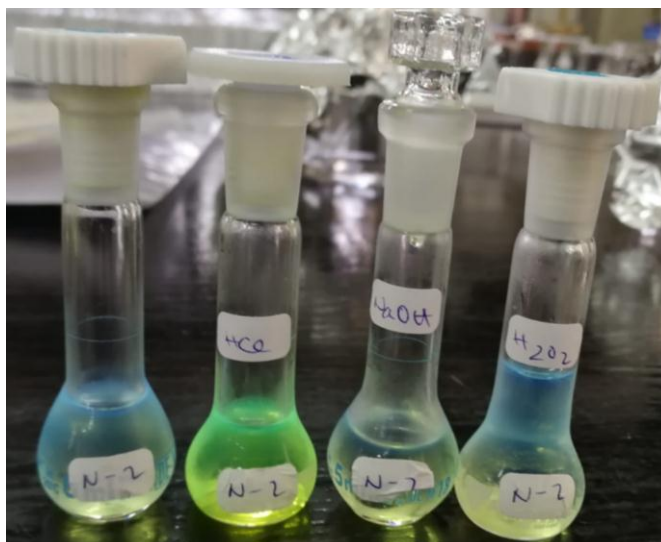
3.3.2.4. Fotoliza

Fotolitička razgradnja provedena je nad 2 mL standardnih otopina spojeva, svake koncentracije od 200 mg/L, izlaganjem pojedinog uzorka simuliranim uvjetima Sunčeve svjetlosti toplinskog toka od 500 Wh/m², tijekom vremenskog perioda od 15 sati.

Otopine spojeva nad kojima su provedeni procesi prisilne razgradnje prikazane su Slikama 14. i 15.



Slika 14. Otopine uzoraka spoja N-1 poslije procesa prisilne razgradnje



Slika 15. Otopine uzoraka spoja N-2 poslije procesa prisilne razgradnje

3.3.3. Analiza uzoraka spektrometrijom masa visoke razlučivosti

Uzorci oba spoja snimani su na spektrometru masa. Uvjeti primijenjene metode jednaki su za oba spoja te izneseni u nastavku.

Kolona je Waters aquity C18; dimenzija 100 x 2,1 mm, promjera 1.7 μm . Pokretna faza sastojala se od 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u tablici.

Tablica 4. Gradijent pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom

| Vrijeme, min | Volumen otapala A, % |
|--------------|----------------------|
| 0,00 | 90 |
| 1,00 | 90 |
| 5,00 | 40 |
| 10,00 | 40 |
| 13,00 | 15 |
| 13,01 | 90 |

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Kolona je termostatirana na 60 °C. U kolonu je injektirano 2 µL uzorka. Protok je tijekom analize iznosio 0,4 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti. Za to je potrebna 1 minuta. Uvjeti izvora iona spektrometra masa prilikom analize prikazani su u tablici.

Tablica 5. Uvjeti izvora iona spektrometra masa

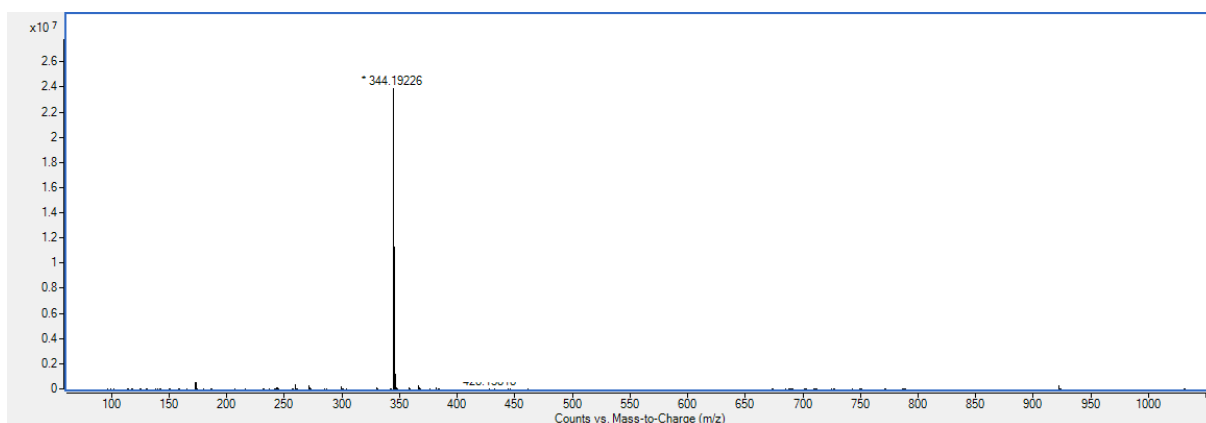
| | |
|-------------------------------|----------|
| Temperatura plina | 200 °C |
| Protok plina | 14 L/min |
| Tlak raspršivača plina | 35 psi |
| Napon kapilare | 3000 V |

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ispitivanja su provedena prema uvjetima opisanim u ICH Q1B priručniku [27]. Izvedeno je ukupno šest eksperimenata za svaki od odabranih aktivnih spojeva s ciljem ispitivanja utjecaja temperature (otopina i čvrsta tvar) i svjetla na stabilnost N-spojeva te njihovu podložnost oksidaciji, to jest kiseloj i baznoj hidrolizi.

4.1. Analiza uzoraka aktivnog spoja N-1 spektrometrijom masa

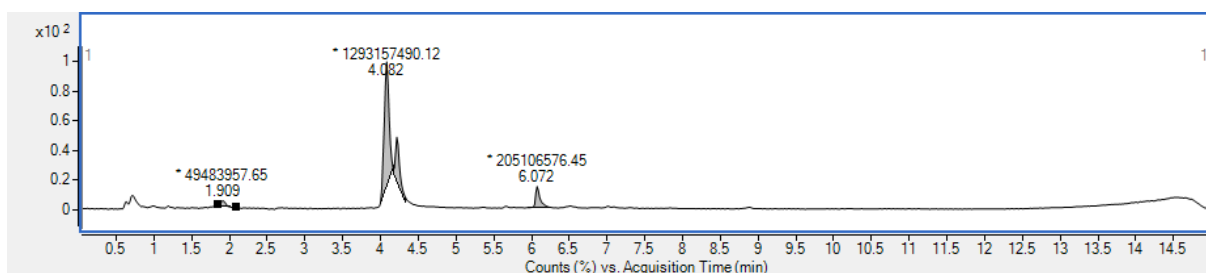
Donjom je slikom prikazan spektar masa dobiven analizom aktivnog spoja N-1, čija molarna masa iznosi 343,4 g/mol.



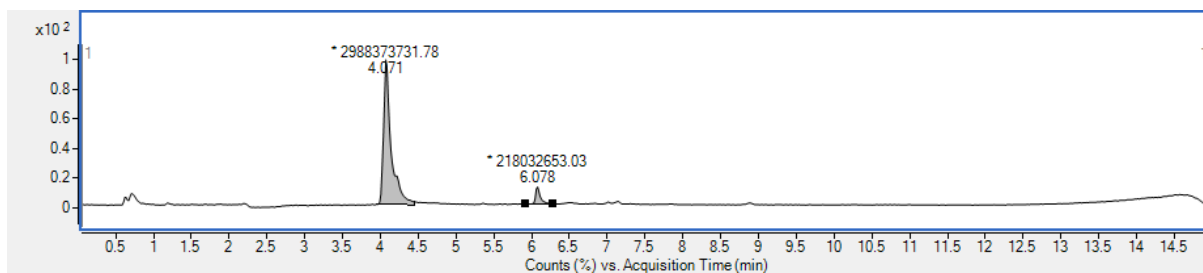
Slika 16. Spektar masa aktivnog spoja N-1

Odabrani aktivni spoj N-1 na kromatogramu se pojavljuje na vremenu zadržavanja, $t_R = 4,071$ min.

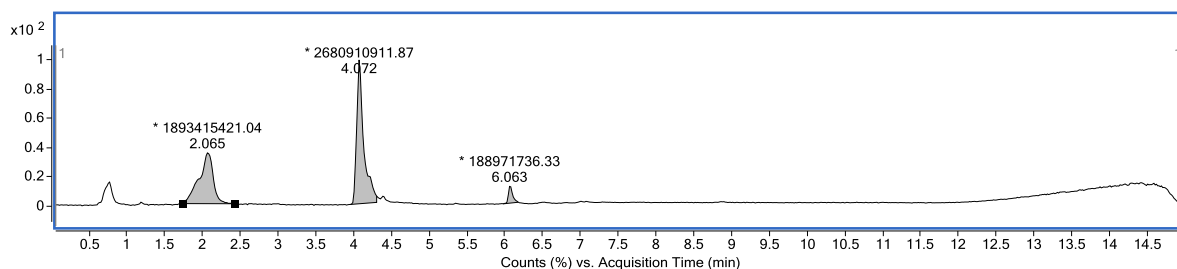
U nastavku su dani kromatogrami (Slike 17.-21.) dobiveni analizom uzoraka poslije provođenja određenog eksperimenta prisilne razgradnje.



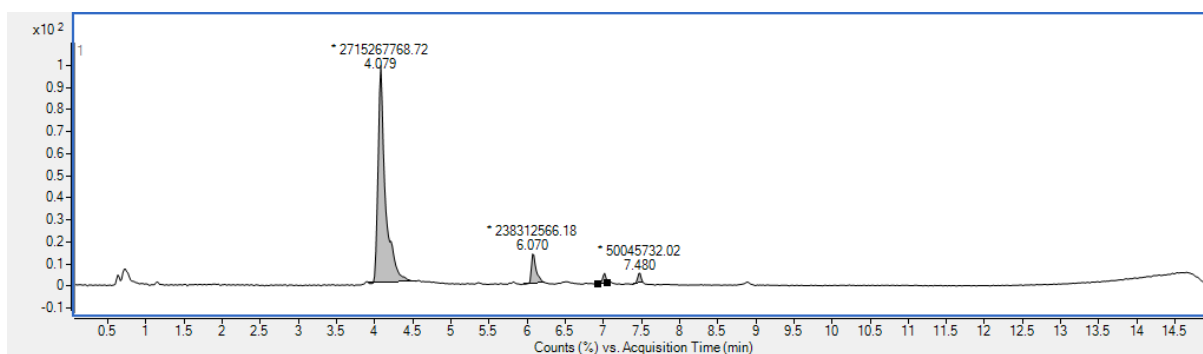
Slika 17. Kromatogram u uvjetima oksidacije peroksidom



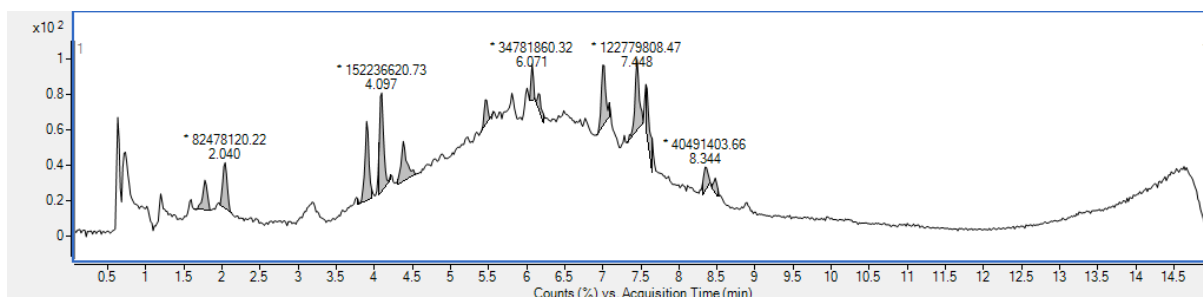
Slika 18. Kromatogram u uvjetima kisele hidrolize



Slika 19. Kromatogram u uvjetima lužnate hidrolize



Slika 20. Kromatogram u uvjetima termalne razgradnje



Slika 21. Kromatogram u uvjetima izlaganja uzorka UV-VIS zračenju

Analizom uzoraka spoja N-1 utvrđena je pojava određenog razgradnog produkta po eksperimentima prisilne razgradnje.

Kod eksperimenata oksidacijske razgradnje u prisutnosti vodikovog peroksida nastaju dva razgradna produkta ($m/z = 360$ te $m/z = 358$). Prvi od ova dva razgradna produkta nastaje s udjelom od 20,5%, a drugi s udjelom od 10,5%. Ostatak do 100% predstavlja udio nerazgrađenog spoja.

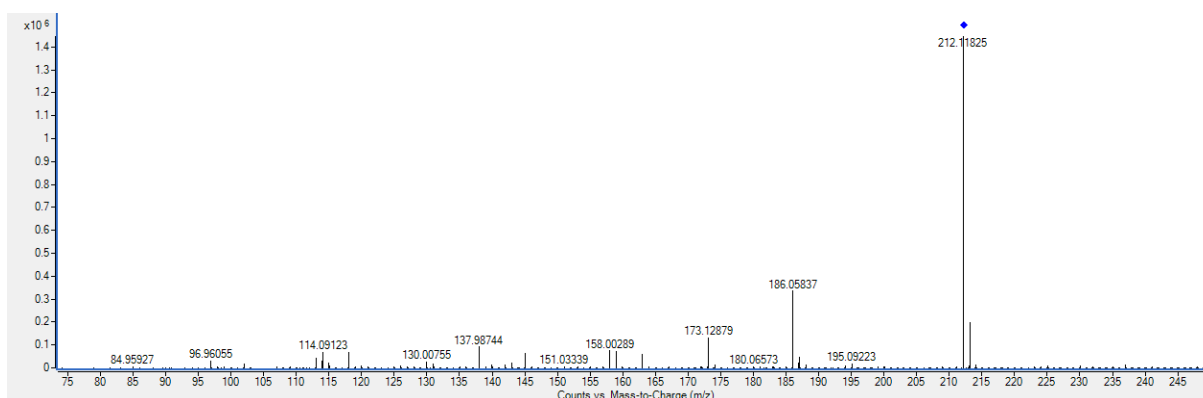
Hidrolitička razgradnja u prisutnosti kiseline i lužine iznjedrila je pojavu razgradnog produkta istog $m/z = 358$. U kiselim se uvjetima ovaj razgradni produkt javlja u udjelu od 6,8%, a u lužnatim u udjelu od 3,8%.

Termalnom razgradnjom nastaju tri razgradna produkta – razgradni produkt $m/z = 358$ nastaje u udjelu od 7,6%, razgradni produkt $m/z = 486$ nastaje s udjelom od 4,3%, dok se razgradni produkt $m/z = 405$ javlja u udjelu od 1,6%.

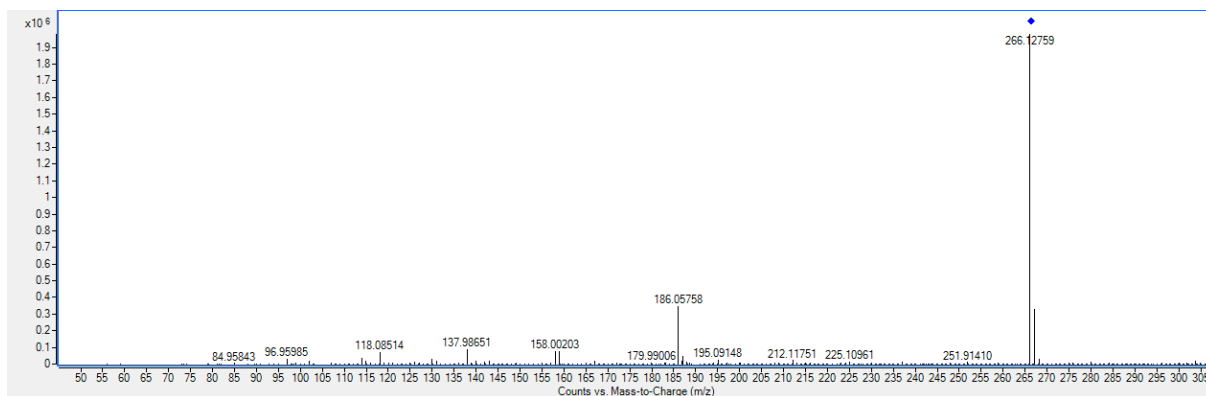
Naposljetku, najveći broj razgradnih produkata (njih 10) detektiran je u fotolitičkom eksperimentu, uz pripadajući postotak nastanka kako slijedi: $m/z = 212$ (5,7%), $m/z = 266$ (8,5%), $m/z = 340$ (13,3%), $m/z = 284$ (9,5%), $m/z = 249$ (3,7 %), $m/z = 358$ (3,6%), $m/z = 377$ (2,7%), $m/z = 486$ (11,1%), $m/z = 405$ (12,6%) te $m/z = 331$ (4,2%).

Sumarno gledajući, pojedini se razgradni produkti javljaju u više eksperimenata. Tako se, primjerice, razgradni produkt $m/z = 358$ javlja kod svih eksperimentalnih uvjeta.

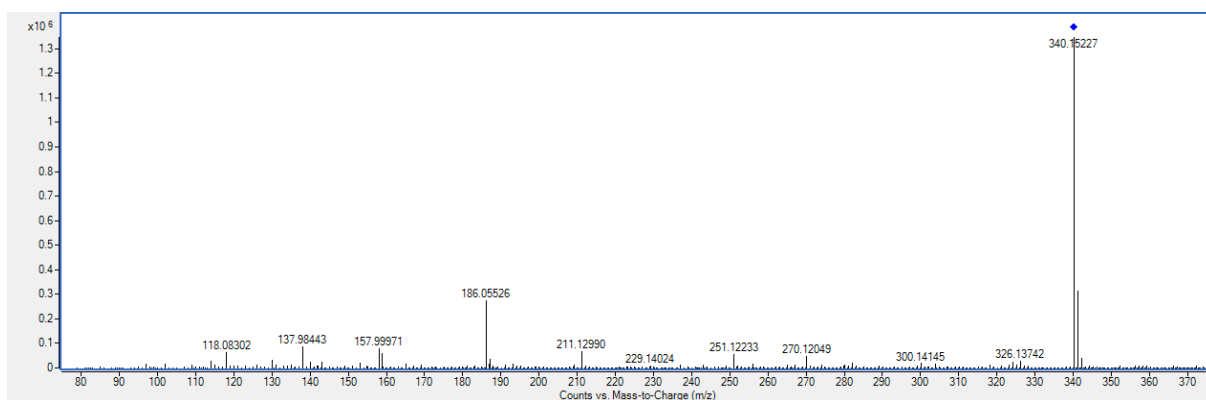
U nastavku su Slikama 22.- 32. prikazani MS/MS spektri fragmentacije razgradnih produkata odgovarajućeg m/z s pripadajućim vremenom zadržavanja, na temelju kojih su identificirane strukture pojedinog razgradnog produkta.



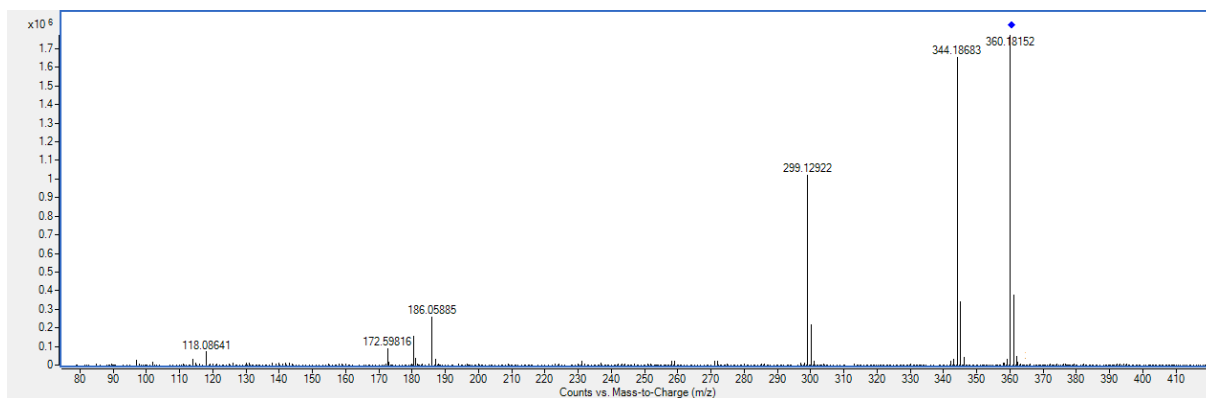
Slika 22. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 212$ s vremenom zadržavanja $t_R = 1,775$ min



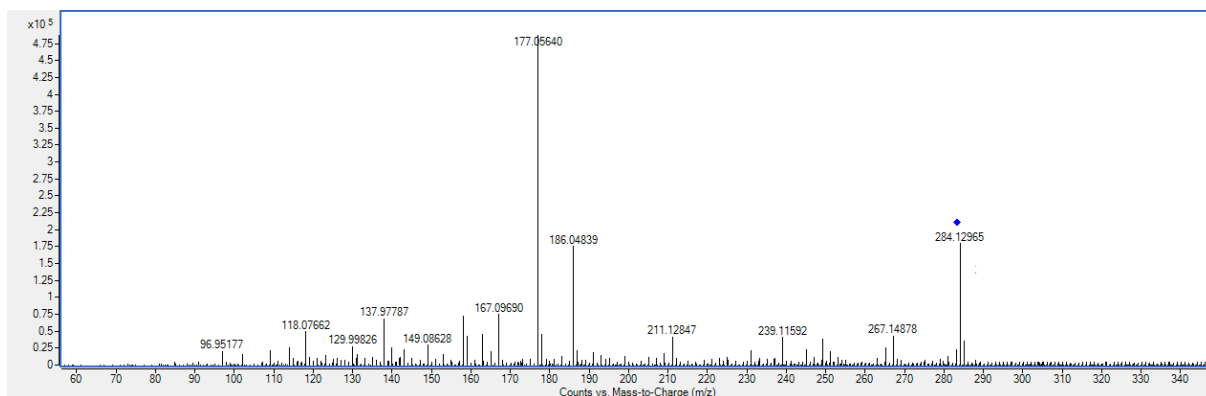
Slika 23. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 266$ s vremenom zadržavanja $t_R = 2,04$ min



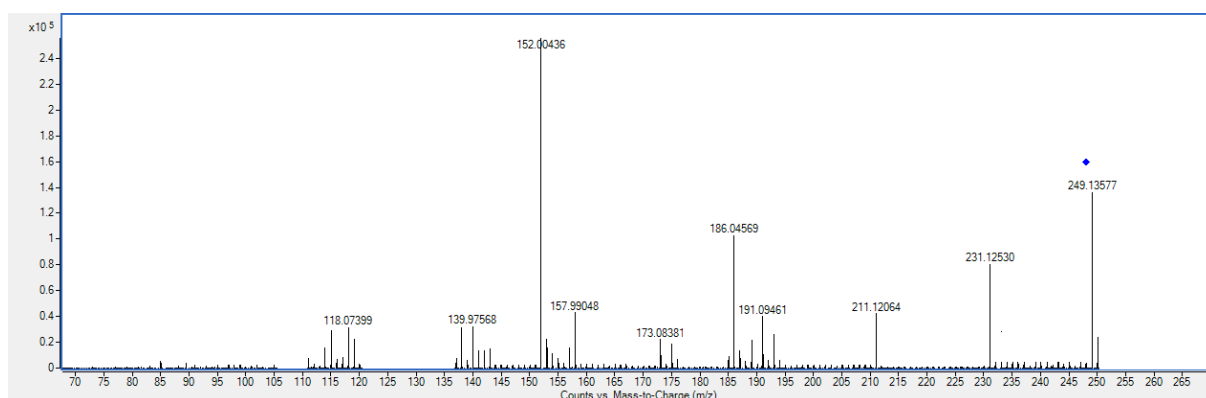
Slika 24. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 340$ s vremenom zadržavanja $t_R = 3,898$ min



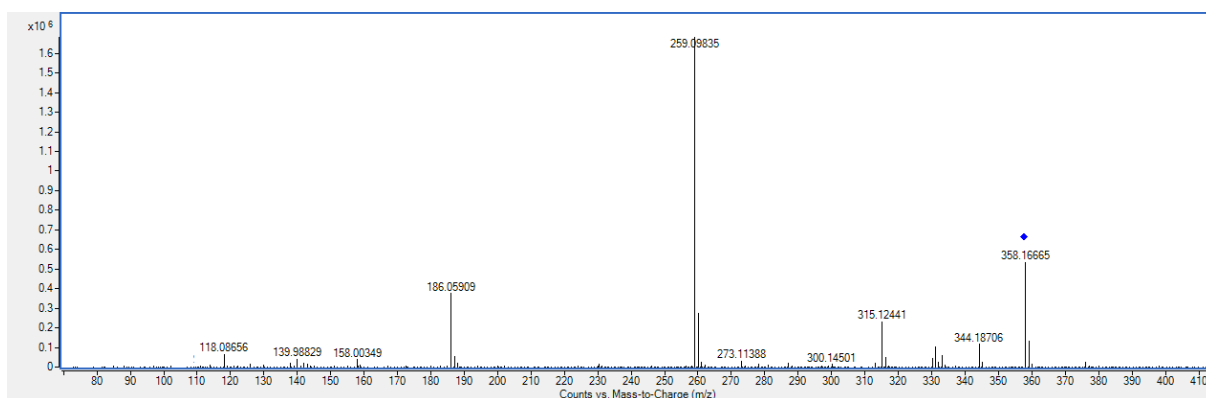
Slika 25. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 360$ s vremenom zadržavanja $t_R = 4,214$ min



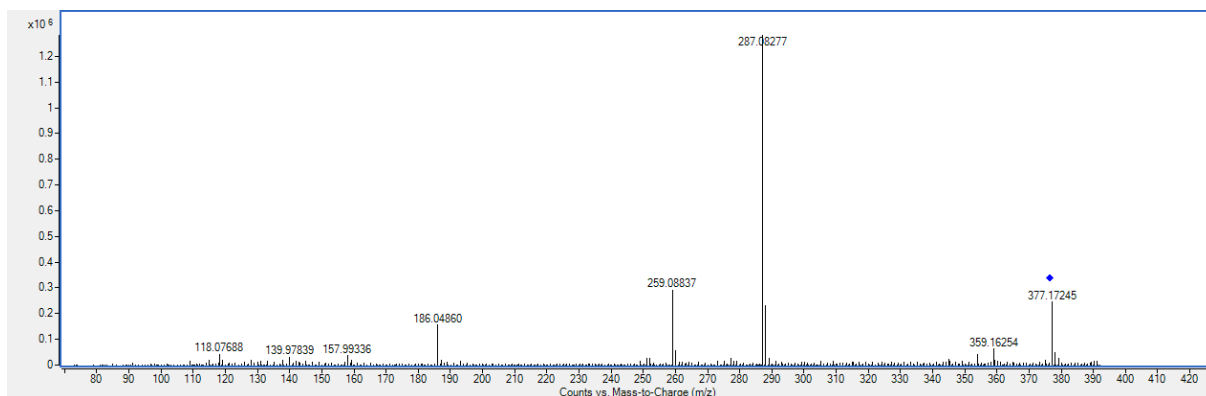
Slika 26. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 284$ s vremenom zadržavanja $t_R = 4,379$ min



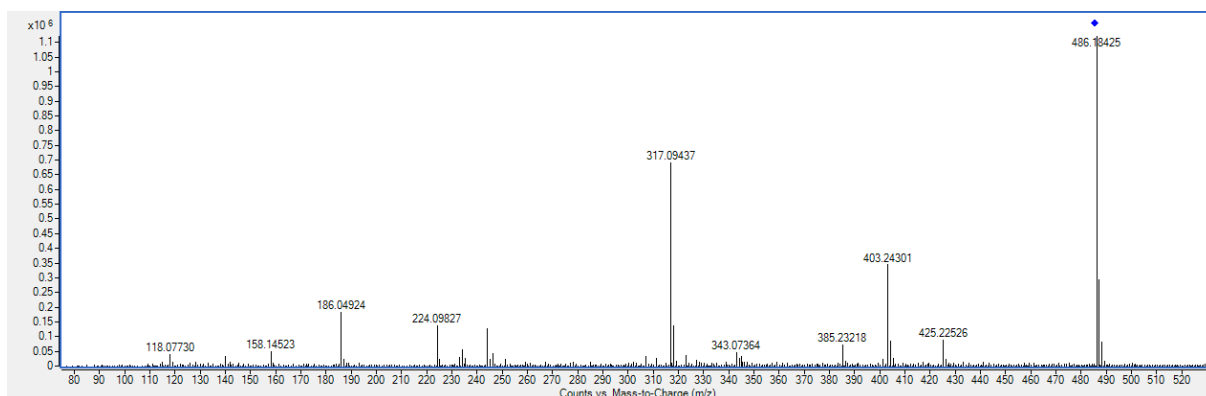
Slika 27. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 249$ s vremenom zadržavanja $t_R = 5,457$ min



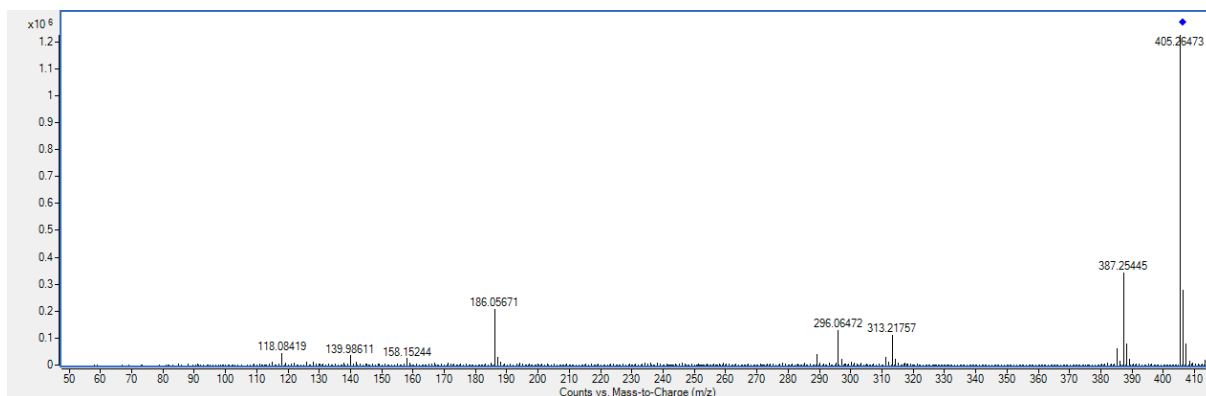
Slika 28. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 358$ s vremenom zadržavanja $t_R = 6,071$ min



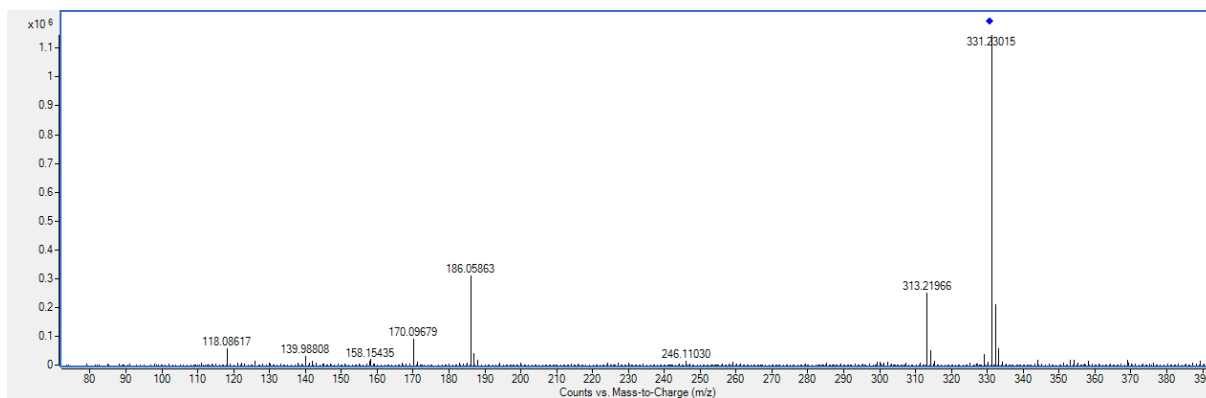
Slika 29. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 377$ s vremenom zadržavanja $t_R = 6,154$ min



Slika 30. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 486$ s vremenom zadržavanja $t_R = 7,015$ min



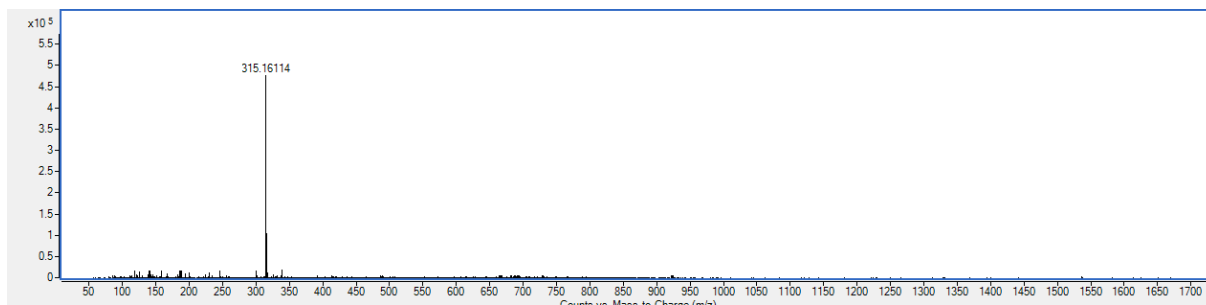
Slika 31. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 405$ s vremenom zadržavanja $t_R = 7,448$ min



Slika 32. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 331$ s vremenom zadržavanja $t_R = 8,344$ min

4.2. Analiza uzoraka aktivnog spoja N-2 spektrometrijom masa

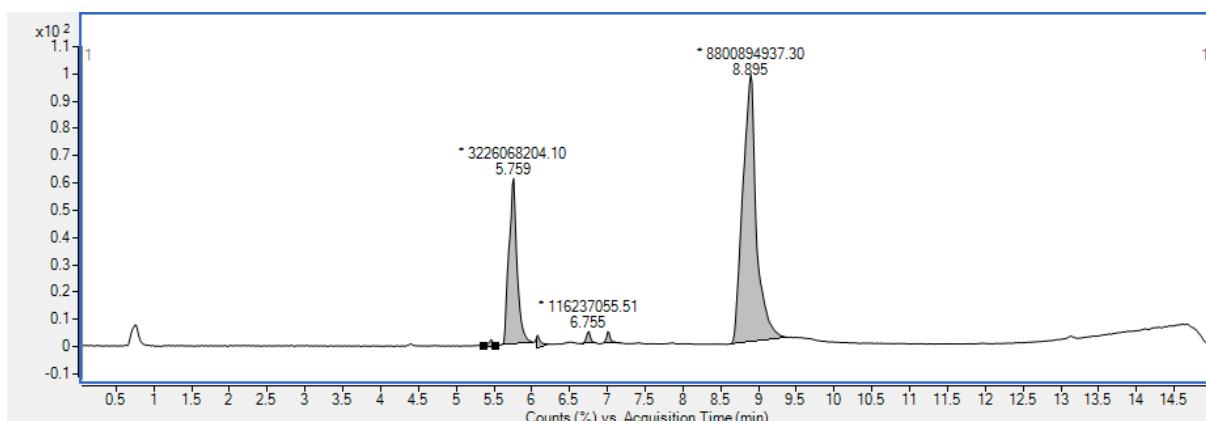
Analizom aktivnog spoja N-2, molarne mase 314,4 g/mol, na spektrometru masa dobiven je spektar dan Slikom 33.



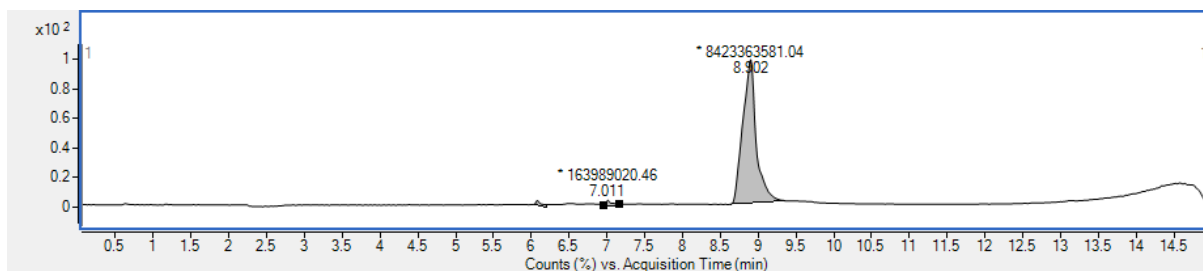
Slika 33. Spektar masa aktivnog spoja N-2

Odabrani aktivni spoj N-2 na kromatogramu se pojavljuje na vremenu zadržavanja, $t_R = 8,907$ min.

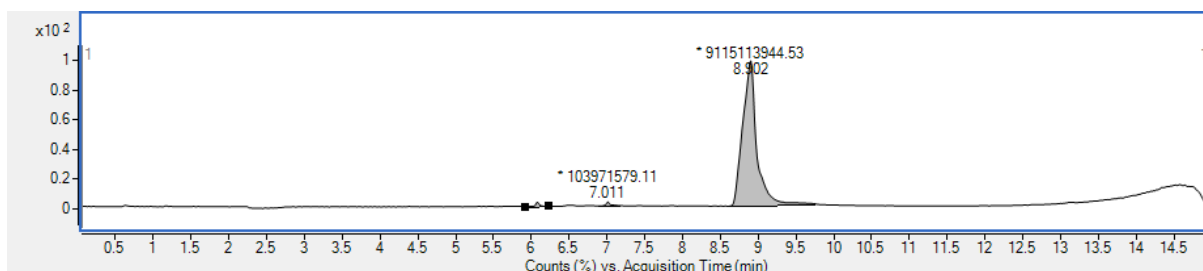
U nastavku su dani kromatogrami (Slike 34.-38.) dobiveni analizom uzoraka poslije provođenja određenog eksperimenta prisilne razgradnje. Provedena ispitivanja pokazala su da je N-2 podložan oksidaciji, razgradnji djelovanjem UV/VIS zračenja te hidrolizi u kiselim i lužnatim uvjetima.



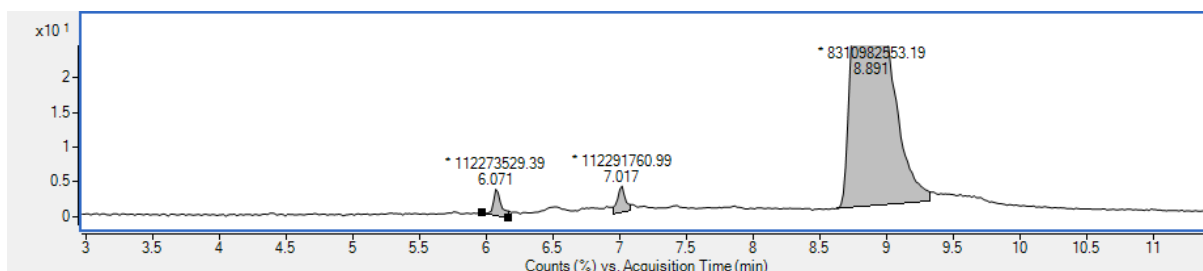
Slika 34. Kromatogram u uvjetima oksidacije peroksidom



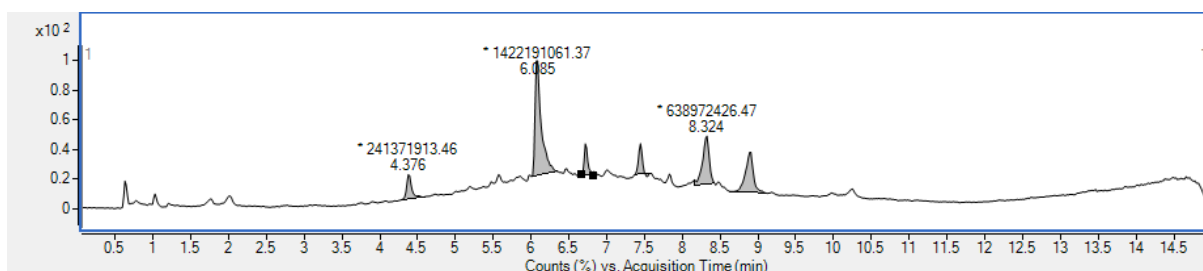
Slika 35. Kromatogram u uvjetima kisele hidrolize



Slika 36. Kromatogram u uvjetima lužnate hidrolize



Slika 37. Kromatogram u uvjetima termalne razgradnje



Slika 38. Kromatogram u uvjetima izlaganja uzorka UV-VIS zračenju

Analizom uzoraka spoja N-2 utvrđena je pojava određenog razgradnog produkta po eksperimentima prisilne razgradnje.

Hidrolitička razgradnja je i u kiselim, i u bazičnim uvjetima, kao i termalna razgradnja, rezultirala nastankom ista dva razgradna produkta ($m/z = 259$, odnosno $m/z = 486$). U prisutnosti klorovodične kiseline razgradni produkt $m/z = 259$ nastaje u udjelu od 1,4%, dok u

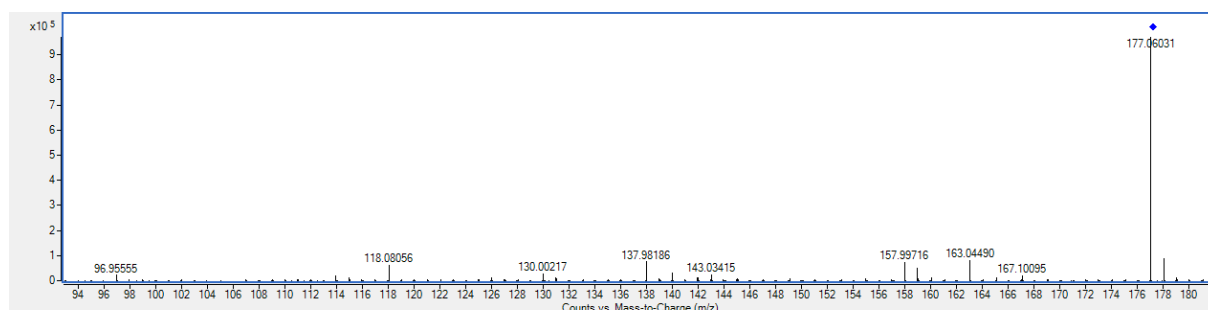
prisutnosti natrijeve lužine nastaje u udjelu od 1,5%. U prisutnosti klorovodične kiseline razgradni produkt $m/z = 486$ nastaje u udjelu od 1,9%, dok u prisutnosti natrijeve lužine nastaje u udjelu od 1,1%. U slučaju termalne razgradnje, postotak nastanka ova dva razgradna produkta jednak je te iznosi 1,3%. Kao opažanje nakon provedene termalne razgradnje može se navesti pojava taloga jedino u slučaju uzorka N-2, izloženog temperaturi od 80 °C.

Oksidacijska razgradnja spoja N-2, provedena u prisutnosti vodikovog peroksida, rezultirala je nastankom najvećeg broja razgradnih produkata (njih 5), omjera mase i naboja te pripadajućeg udjela nastanka kako slijedi: $m/z = 348$ (s udjelom od 0,8%), $m/z = 347$ (s udjelom od 25,9%), $m/z = 259$ (s udjelom od 1,0%), $m/z = 333$ (s udjelom od 0,9%) te $m/z = 486$ (s udjelom od 0,8%). U ovom slučaju je opaženo kako je kod otopine spoja N-2 došlo do taloženja tvari, odnosno ovaj uzorak nakon procesa prisilne razgradnje nije mogao biti podvrgnut preciznijoj daljnjoj analizi.

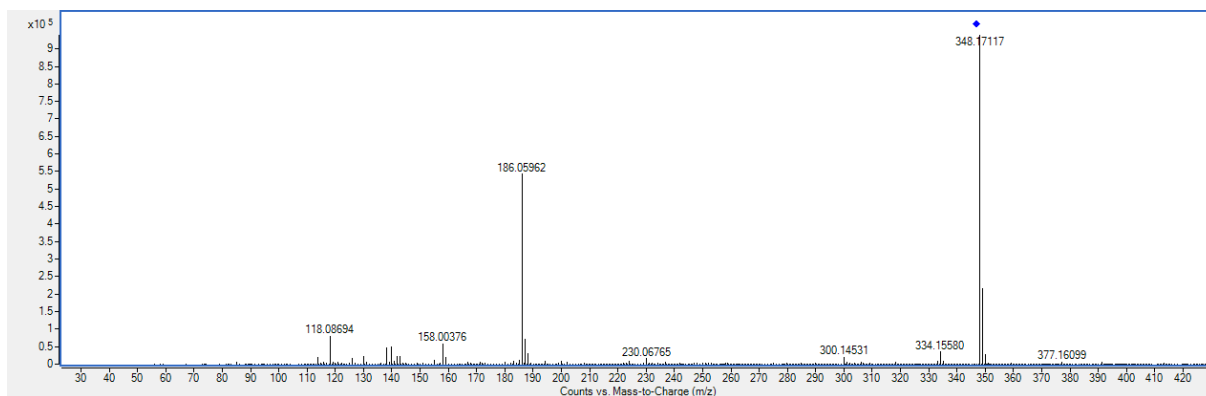
Naposljetku, fotolitičkom su razgradnjom nastala četiri razgradna produkta: $m/z = 177$ (s udjelom od 7,2%), $m/z = 259$ (s udjelom od 42,3%), $m/z = 333$ (s udjelom od 6,8%) te $m/z = 329$ (s udjelom od 19,0%).

Na temelju prethodno iznesenog, može se uočiti kako pojedini razgradni produkti nastaju pri više različitih eksperimentalnih uvjeta, poput razgradnog produkta $m/z = 259$, koji se pojavljuje u svim eksperimentima.

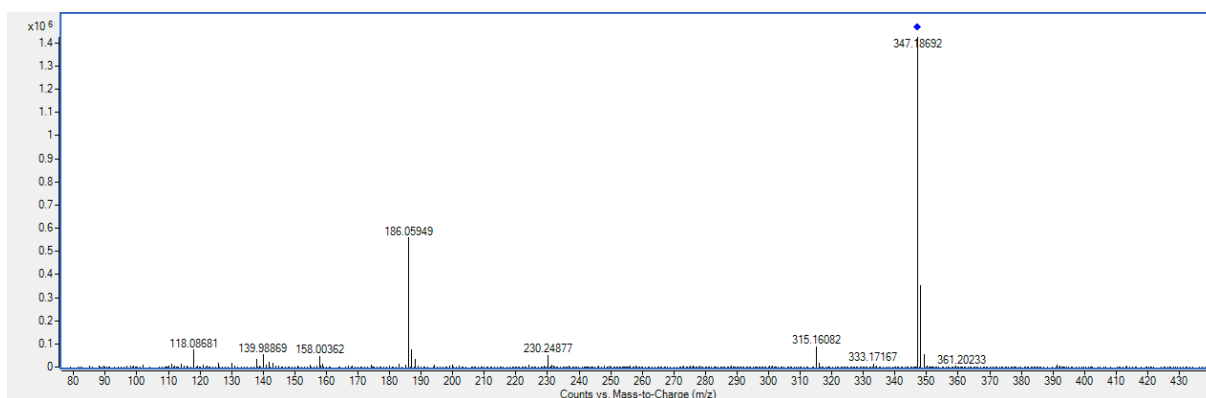
U nastavku su Slikama 39.- 45. prikazani MS/MS spektri fragmentacije razgradnih produkata odgovarajućeg m/z s pripadajućim vremenom zadržavanja, na temelju kojih su identificirane strukture pojedinom razgradnog produkta.



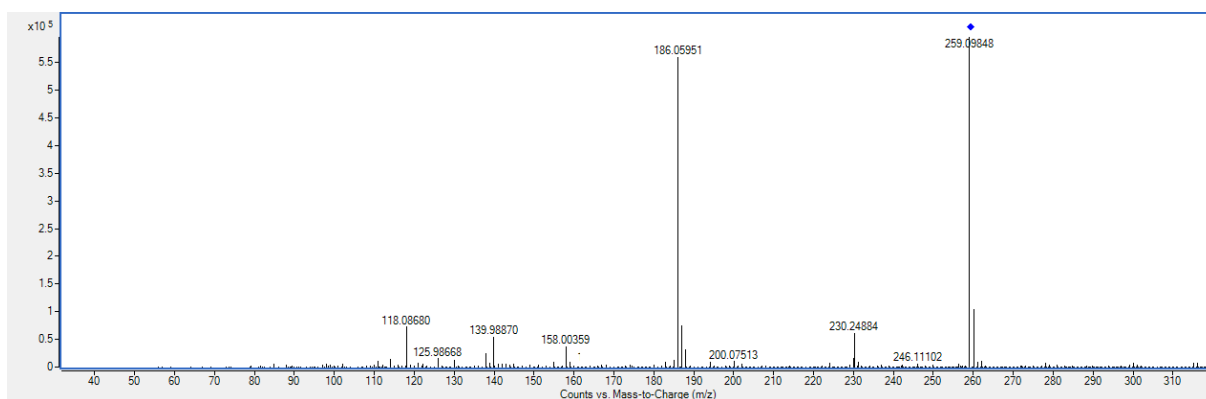
Slika 39. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 177$ s vremenom zadržavanja $t_R = 4,376$ min



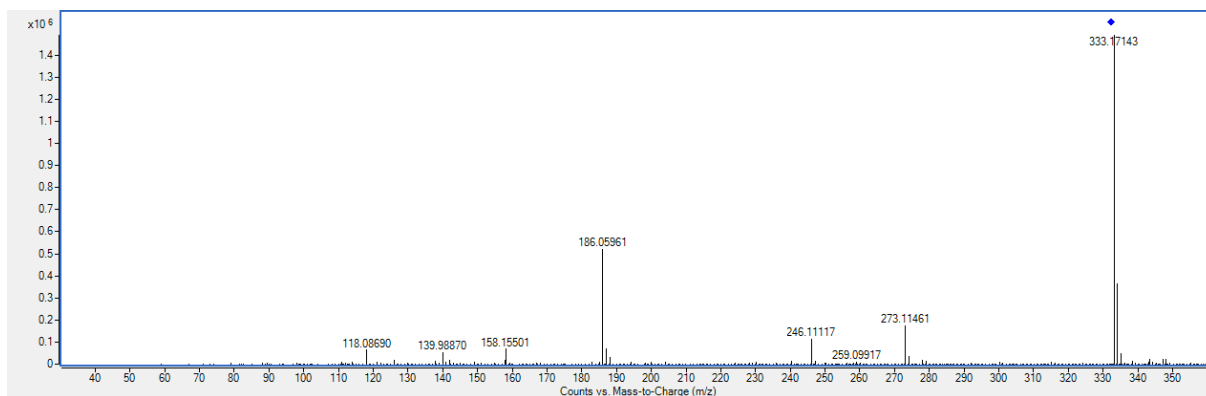
Slika 40. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 348$ s vremenom zadržavanja $t_R = 5,461$ min



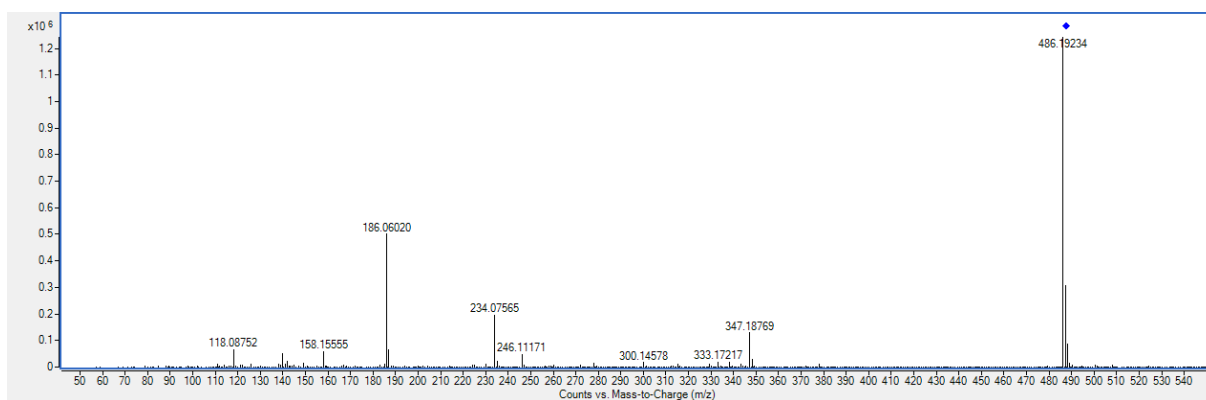
Slika 41. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 347$ s vremenom zadržavanja $t_R = 5,759$ min



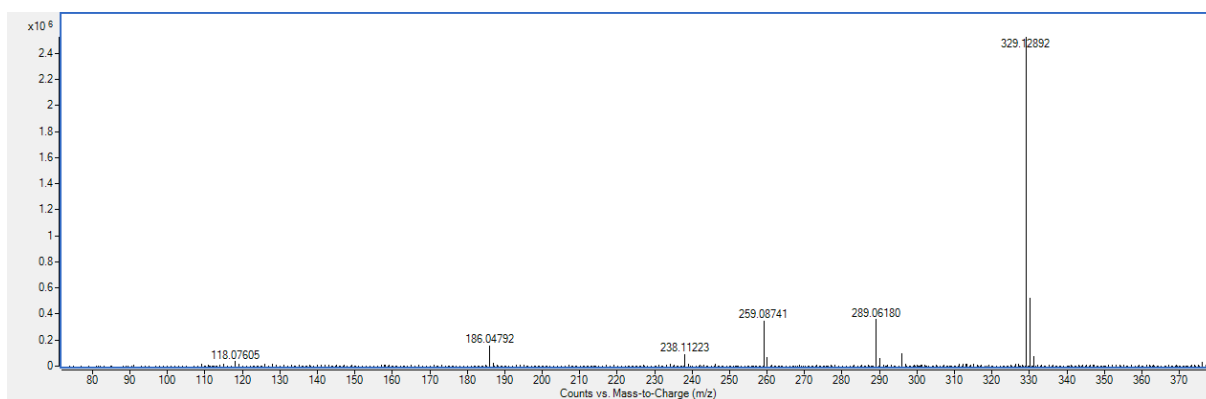
Slika 42. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 259$ s vremenom zadržavanja $t_R = 6,075$ min



Slika 43. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 333$ s vremenom zadržavanja $t_R = 6,755$ min



Slika 44. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 486$ s vremenom zadržavanja $t_R = 7,004$ min

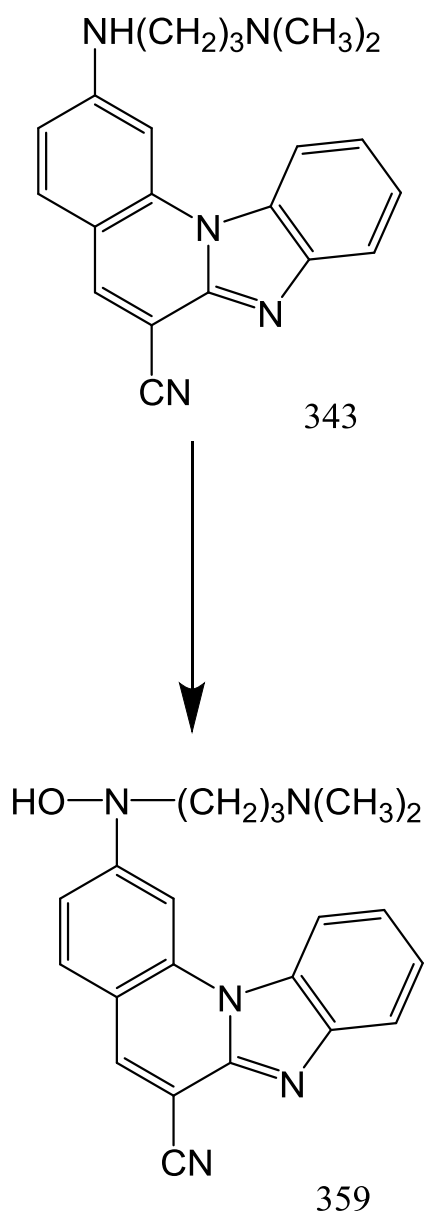


Slika 45. MS/MS spektar fragmentacije razgradnog produkta $m/z = 329$ s vremenom zadržavanja $t_R = 8,324$ min

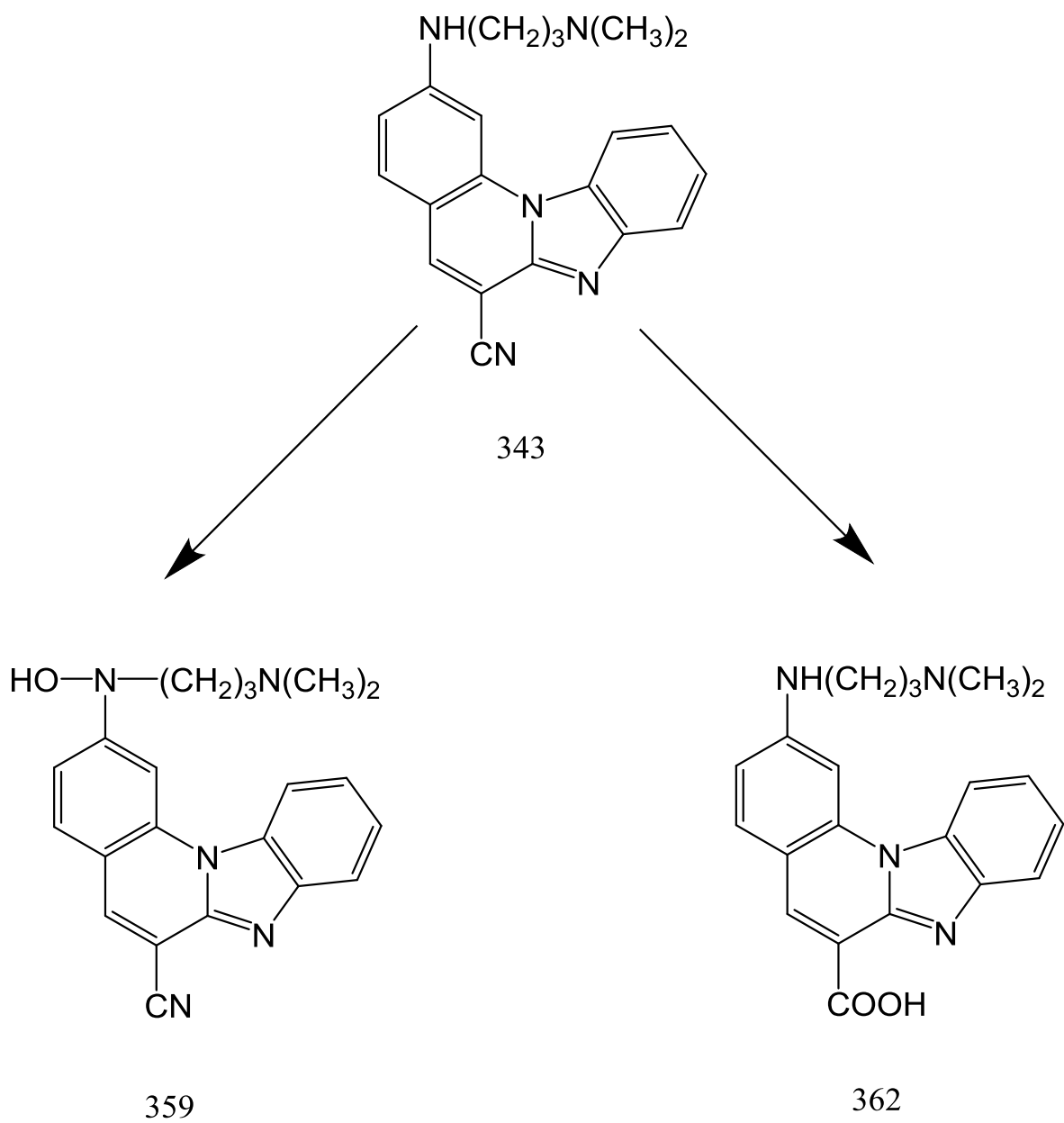
4.3. Predloženi putevi razgradnje

Na osnovu ciljane MS/MS fragmentacije nastalih razgradnih produkata pretpostavljena je njihova struktura te su u nastavku dani predloženi razgradni putevi spojeva N-1 i N-2, dobiveni u pojedinom eksperimentu. Strukture spojeva nacrtane su programom ChemDRAW.

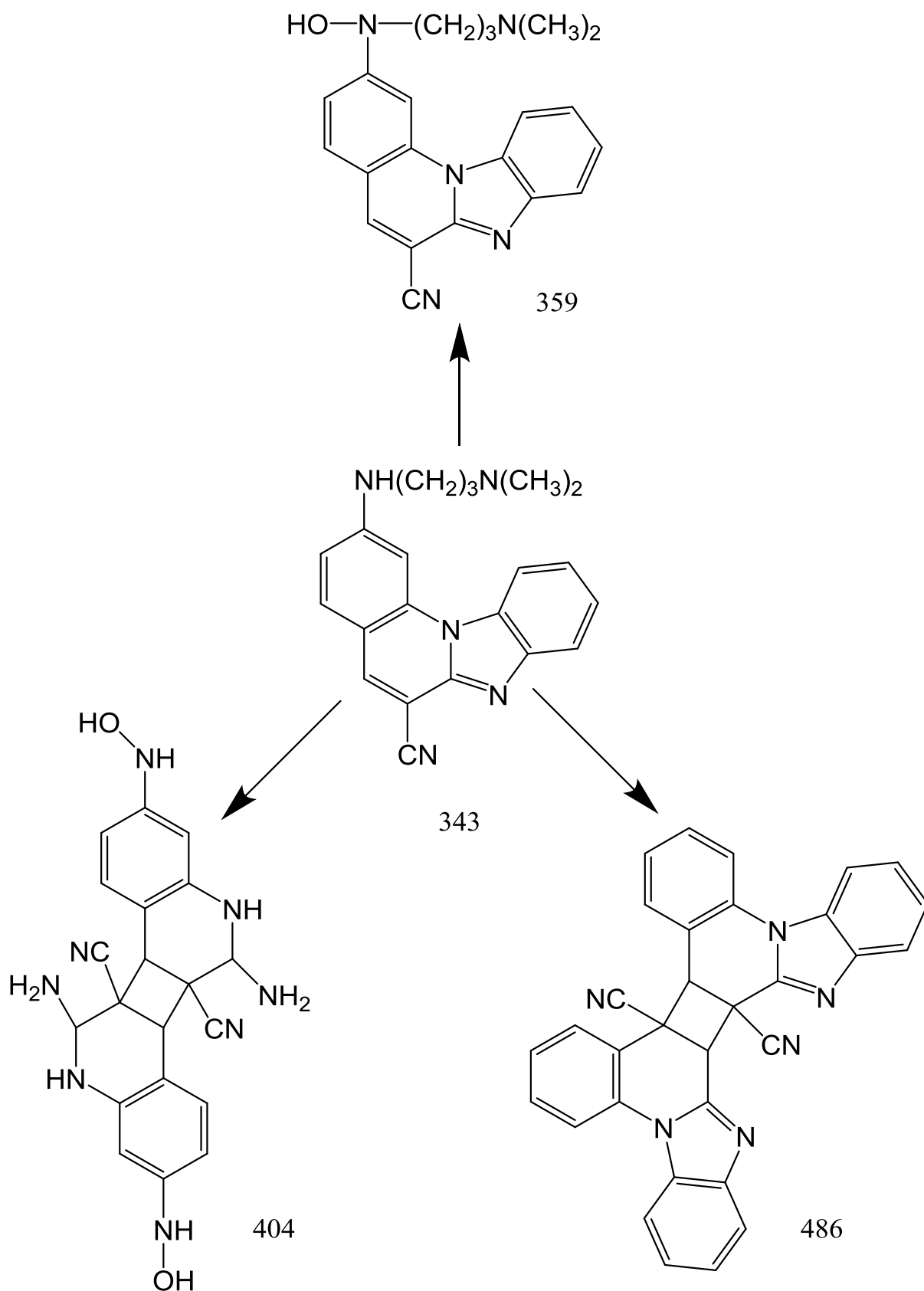
4.3.1. Razgradni putevi spoja N-1 po eksperimentima



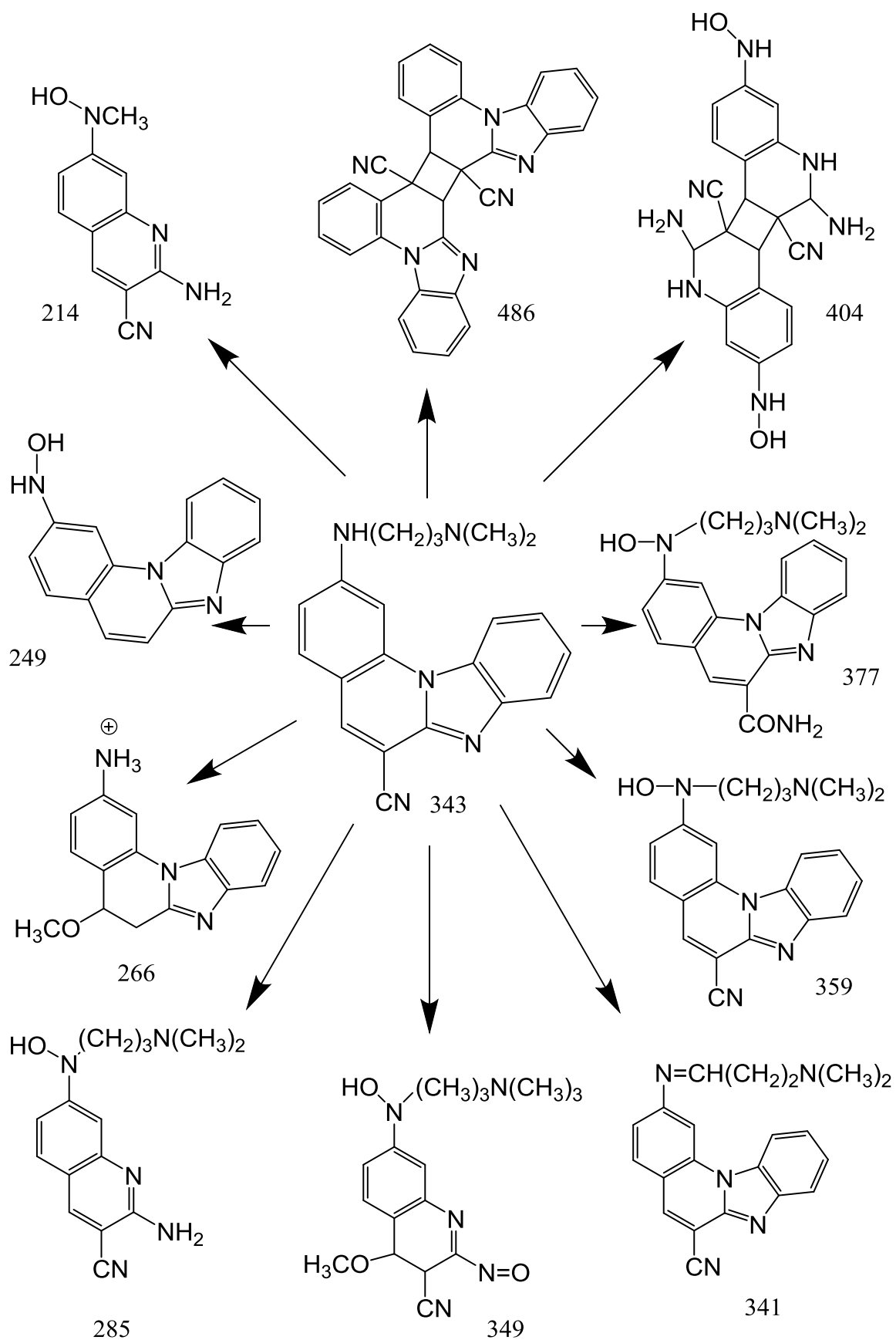
Slika 46. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-1 u uvjetima hidrolitičke razgradnje u kiselim i lužnatim uvjetima



Slika 47. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-1 u uvjetima razgradnje s vodikovim peroksidom

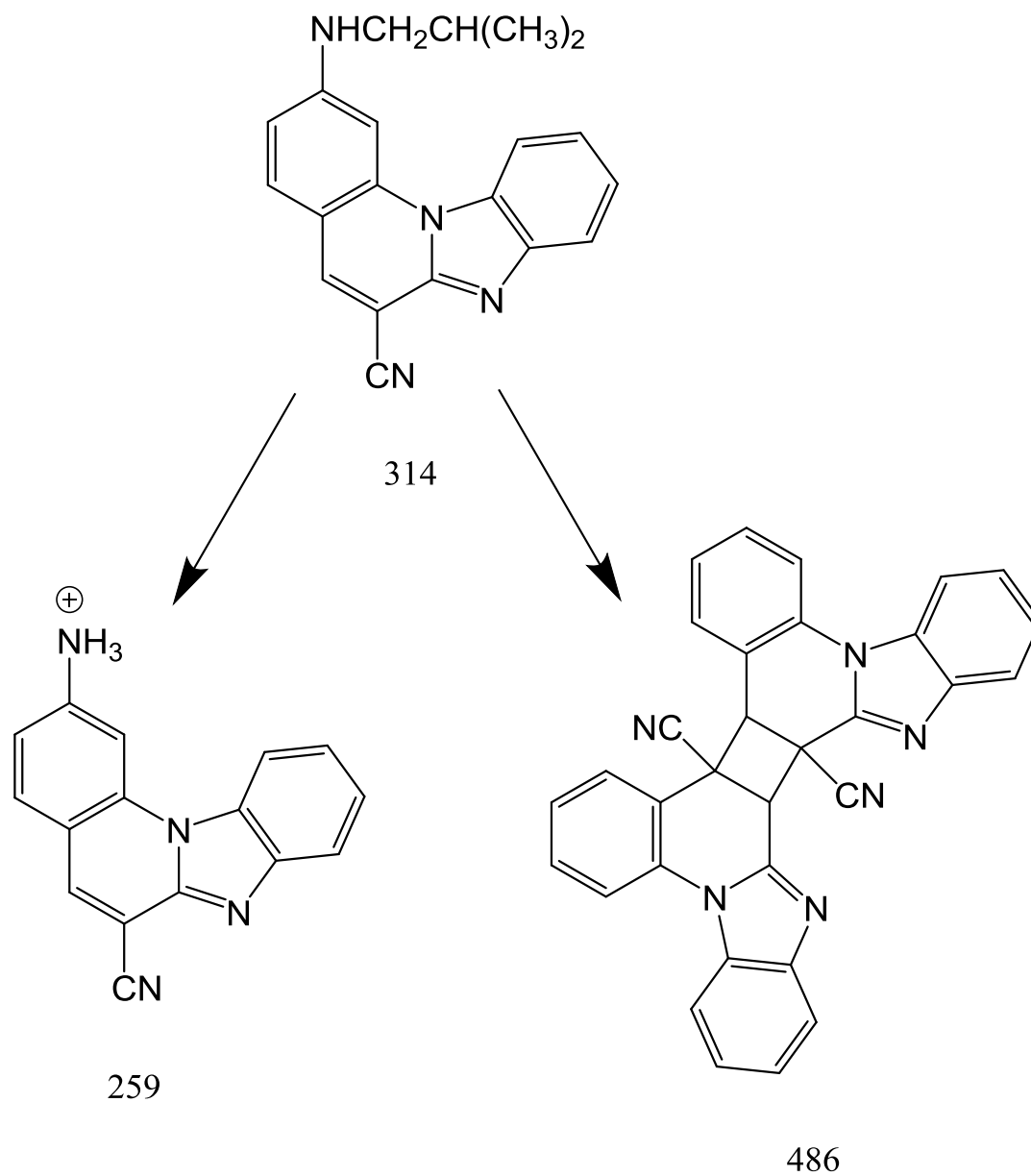


Slika 48. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-1 u uvjetima termalne razgradnje

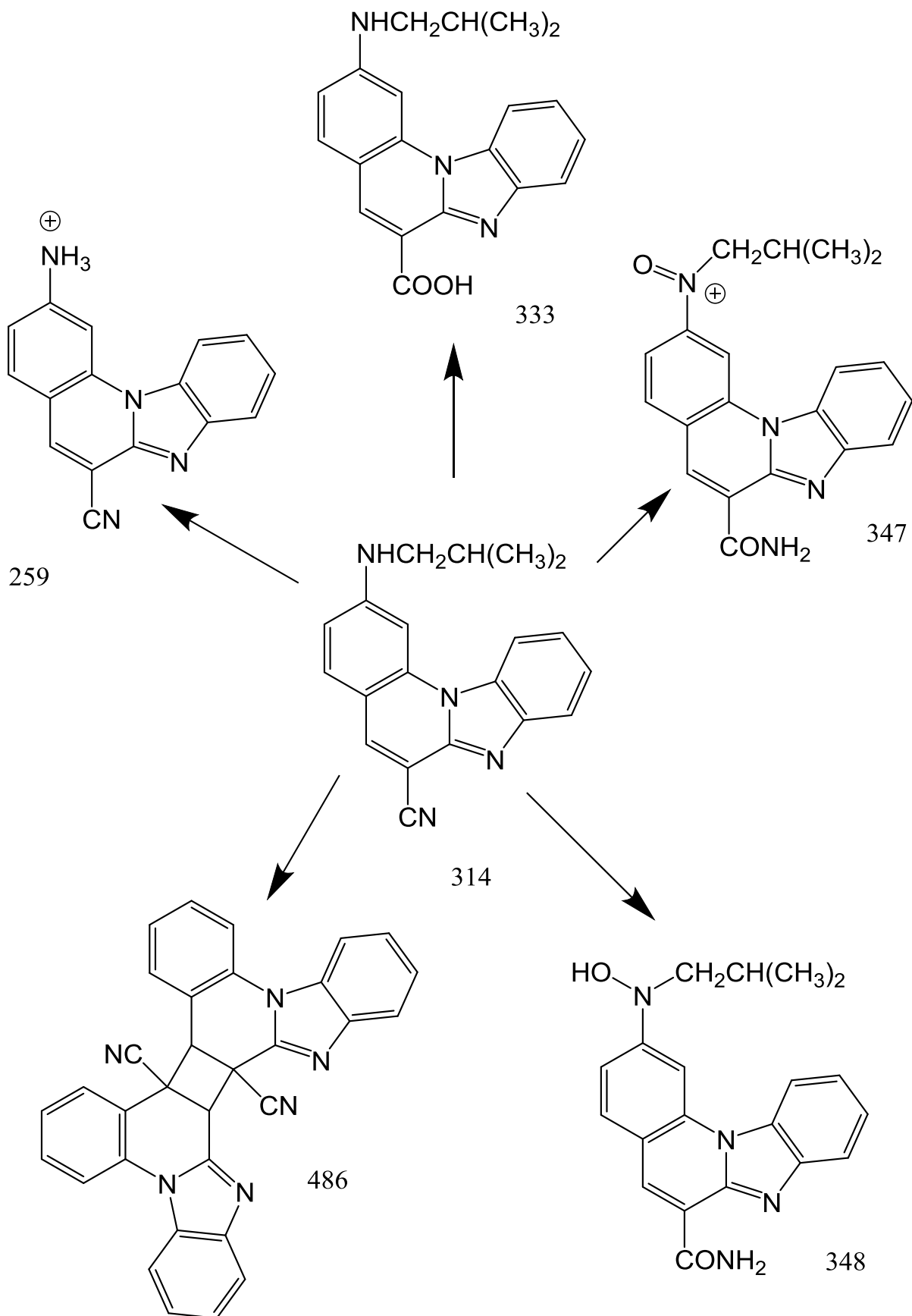


Slika 49. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-1 u uvjetima fotolitičke razgradnje

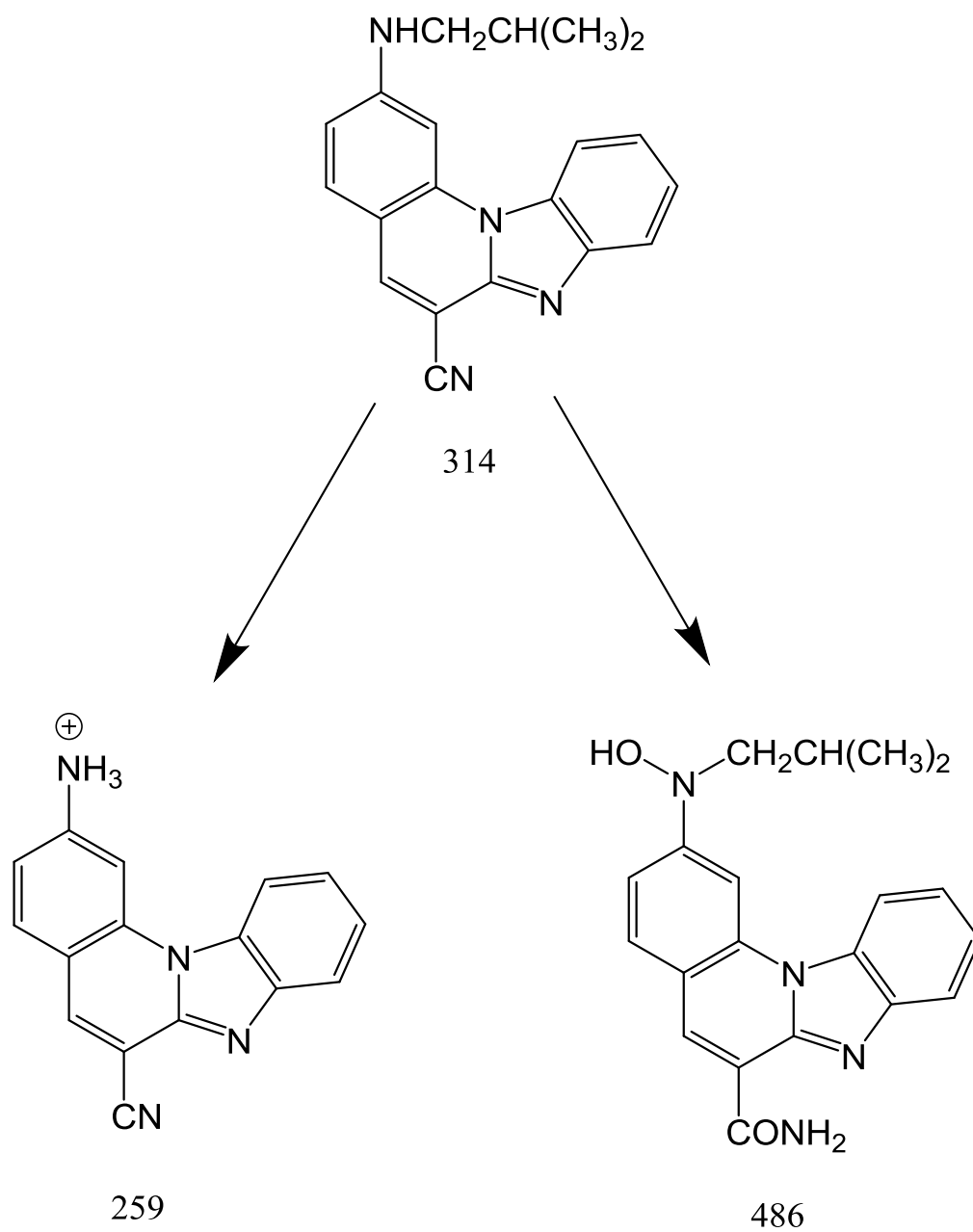
4.3.2. Razgradni putevi spoja N-2 po eksperimentima



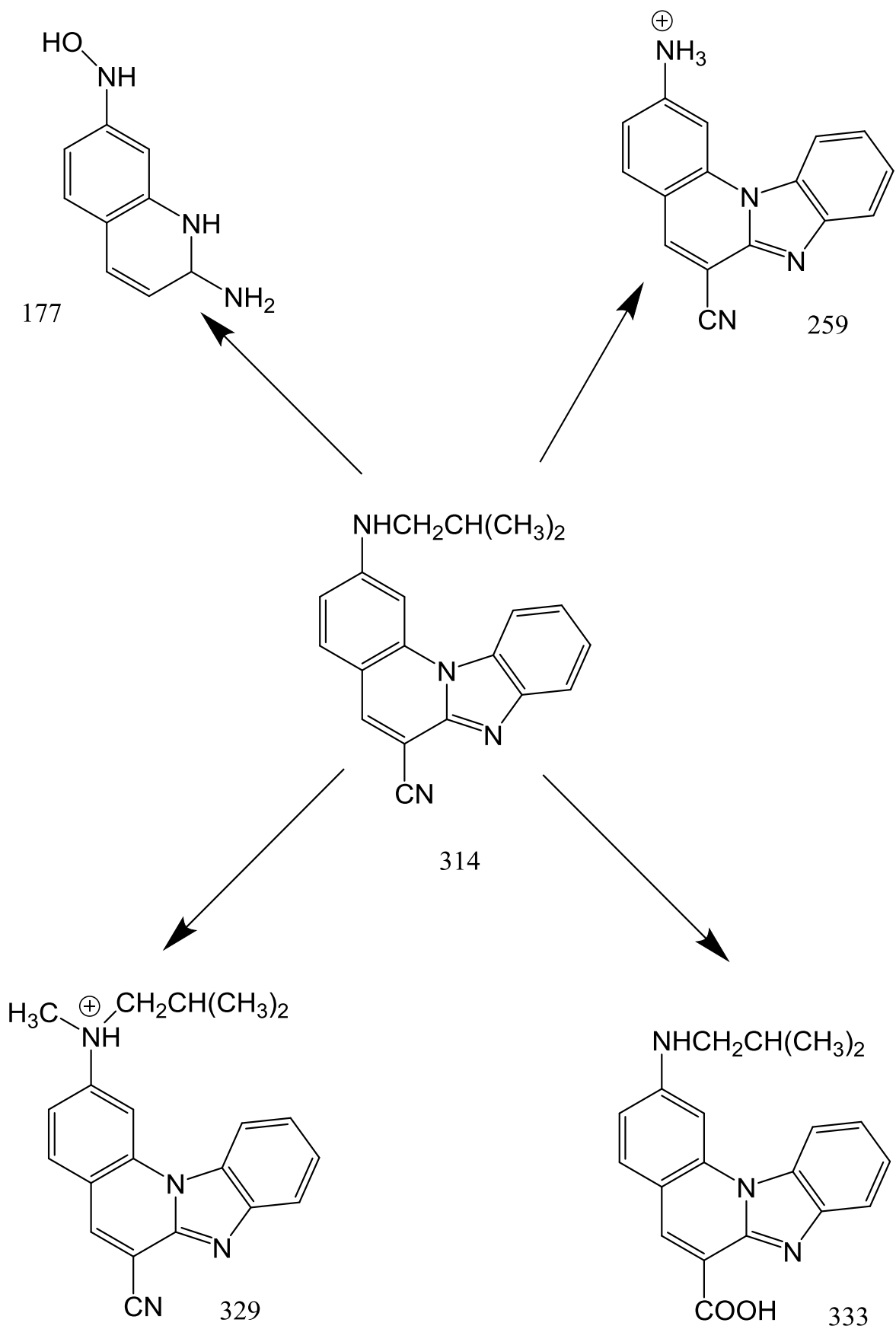
Slika 50. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-2 u uvjetima hidrolitičke razgradnje u kiselim i lužnatim uvjetima



Slika 51. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-2 u uvjetima razgradnje s vodikovim peroksidom



Slika 52. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-2 u uvjetima termalne razgradnje



Slika 53. Predloženi razgradni put novosintetiziranog spoja N-2 u uvjetima fotolitičke razgradnje

4.3.3. Procjena krajnjih točaka toksičnosti spoja N-1 i njegovih razgradnih produkata

S ciljem procjene toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti, strukturne formule identificirane spektrometrijom masa prevedene su pomoću računalnog programa ChemDRAW u SMILES stringove te tako unesene u program za procjenu toksičnosti TEST.

Primjenom određene metode izračunate su vrijednosti željenih svojstava – bioakumulacijskog faktora, toksičnosti i mutagenosti, tablično dane u nastavku. Bioakumulacijski faktor predstavlja omjer koncentracije kemikalije u ribi, kao rezultat apsorpcije putem površina dišnog sustava, i koncentracija u vodi prisutne kod stacionarnog stanja. Svojstvo razvojne toksičnosti upućuje na to uzrokuje li ju ili ne te u kojoj mjeri određena kemikalija kod ljudi i životinja. Naposljetku, posljednje procijenjeno svojstvo u radu bit će mutagenost, na koju se tvrdi da je određeni spoj pozitivan ako uzrokuje povratni rast kolonije u bilo kojem soju bakterije *Salmonella typhimurium*. [21]

Generalno gledajući, metode se temelje na usporedbi predviđene vrijednosti određenog svojstva s eksperimentalno dobivenim setom podataka. Ako se predviđena vrijednost podudara s eksperimentalnim vrijednostima za slične kemikalije u ispitnom setu, uz pretpostavku da su slične kemikalije dobro predviđene, ispitivač može biti sigurniji u točnost dobivene predikcije. Pritom je vrijednost minimalnog koeficijenta sličnosti za potrebe usporedbe jednaka 0,5.

Tablica 6. Bioakumulacijski faktor izračunat primjenom određenog QSAR modela za aktivni spoj N-1 te njegove razgradne produkte

| Razgradni produkti aktivnog spoja N-1 | Bioakumulacijski faktor | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | Konczynusna metoda | Metoda doprinosa grupe | Metoda hijerarhijskog klastera | Metoda najbližeg susjeda | Metoda jedinstvenog modela |
| 343 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 214 | 9,81 | N/A | 7,33 (interval 0,55-98,19) | N/A | 7,33 (interval 0,55-98,19) |
| 249 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 266 (bez naboja) | 39,91 | 13,09 (interval 0,56-306,14) | 47,59 (interval 15,56-145,51) | 92,61 | 18,22 (interval 1,36-244,40) |
| 285 | 12,05 | N/A | 4,18 (interval 0,31-56,98) | N/A | 4,18 (interval 0,31-56,98) |
| 331 | N/A | N/A | N/A | 25,25 | N/A |
| 341 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 359 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 362 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 377 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 404 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 486 | 15,22 | N/A | N/A | 113,95 | N/A |

Na temelju sumarnog prikaza rezultata izračuna bioakumulacijskog faktora primjenom određenog QSAR modela, može se izvršiti usporedba dobivenih vrijednosti za pojedini razgradni produkt.

Za razgradni produkt s pripadajućim omjerom m/z od 214 vrijedi da se bioakumulacijski faktor može odrediti primjenom koncenzusne metode, metode hijerarhijskog klastera te metode jedinstvenog modela, a dobivene su vrijednosti dane Tablicom 6. Usporedbom srednjih apsolutnih pogrešaka između predviđenih vrijednosti i eksperimentalnih vrijednosti bioakumulacijskog faktora za slične kemikalije ispitnog seta, može se zaključiti kako je spomenuta pogreška najmanja u slučaju primjene metode hijerarhijskog klastera (0,02), a najveća primjenom metode jedinstvenog modela (0,17). Iako se primjenom metode hijerarhijskog klastera dobiva jednaka vrijednost bioakumulacijskog faktora kao i u slučaju metode jedinstvenog modela, srednja je apsolutna pogreška manja, što znači da je predikcija izvršena modelom hijerarhijskog klastera točnija. Primjena metode hijerarhijskog klastera može dati pouzdanija predviđanja iz razloga što se ona dobivaju iz različitih modela. Nedostatak metode je u tome što se metodom ne mogu dobiti vanjske procjene toksičnosti spojeva ispitnog seta podataka. [21] Koncenzusna metoda daje drukčiju vrijednost bioakumulacijskog faktora, vidljivu iz Tablice 6., a vrijednost srednje apsolutne pogreške iznosi 0,09.

Razgradnom produktu s omjerom m/z u vrijednosti od 266 moguće je odrediti vrijednost bioakumulacijskog faktora sa svakim od korištenih modela. Primjenom koncenzusne metode dobiva se vrijednost bioakumulacijskog faktora u vrijednosti od 39,91. U vanjskom ispitnom setu kemikalija nalaze se slične kemikalije nad kojima software također provodi predikcije. Usporedbom srednje apsolutne pogreške izračunatih vrijednosti sličnih kemikalija s onom dobivenom uključivanjem cijelog ispitnog seta kemikalija u izračun, može se uočiti kako srednja apsolutna pogreška za kemikalije s koeficijentom sličnosti većim ili jednakih 0,5 iznosi 0,76, dok se za cijeli set kemikalija dobiva vrijednosti pogreške u iznosu od 0,51. U pravilu, što su te dvije vrijednosti sličnije, predikcija dobivena modelom je pouzdanija. U ispisu rezultata programskog izračuna dobivaju se i strukturne formule sličnih kemikalija. U ovom slučaju je vidljivo kako postoje značajnije razlike u strukturi razgradnog produkta $m/z = 266$ u odnosu na strukture kemikalija iz vanjskog ispitnog seta, odnosno vrijednosti njihovih koeficijenta sličnosti nisu značajnije veće od 0,50. To smanjuje pouzdanost dobivene predikcije. Programom se također dobivaju i strukturne formule kemikalija iz ispitnog seta, čije su vrijednosti koeficijenta sličnosti s ispitivanom kemikalijom u rasponu 0,58-0,65, to jest

postoje značajnije razlike u strukturi ispitivane kemikalije i ostalih kemikalija iz ispitnog seta. S obzirom da se QSAR modeli temelje na primjeni vrijednosti izračuna iz seta sličnih kemikalija, prethodno navodi na zaključak o smanjenoj pouzdanosti predviđene vrijednosti bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta $m/z = 266$ dobivenog primjenom koncenzusne metode. S tom se spoznajom pristupilo primjeni drugih QSAR modela u cilju dobivanja pouzdanije predikcije.

Općenito vrijedi da prednost primjene koncenzusne metode leži u činjenici da se metodom dobivaju najbolje procijenjene vrijednosti tijekom provedbe vanjske validacije. Njezin je nedostatak, međutim, nemogućnost pružanja vanjskih procjena toksičnosti za spojeve koji pripadaju ispitnom setu. [21]

Primjenom metode doprinosa grupe nad istim razgradnim produktom, dobiva se predikcijski interval $0,56 \leq \text{Tox} \leq 306,14$ unutar kojeg se s 90%-tnom sigurnošću može tvrditi da se nalazi predviđena vrijednost od 13,09. Koeficijent korelacije dobiven iz rezultata primjene ovog modela iznosi $r^2 = 0,719$. Metoda doprinosa grupa može imati prednost nad ostalim ponuđenim modelima utoliko što omogućuje jednostavan prikaz i izvoz jedinstvenog modela te se procjene toksičnosti mogu napraviti i bez upotrebe računalnog programa, odnosno vizualnim pregledom molekulske strukture ispitivanog spoja. Nedostatci primjene metode, s druge strane, uključuju netočnost modela u slučaju interakcija susjednih fragmenata, moguće pogrešno predviđanje trendova toksičnosti za određene kemijske klase, s obzirom da je model prikladan za čitav skup podataka, kao i nemogućnost davanja vanjske procjene toksičnosti za spojeve ispitivanog seta. [21] S druge strane, primjenom metode hijerarhijskog klastera, dobiva se predikcijski interval $15,56 \leq \text{Tox} \leq 145,51$ unutar kojeg se s 90%-tnom sigurnošću može tvrditi da se nalazi predviđena vrijednost od 47,59. Koeficijenti korelacije pojedinih klastera dobiveni iz rezultata primjene ovog modela pripadaju intervalu vrijednosti 0,764-0,826.

Usporedbom rezultata dobivenih modelom doprinosa grupe s rezultatima dobivenih iz modela hijerarhijskog klastera, vidljivo je kako vrijednosti srednjih apsolutnih pogrešaka sličnih kemikalija i onih dobivenih promatranjem cijelog ispitnog seta značajnije odstupaju u slučaju modela doprinosa grupa. Kod ovog modela za slične kemikalije vrijedi da je iznos srednje apsolutne pogreške 0,75, dok taj iznos za cijeli set kemikalija iznosi 0,60. Kod modela hijerarhijskog klastera je, međutim, zamjetna znatno manja razlika u vrijednostima srednje

apsolutne pogreške za set sličnih kemikalija (eng. $MAE^3 = 0,28$), u odnosu na onu dobivenu uključivanjem čitavog seta u izračun ($MAE = 0,23$). Na temelju svega prethodno iznesenog može se zaključiti kako se primjenom modela hijerarhijskog klastera dobiva pouzdanija predikcija bioakumulacijskog faktora.

Ukoliko se, međutim, primjenjuje model najbližeg susjeda, vrijednost bioakumulacijskog faktora razgradnog produkta $m/z = 266$ dobivena modelom iznosi 92,61. Ispis rezultata primjene ovog modela daje uvid u značajniju razliku vrijednosti srednje apsolutne pogreške dobivene primjenom cijelog seta kemikalija ($MAE = 0,60$) u odnosu na onu dobivenu provedbom proračuna samo nad sličnim kemikalijama iz ispitnog seta ($MAE = 1,00$), što smanjuje pouzdanost vrijednosti bioakumulacijskog faktora predviđene modelom. Tu tvrdnju potkrjepljuje i činjenica da postoje značajnije razlike u strukturi ispitivane kemikalije i ostalih kemikalija iz ispitnog seta.

Metodom jedinstvenog modela dobiva se predviđena vrijednost bioakumulacijskog faktora u vrijednosti od 18,22, koja se s 90%-tnom pouzdanošću nalazi unutar intervala 1,36-244,40, dok vrijednost koeficijenta korelacije iznosi 0,764. I kod ovog se modela uočavaju značajnije strukturalne razlike između ispitivanog razgradnog produkta te ispitnog seta najbližijih kemikalija, što u konačnici povećava nepouzdanost predikcije.

Metoda jedinstvenog modela ima prednost u činjenici da se jedan transparentni model može lako pregledati, odnosno izvesti. Također, model se ne mora oslanjati na pravilno grupiranje kemikalija. Nedostatak primjene ovog modela je taj što model može pogrešno predvidjeti trendove toksičnosti za određene kemijske klase, budući da je prikladan za čitav skup podataka. [21]

Generalno gledajući grafičke ovisnosti predviđenih vrijednosti bioakumulacijskih faktora s onima dobivenim eksperimentalno, za razgradni se produkt $m/z = 266$ može zaključiti kako je najpouzdanija primjena metode hijerarhijskog klastera.

Nadalje, kada se nad razgradnim produktom s omjerom $m/z = 285$ primjeni konzensusna metoda, dobiva se vrijednost bioakumulacijskog faktora od 12,05. U slučaju primjene metode hijerarhijskog klastera i metode jedinstvenog modela, vrijednost bioakumulacijskog faktora od 4,18 s 90%-tnom sigurnošću pripada intervalu vrijednosti 0,31-56,98, dok u oba slučaja koeficijent korelacije iznosi 0,764. S obzirom da je primjenom ovih modela u bazi podataka

³ Mean Absolute Error

postojala samo jedna kemikalija čiji je koeficijent sličnosti prelazio minimalnu vrijednost od 0,5, može se zaključiti kako je u slučaju razgradnog produkta $m/z = 285$ teško s većom pouzdanošću procijeniti vrijednost bioakumulacijskog faktora.

Razgradni produkt omjera $m/z = 331$ posjeduje bioakumulacijski faktor u vrijednosti od 25,25, izračunato primjenom metode najbližeg susjeda. Usporedbom srednje apsolutne pogreške dobivene primjenom modela nad strukturno sličnim kemikalijama ($MAE = 1,20$) u odnosu na onu dobivenu uključivanjem čitavog seta kemikalija u proračun ($MAE = 0,55$), može se zaključiti da postoji značajnija nepouzdanost dobivene predikcije. Na to upućuju i znatnije razlike u strukturi ispitivanog razgradnog produkta u odnosu na kemijske strukture ispitnog seta kemikalija. Ostali QSAR modeli ne daju konkretne numeričke vrijednosti traženog svojstva.

Primjena QSAR modela za procjenu bioakumulacijskog faktora nad razgradnim produktom omjera $m/z = 486$ daje konkretne vrijednosti samo u slučaju primjene koncenzusne metode (15,22), odnosno primjenom metode najbližeg susjeda (113,95). U oba slučaja nije postojao vanjski ispitni set kemikalija s minimalnim koeficijentom sličnosti od 0,5, a iz grafičkih prikaza ovisnosti predviđenih o eksperimentalno dobivenim vrijednostima bioakumulacijskog faktora teško je procijeniti koji je model pouzdaniji.

Brza procjena toksičnosti, mogućnost određivanja strukturnog analoga za ispitivani spoj, kao i pružanje vanjske procjene toksičnosti razlozi su zbog kojih primjena metode najbližeg susjeda može biti u prednosti nad ostalim ponuđenim modelima. Nedostatci ovog modela, međutim, leže u činjenici da model ne koristi QSAR model za korelaciju razlika između ispitnog spoja i najbližih susjeda te se pokazalo da model postiže najgore rezultate predviđanja tijekom vanjske validacije. [21]

Bioakumulacijski faktor razgradnih produkata omjera m/z od 249, 341, 359, 362, 377, 404 te 486 nije moguće izračunati primjenom niti jedne od ponuđenih metoda, odnosno niti jedna kemikalija ispitnog seta nije premašila minimalnu vrijednost koeficijenta sličnosti od 0,5 za potrebe usporedbe. Na to upućuje ispis rezultata programa N/A.

Usporedbom numerički dobivenih vrijednosti bioakumulacijskog faktora pojedinog razgradnog produkta po koncenzusnoj metodi, vidljivo je kako najveću vrijednost (39,91) posjeduje razgradni produkt omjera m/z u iznosu od 266, koji nastaje jedino u eksperimentu fotolitičke razgradnje u udjelu od 8,5%. Najmanju vrijednost bioakumulacijskog faktora (9,81) posjeduje razgradni produkt $m/z = 214$, koji je podrijetlom iz istog eksperimenta

fotolitičke razgradnje, a pojavljuje se u udjelu od 5,7%. Prethodno, ukazuje na zaključak da će, s obzirom na maleni udio, nastali razgradni produkt imati malen doprinos ukupnoj bioakumulaciji u sustavu. Doprinos je pritom, logično, nešto veći u slučaju razgradnog produkta $m/z = 266$, što proizlazi prvenstveno iz vrijednosti njegova bioakumulacijskog faktora, koja je oko četiri puta veća od vrijednosti za razgradni produkt $m/z = 214$.

Ostale konkretno dobivene vrijednosti bioakumulacijskog faktora pripadaju razgradnim produktima $m/z = 285$ te $m/z = 486$. Prvi od ova dva razgradna produkta nastaje u eksperimentu fotolitičke razgradnje u udjelu od 9,5%, dok drugi nastaje kao produkt dvaju eksperimentalnih uvjeta – u eksperimentima s povišenom temperaturom u udjelu od 4,3%, a u eksperimentima pod utjecajem UV/VIS zračenja u udjelu od 11,1%. Za razgradni produkt $m/z = 285$ se, tako, može tvrditi da će doprinos bioakumulaciji u organizmu biti srednji (12,05), što prije svega proizlazi iz udjela njegova nastanka, koji pripada srednjim postotcima za razgradne produkte nastale u procesima fotolitičke razgradnje. Vrijednost bioakumulacijskog faktora za $m/z = 486$ od 15,22 više doprinosi toksičnosti sustava pod utjecajem UV/VIS zračenja što slijedi iz činjenice da je udio njegova nastanka u tim eksperimentalnim uvjetima znatno veći nego li je on za eksperiment termalne razgradnje.

Naposljetku, može se primijetiti kako vrijednost bioakumulacijskog faktora ne prelazi 30 niti u jednom od promatranih slučajeva, što je svrstava u skupinu niskih vrijednosti, izuzev onoga za razgradni produkt $m/z = 266$ gdje iznosi 39,91 prema konzensusnoj metodi. To, prema literaturi, čini vrijednosti bioakumulacijskog faktora srednjom jer pripada rasponu vrijednosti većih od 30, a manjih od 100. [28]

Tablica 7. Razvojna toksičnost izračunata primjenom određenog QSAR modela za aktivni spoj N-1 te njegove razgradne produkte

| Razgradni produkti aktivnog spoja N-1 | Razvojna toksičnost | | | |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Konzensusna metoda | Metoda hijerarhijskog klastera | Metoda najbližeg susjeda | Metoda jedinstvenog modela |
| 343 | +(0,89) | +(0,70) | N/A | +(0,80) |
| 214 | +(0,82) | +(0,85) | N/A | +(0,85) |
| 249 | -(0,44) | +(0,71) | N/A | +(0,65) |
| 266 (bez naboja) | -(0,31) | +(0,52) | N/A | -(0,23) |
| 285 | +(0,99) | +(0,99) | N/A | +(1,11) |
| 331 | +(1,09) | +(1,05) | N/A | +(1,12) |
| 341 | +(0,79) | +(0,70) | N/A | +(0,79) |
| 359 | +(1,25) | +(0,96) | N/A | +(1,19) |
| 362 | +(0,92) | +(1,02) | -(0,33) | +(0,97) |
| 377 | +(1,17) | +(0,82) | N/A | +(1,21) |
| 404 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 486 | +(0,53) | N/A | +(0,67) | N/A |

Prethodnom je tablicom dan sumarni prikaz rezultata izračuna razvojne toksičnosti dobiven primjenom određene QSAR metode nad strukturama razgradnih produkata aktivnog spoja N-1.

Uvrštavanjem strukture aktivnog spoja N-1 u navedene QSAR modele, uočava se kako ovaj spoj pokazuje razvojnu toksičnost, a njezina se vrijednost, prema modelima, kreće unutar intervala od 0,70 do 0,89. Također, ispis rezultata sugerira nepostojanje odgovarajućih

kemikalija, niti u sklopu vanjskog niti u sklopu ispitnog seta kemikalija, čiji bi koeficijent sličnosti prelazio minimalnu vrijednost od 0,5 za potrebe usporedbe. Slično se uočava kod usporedbe rezultata proračuna dobivenih primjenom modela nad strukturama pojedinih razgradnih produkata.

Temeljem predznaka te numeričkih vrijednosti razvojne toksičnosti aktivnog spoja N-1, čiji omjer m/z iznosi 343, te vrijednosti za pojedine razgradne produkte može se uočiti posjeduje li određeni spoj razvojnu toksičnost te u kojoj mjeri.

Prema dobivenim vrijednostima slijedi da polazni spoj N-1 posjeduje razvojnu toksičnost, čija vrijednost prema konzensusnoj metodi iznosi +(0,89). Uspoređujući tu vrijednosti s izračunatim vrijednostima razvojne toksičnosti za pojedine razgradne produkte, može se zaključiti da su razgradni produkti omjera $m/z = 285$, $m/z = 331$, $m/z = 359$, $m/z = 362$ te $m/z = 377$ toksičniji od polaznog spoja. Razgradni produkt $m/z = 285$ javlja se u eksperimentima fotolitičke razgradnje s udjelom nastajanja od 9,5%, dok produkta $m/z = 331$ u istom eksperimentu ima u udjelu od 4,2%. U odnosu na udjele ostalih razgradnih produkata kod fotolitičke razgradnje, može se zaključiti da prisutnost ovih razgradnih produkata nije zanemariva po pitanju toksičnosti, ali nema ni dominantni utjecaj kao što bi bio slučaj primjerice da razgradni produkt $m/z = 341$ posjeduje veću razvojnu toksičnost u odnosu na polazni spoj, s obzirom da njega nastaje najviše u fotolitičkom eksperimentu, konkretno u udjelu od 13,3%.

Razgradni produkt $m/z = 359$ nastaje u svim eksperimentima, no u relativno zanemarivom udjelu u odnosu na postotak ostalih razgradnih produkata, a posebice udio polaznog spoja, što ga ne čini presudnim uzrokom pojave razvojne toksičnosti u pojedinom sustavu, iako je numerički gledano vrijednost njegove razvojne toksičnosti dosta veća od vrijednosti kod polaznog spoja.

Razgradni produkt $m/z = 362$ nastaje u eksperimentu s vodikovim peroksidom s udjelom od 20,5%, što je usporedno gledajući s udjelima iz ostalih eksperimentalnih sustava, najveći udio. Međutim, prema vrijednosti razvojne toksičnosti, ovaj razgradni produkt nema značajniji utjecaj na biološki sustav nego li je to slučaj kod polaznog spoja.

Razgradni produkt $m/z = 377$ nastaje u gotovo zanemarivom udjelu (2,7 %) i to jedino u eksperimentu fotolitičke razgradnje, što njegovu vrijednost razvojne toksičnosti, iako je ona veća u odnosu na ostale razgradne produkte, čini irrelevantnom za određeni sustav.

U nastavku su tablicom dani sumarni rezultati proračunatih vrijednosti mutagenosti dobivenih primjenom određenog QSAR modela. Prilikom ispisa dobivenih rezultata, dobivaju se i podatci prediktivne statistike za slične kemikalije, poput stupnja podudarnosti, osjetljivosti te specifičnosti, na temelju kojih se može zaključiti o pouzdanosti primjene određene metode za procjenu mutagenosti ispitivanog spoja.

Tablica 8. Mutagenost izračunata primjenom određenog QSAR modela za aktivni spoj N-1 te njegove razgradne produkte

| Razgradni produkti aktivnog spoja N-1 | Mutagenost | | |
|--|-------------------------------|---|-------------------------------------|
| | Konkonzusna metoda | Metoda hijerarhijskog klastera | Metoda najbližeg susjeda |
| 343 | +(0,59) | N/A | -(0,33) |
| 214 | +(1,09) | +(0,75) | +(1,00) |
| 249 | +(1,00) | +(1,00) | +(1,00) |
| 266 (bez naboja) | +(0,69) | -(0,29) | +(1,00) |
| 285 | +(0,78) | +(1,22) | +(0,67) |
| 331 | +(0,75) | +(0,73) | N/A |
| 341 | -(0,10) | N/A | -(0,33) |
| 359 | +(0,69) | N/A | -(0,33) |
| 362 | -(0,50) | N/A | -(0,00) |
| 377 | +(0,72) | N/A | -(0,00) |
| 404 | +(0,63) | +(0,93) | -(0,33) |
| 486 | -(0,45) | -(0,29) | -(0,33) |

Prema vrijednostima iz prethodne tablice, konkretno gledajući vrijednosti konzensusne metode, kao prediktivno najpouzdanije, može se uočiti kako svi razgradni produkti, ukoliko su mutageni, posjeduju veću vrijednosti mutagenosti od polaznog spoja N-1. Pritom je vrijednost mutagenosti najveća kod razgradnog produkta $m/z = 214$, koji nastaje u fotolitičkom eksperimentu, u udjelu od 5,7%, što ukazuje na njegov zanemarivi doprinos sveukupnoj mutagenosti sustava. Gledajući, pak, razgradni produkt $m/z = 249$ s pripadajućom vrijednosti mutagenosti, vidljivo je kako ona uvelike odstupa od mutagenosti polaznog spoja N-1, međutim u eksperimentalnom sustavu gledajući, u uvjetima fotolitičke razgradnje, ovaj će razgradni produkt zanemarivo doprinijeti ukupnoj mutagenosti jer je njegov udio među najnižima u sustavu te iznosi 3,7%.

U oksidacijskom eksperimentu, primjerice, u značajnijem udjelu od 20,5 % nastaje razgradni produkt omjera $m/z = 362$, što bi činilo njegov doprinos ukupnoj mutagenosti u sustavu dominantnim. Međutim, prema vrijednosti iz prethodne tablice njegova mutagenost ne da nije veća od mutagenosti polaznog spoja, nego je i negativna.

4.3.4. Procjena krajnjih točaka toksičnosti spoja N-2 i njegovih razgradnih produkata

U nastavku su Tablicama 9.-11. dani rezultati procjene bioakumulacijskog faktora, razvojne toksičnosti te mutagenosti za spoj N-2 i njegove razgradne produkte, dobiveni primjenom odgovarajućeg QSAR modela.

Tablica 9. Bioakumulacijski faktor izračunat primjenom određenog QSAR modela za aktivni spoj N-2 te njegove razgradne produkte

| Razgradni produkti aktivnog spoja N-2 | Bioakumulacijski faktor | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Konczynusna metoda | Metoda hijerarhijskog klastera | Metoda najbližeg susjeda | Metoda jedinstvenog modela |
| 314 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 177 | 4,37 | 3,52 (interval 0,26-47,71) | N/A | 3,52 (interval 0,26-47,71) |
| 259 (bez naboja) | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 329 (bez naboja) | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 333 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 347 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 348 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 486 | 15,22 | N/A | 113,95 | N/A |

Temeljem Tablice 9. vidljivo je kako je primjena QSAR modela iznjedrila konkretne vrijednosti bioakumulacijskog faktora samo u slučajevima primjene određenih modela nad razgradnim produktima aktivnog spoja N-2 $m/z = 177$ i $m/z = 486$. U slučaju razgradnog produkta $m/z = 177$, usporedbom vrijednosti apsolutnih srednjih pogrešaka cijelog ispitnog seta s onom izračunatom nad kemikalijama koeficijenta sličnosti većeg ili jednakog 0,5, najmanje razlike vrijednosti MAE dobivaju se primjenom metode hijerarhijskog klastera. Kod te je upravo metode vrijednost bioakumulacijskog faktora predviđena primjenom modela najbližnja eksperimentalno dobivenoj vrijednosti za kemikaliju iz ispitnog seta. To ju, u odnosu na ostale primijenjene metode, čini pouzdanijom.

Ukoliko se, međutim, promatra razgradni produkt $m/z = 486$, konkretne se vrijednosti bioakumulacijskog faktora dobivaju samo primjenom konczynusne metode te metode

najbližeg susjeda. U oba se slučaja pronalaze kemikalije s koeficijentom sličnosti većim ili jednakim 0,5 samo u slučaju ispitnog seta te su odstupanja vrijednosti srednje apsolutne pogreške seta sličnih kemikalija u odnosu na čitav set kemikalija također slična. Iz navedenog je razloga teško zaključiti koji od ova dva modela pouzdanije procjenjuje bioakumulacijski faktor.

Konzensusna metoda daje konkretne vrijednosti bioakumulacijskog faktora samo u slučaju dvaju razgradnih produkata – $m/z = 177$, koji nastaje jedino u eksperimentu fotolitičke razgradnje i to u udjelu od 7,2% s pripadajućom vrijednosti bioakumulacije od 4,37, odnosno $m/z = 486$, čiji bioakumulacijski faktor posjeduje vrijednost od 15,22, a nastaje u eksperimentima hidrolitičke, termalne te oksidacijske razgradnje. Ovaj se razgradni produkt u sve tri vrste uvjeta prisilne razgradnje javlja u zanemarivom postotku (manjem od 1,5%), što čini njegov ukupni doprinos bioakumulaciji spoja u sustavu zanemarivim, iako je numerički gledano vrijednost faktora oko četiri puta veća nego li je to slučaj s prvim razgradnim produktom. U eksperimentu fotolitičke razgradnje udio od 7,2% za razgradni produkt $m/z = 177$ pripada manjim udjelima u odnosu na preostale razgradne produkte (razgradni produkt s najvećim udjelom javlja se u postotku od 42,3%), što ukupno promatrajući ima malen doprinos ukupnoj bioakumulaciji.

S obzirom da se niti jednom primijenjenom QSAR metodom ne dobiva konkretna vrijednost bioakumulacijskog faktora za polazni spoj N-2, nije moguće na temelju ovog svojstva procijeniti hoće li novonastali razgradni produkti biti toksičniji od polaznog spoja. Također, promatrajući vrijednosti bioakumulacijskog faktora za razgradne produkte, može se uočiti kako je ona u svim slučajevima niska, točnije manja od 30. [28]

Tablica 10. Razvojna toksičnost izračunata primjenom određenog QSAR modela za aktivni spoj N-2 te njegove razgradne produkte

| Razgradni produkti aktivnog spoja N-2 | Razvojna toksičnost | | | |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Konkonzusna metoda | Metoda hijerarhijskog klastera | Metoda najbližeg susjeda | Metoda jedinstvenog modela |
| 314 | +(0,78) | +(0,71) | N/A | +(0,69) |
| 177 | +(0,74) | +(0,74) | +(0,67) | +(0,75) |
| 259 (bez naboja) | +(0,60) | +(0,66) | N/A | +(0,62) |
| 329 (bez naboja) | +(0,80) | +(0,82) | N/A | +(0,76) |
| 333 | +(0,87) | +(0,98) | -(0,33) | +(0,88) |
| 347 | N/A | N/A | -(0,33) | N/A |
| 348 | +(0,94) | +(0,81) | N/A | +(1,03) |
| 486 | +(0,53) | N/A | +(0,67) | N/A |

Proračun razvojne toksičnosti spoja N-2 te nastalih razgradnih produkata daje uglavnom pozitivne rezultate te konkretne vrijednosti primjenom algoritma svih korištenih metoda. Dakle, polazni spoj omjera m/z od 314 pokazuje razvojnu toksičnost, koja prema konzensusnoj metodi iznosi +(0,78). Razgradni produkti koji su toksičniji od polaznog spoja imaju omjere m/z u iznosima $m/z = 329$, $m/z = 333$ te $m/z = 348$, a nastaju u eksperimentima fotolitičke te oksidacijske razgradnje. Razgradni produkt $m/z = 329$ nastaje u fotolitičkom eksperimentu s pripadajućom srednjom vrijednosti udjela od 19,0%, a u istom eksperimentu u znatno manjem udjelu od 6,8%, nastaje i razgradni produkt $m/z = 333$. Gledajući vrijednosti razvojne toksičnosti, ona je neznatno veća od polaznog spoja za razgradni produkt $m/z = 329$, međutim s obzirom da on čini petinu sustava poslije provedbe eksperimenta, može se zaključiti kako znatnije pridonosi ukupnoj toksičnosti sustava. S druge strane, nešto toksičniji razgradni produkt $m/z = 333$ nastaje u najmanjem udjelu u spomenutom eksperimentu, što doprinosi njegove veće vrijednosti toksičnosti ukupnoj toksičnosti sustava čini manjom.

Naposljetku, razgradni produkt $m/z = 348$ ima najveću numeričku vrijednost razvojne toksičnosti u usporedbi s ostalim razgradnim produktima od $+(0,94)$, koja ga čini toksičnijim i od polaznog spoja, međutim postotak u kojem ovaj spoj nastaje u eksperimentima fotolitičke razgradnje uistinu je zanemariv (0,8%).

Tablica 11. Mutagenost izračunata primjenom određenog QSAR modela za aktivni spoj N-2 te njegove razgradne produkte

| Razgradni produkti aktivnog spoja N-2 | Mutagenost | | |
|--|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | Konczynusna metoda | Metoda hijerarhijskog klastera | Metoda najbližeg susjeda |
| 314 | $-(0,15)$ | N/A | $+(0,67)$ |
| 177 | $+(0,76)$ | $+(0,76)$ | $+(1,00)$ |
| 259 (bez naboja) | $+(0,97)$ | N/A | $+(1,00)$ |
| 329 (bez naboja) | $+(0,66)$ | N/A | $+(0,67)$ |
| 333 | $+(0,67)$ | N/A | $-(0,33)$ |
| 347 | N/A | N/A | $+(0,67)$ |
| 348 | $+(0,87)$ | N/A | $+(0,67)$ |
| 486 | $-(0,45)$ | $-(0,29)$ | $-(0,33)$ |

Naposljetku, Tablicama 10. i 11. dani su numerički rezultati izračuna svojstava razvojne toksičnosti i mutagenosti, dobiveni primjenom određenog QSAR modela nad razgradnim produktima aktivnog spoja N-2. Generalno gledajući, vrijednosti razvojne toksičnosti dobivene proračunom ne odstupaju značajnije promjenom primijenjene metode te se za većinu razgradnih produkata može tvrditi da će QSAR analiza, neovisno o korištenom algoritmu, daju konkretne vrijednosti ovog svojstva. Kod promatranja rezultata mutagenosti vidljivo je, međutim, da se javljaju značajnija odstupanja u rezultatima proračuna za veći broj testiranih spojeva, a vrijedi i primijetiti kako se primjenom metode hijerarhijskog klastera konkretne vrijednosti mutagenosti dobivaju samo u dva od ukupno osam promatranih slučajeva.

Promatrajući vrijednosti mutagenosti polaznog spoja N-2 zanimljivo je primijetiti kako konzensusna metoda daje negativnu vrijednost mutagenosti koja je po apsolutnoj vrijednosti oko 4,5 puta manja od pozitivne vrijednosti mutagenosti dobivene primjenom metode najbližeg susjeda. S obzirom da je mutagenost, numerički gledano, preciznije proračunata primjenom konzensusne metode, ova će metode biti primijenjena za potrebe daljnje usporedbe dobivenih vrijednosti. Dakle, svi nastali razgradni produkti spoja N-2 mutageniji su od polaznog spoja, pri čemu najveću vrijednost mutagenosti posjeduje spoj omjera $m/z = 259$, koji se javlja kod svih eksperimentalnih uvjeta. Pritom je postotak njegova nastanka uistinu zanemariv (manji od 1,5%) u svim eksperimentima, izuzev eksperimenta fotolitičke razgradnje u kojem ga nastaje najviše, i to u udjelu od 42,3%. Stoga se može zaključiti kako izlaganje spoja N-2 UV/VIS zračenju dovodi do nastanka veoma toksičnog razgradnog produkta koji čini gotovo polovinu promatranog sustava.

Sljedeći je razgradni produkt po mutagenosti omjera m/z u iznosu od 348, a nastaje u zaista zanemarivom udjelu od 0,8% pri oksidacijskim uvjetima. To opet čini njegovu prisutnost u sustavu irrelevantnom u odnosu na polazni spoj. Poslije njega, prema padajućoj pozitivnoj vrijednosti mutagenosti, slijedi razgradni produkt $m/z = 177$, koji je po svojem udjelu nastanka drugi u fotolitičkom eksperimentalnom sustavu. S vrijednošću mutagenosti od +(0,76) te udjelom nastanka od 7,2%, doprinos ukupnoj mutagenosti ovog razgradnog produkta može se smatrati malenim.

Naposljetku, razgradni produkti $m/z = 329$ te $m/z = 333$ posjeduju slične vrijednosti mutagenosti od +(0,66) te +(0,67), pri čemu prvi razgradni produkt čini gotovo petinu fotolitičkog eksperimentalnog sustava, dok drugi nastaje i pri utjecaju UV/VIS zračenja u malenom udjelu od 6,8%, odnosno pri utjecaju oksidansa vodikovog peroksida u zanemarivom udjelu od 0,9%. To, logično, čini utjecaj prisutnosti razgradnog produkta $m/z = 329$ na ukupnu mutagenost jačim od onog kod razgradnog produkta $m/z = 333$, unatoč gotovoj identičnoj numeričkoj vrijednosti.

U konačnici proizlazi da se ispitivane molekule mogu uzeti u razmatranje za daljnja ispitivanja te potencijalnu implementaciju u novim farmaceutskim proizvodima s obzirom da analiza rezultata provedenih eksperimenata navodi na konkretne zaključke o toksičnosti pojedinog razgradnog produkta te njegovu doprinosu sustavu u cjelini. Posebice su vrijedni oni rezultati koji upućuju na nastajanje razgradnih produkata veće toksičnosti od polaznog farmaceutika jer se na temelju njih može zaključiti pri kojim okolišnim uvjetima, u kojem udjelu te kojim intenzitetom će se mijenjati biološka aktivnost spojeva.

5. ZAKLJUČAK

Stabilnost novosintetiziranih organskih spojeva u radu je ispitana njihovim podvrgavanjem uvjetima prisilne razgradnje. Provedbom eksperimenata hidrolitičke, fotolitičke i termalne razgradnje te onih u prisutnosti vodikovog peroksida, nastali razgradni produkti detektirani su na spektrometru masa visoke razlučivosti. Na temelju dobivenih rezultata, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ❖ Novosintetizirani spojevi, amino supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolini, teško su topljivi spojevi, čije se otapanje u radu pospješilo upotrebom odgovarajućeg otapala. Od dvaju korištenih, acetonitrila i metanola, spojevi su pokazali veću topljivost u metanolu.
- ❖ Analizom aktivnog spoja N-1 molarne mase od 343,4 g/mol uočeno je kako se isti pojavljuje na vremenu zadržavanja, $t_R = 4,071$ min.
- ❖ Provedbom spektrometrijske analize uzoraka spoja N-1 poslije podvrgavanja postupcima prisilne razgradnje, utvrđena je pojava 11 razgradnih produkata, od kojih se neki pojavljuju u više eksperimenata, poput razgradnog produkta $m/z = 358$, čija se pojava uočava u svim eksperimentima.
- ❖ Fotolitičkom razgradnjom spoja N-1 nastaje najviše razgradnih produkata (10).
- ❖ Oksidacijom spoja N-1, u prisutnosti vodikovog peroksida, pojavljuju se dva razgradna produkta.
- ❖ Hidrolitičkom razgradnjom spoja N-1, i u kiselom, i u lužnatom mediju, nastaje po jedan razgradni produkt.
- ❖ Termalna razgradnja spoja N-1 rezultirala je nastankom triju razgradnih produkata, i to u eksperimentu provedenom nad uzorkom čvrste soli. Kao rezultat eksperimenta s otopinom soli na 80 °C pojavljuje se samo jedan razgradni produkt.
- ❖ Analizom aktivnog spoja N-2 molarne mase od 314,4 g/mol uočeno je kako se isti pojavljuje na vremenu zadržavanja, $t_R = 8,907$ min.

- ❖ Provedbom postupaka prisilne razgradnje nad uzorcima spoja N-2 te njihovom analizom na spektrometru masa visoke razlučivosti utvrđena je pojava 7 razgradnih produkata, od kojih neki nastaju u više eksperimenata poput razgradnog produkta $m/z = 259$, koji se pojavljuje u svim eksperimentima.
- ❖ Oksidacijskom razgradnjom spoja N-2 u prisutnosti vodikovog peroksida nastaje najviše razgradnih produkata (5).
- ❖ Fotolitička razgradnja spoja N-2 iznjedrila je četiri razgradna produkta.
- ❖ Hidrolitička je razgradnja spoja N-2, kako u kiselim, tako i u lužnatim uvjetima, dovela do nastanka dvaju razgradnih produkata.
- ❖ Termalnom razgradnjom spoja N-2 nastaju dva razgradna produkta.
- ❖ Primjenom određenog QSAR modela, procijenjene su nepoznate vrijednosti svojstava bioakumulacijskog faktora, razvojne toksičnosti te mutagenosti za ispitivane aktivne spojeve te njihove razgradne produkte. Pritom se najčešće korištenom metodom čiji je algoritam davao konkretne vrijednosti proračuna pokazala konzensusna metoda, poznata po svojoj pouzdanosti temeljenoj na uzimanju prosječnih vrijednosti procijenjenih svojstava primjenom ostalih QSAR modela, poput modela hijerarhijskog klastera, jedinstvenog modela, modela najbližeg susjeda ili, pak, modela doprinosa grupe.
- ❖ Promatrajući bioakumulacijski faktor, kod svih se spojeva može zaključiti da je njegova vrijednost niska, izuzev razgradnog produkta spoja N-1 omjera $m/z = 266$ koji nastaje u fotolitičkom eksperimentu u postotku od 8,5% te posjeduje bioakumulacijski faktor u vrijednosti od 39,91. Ova vrijednost pripada rasponu srednjih vrijednosti od 30 do 100.
- ❖ Procjena vrijednosti razvojne toksičnosti upućuje na zaključak da oba novosintetizirana spoja posjeduju razvojnu toksičnost, čija je vrijednost u pojedinim slučajevima manja od vrijednosti razvojne toksičnosti nastalih razgradnih produkata.
- ❖ U slučaju spoja N-1, najviše toksičnijih razgradnih produkata nastaje fotolitičkom razgradnjom, a to su spojevi $m/z = 285$, $m/z = 331$, $m/z = 359$, $m/z = 362$ te $m/z = 377$,

čiji udio ne prelazi 10%. Pritom najveće vrijednosti razvojne toksičnosti posjeduju spojevi $m/z = 359$ te $m/z = 377$, i to u vrijednosti $+(1,25)$ te $+(1,17)$. Iako su te vrijednosti značajnije u odnosu na polazni spoj, nisu dominantne u cijelom sustavu jer ovi razgradni produkti nastaju u većini slučajeva u zanemarivo malom postotku. Produkt $m/z = 359$ nastaje u svim eksperimentima te njegov udio ne prelazi vrijednost od 11%.

- ❖ Ispitivanjem spoja N-2 i njegovih razgradnih produkata, produkti veće toksičnosti od polaznog spoja su $m/z = 329$, $m/z = 333$ te $m/z = 348$, koji nastaju u uvjetima fotolitičke i oksidacijske razgradnje. Pritom razgradni produkt $m/z = 333$ nastaje u oba eksperimenta, u malom ili zanemarivo malom udjelu, čime ne doprinosi značajnije ukupnoj toksičnosti sustava, unatoč svojoj najvećoj vrijednosti toksičnosti od $+(1,09)$. S druge strane, petinu fotolitičkog eksperimentalnog sustava čini razgradni produkt $m/z = 329$, čija je vrijednost razvojne toksičnosti nešto veća od toksičnosti polaznog spoja te iznosi $+(0,80)$. To navodi na zaključak da će prisutnost ovog produkta značajnije doprinijeti porastu toksičnosti cijelog sustava. Naposljetku, produkt $m/z = 348$ nastaje u zanemarivo malom udjelu u eksperimentu oksidacijske razgradnje, što čini njegov doprinos ukupnoj toksičnosti zanemarivim, unatoč visokoj vrijednosti toksičnosti od $+(0,94)$.
- ❖ Promatrajući svojstvo mutagenosti, spoj N-1 je mutagen, pri čemu se za njegove razgradne produkte može tvrditi da su, ukoliko i oni posjeduju mutagenost, mutageniji od polaznog spoja. Pritom najveću mutagenost, gotovo dva puta veću od polaznog spoja, posjeduju razgradni produkti $m/z = 214$ te $m/z = 249$, no koji nastaju u malom udjelu u fotolitičkom eksperimentu, što u konačnici čini njihov doprinos ukupnoj mutagenosti sustava malim.
- ❖ U slučaju spoja N-2, promatrajući prema koncenzusnoj metodi gotovo su svi razgradni produkti mutageniji od nemutagenog polaznog spoja, pri čemu najpozitivniju vrijednost mutagenosti posjeduju razgradni produkti $m/z = 177$ te $m/z = 259$. Produkt $m/z = 177$ nastaje u fotolitičkom eksperimentu s udjelom od 7,2% te vrijednosti mutagenosti od $+(0,76)$. Iako je mutagenost ovog spoja značajnija, njegov je udio u sustavu mali, što smanjuje doprinos ukupnoj mutagenosti eksperimentalnog sustava. S druge strane, razgradni produkt $m/z = 259$ pojavljuje se pri svim eksperimentalnim

uvjetima, s najvećom vrijednošću mutagenosti od $+ (0,97)$. Pritom vrijedi napomenuti da je postotak nastanka ovog razgradnog produkta zanemarivo malen u svim eksperimentalnim sustavima, izuzev fotolitičkog kod kojeg iznosi 42,3%. Time svojom pojavom u sustavu značajno doprinosi ukupnoj mutagenosti.

Primjenom računalnih programa, poput u radu korištenog software-a za procjenu toksičnosti TEST, moguće je primjenom odgovarajućih modela te bez upotrebe dodatnih programa, predvidjeti rizike kojima su izloženi organizmi u kontaktu s ispitivanim spojevima ili, pak, registrirati nove kemijske tvari. Međutim, s obzirom da spomenute metode rade na principu modela dobivenih primjenom strukturalno, manje ili više, sličnih kemikalija, one ne mogu u potpunosti zamijeniti stvarna, eksperimentalna testiranja.

6. LITERATURA

- [1] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02962> (Pristup: 31. 3. 2020.)
- [2] <https://en.wikipedia.org/wiki/Benzimidazole> (Pristup: 31. 3. 2020.)
- [3] <https://www.drugbank.ca/structures/DB02962/image.svg> (Pristup: 31. 3. 2020.)
- [4] https://www.drugbank.ca/structures/small_molecule_drugs/DB02962 (Pristup: 31. 3. 2020.)
- [5] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzimidazole#section=Other-Experimental-Properties> (Pristup: 31. 3. 2020.)
- [6] <http://struna.ihjj.hr/naziv/antiproliferativno-djelovanje/40890/> (Pristup: 31. 3. 2020.)
- [7] N. Perin, R. Nhili, M. Cindrić, B. Bertoša, D. Vušak, I. Martin-Kleiner, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M.H. David-Cordonnier, M. Hranjec, Amino substituted benzimidazo[1,2-*a*]quinolines: Antiproliferative potency, 3D QSAR study and DNA binding properties, *European Journal of Medicinal Chemistry* **122** (2016) 530-545.
- [8] N. Perin, R. Nhili, K. Ester, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. H. David-Cordonnier, M. Hranjec, Synthesis, antiproliferative activity and DNA binding properties of novel 5 Aminobenzimidazo[1,2-*a*]quinoline-6-carbonitriles, *European Journal of Medicinal Chemistry* **80** (2014) 218-227.
- [9] N. Perin, I. Martin-Kleiner, R. Nhili, W. Laine, M. H. David-Cordonnier, O. Vugrek, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec, Biological activity and DNA binding studies of 2-substituted benzimidazo[1,2-*a*]quinolines bearing different amino side chains, *Med. Chem. Commun.* **4** (2013) 1537–1550.
- [10] Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), International Conference on Harmonisation 2006., str. 1.-3.
- [11] D.W. Reynolds, K.L. Facchine, J.F. Mullaney, K.M. Alsante, T.D. Hatajik, M.G. Motto, Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies *Pharmaceutical Technology*, 2002.
- [12] E. Tamizi, A. Jouyban, Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **98** (2016) 26-46.

- [13] Introduction to drug impurities and their quantification in pharmaceutical dosage, Chapter 1, https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/22707/6/06_chapter%201.pdf (Pristup: srpanj 2020.)
- [14] B. Prathap, A. Dey, G. S. Rao, T. Sundarrajan, S. Hussain, A Review on Impurity Profile in Pharmaceutical Substances, Research and Reviews, Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **2** (3) (2013) 19-25.
- [15] B. Nigović, M. Sertić, Onečišćenja u lijekovima, Farmaceutski glasnik, **68** (2012) 77-88.
- [16] H. Olson, G. Betton, D. Robinson, K. Thomas, A. Monro, G. Kolaja, P. Lilly, J. Sanders, G. Sipes, W. Bracken, M. Dorato, K. Van Deun, P. Smith, B. Berger, A. Heller, Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals, Regulatory Toxicology and Pharmacology **32** (2000) 56-67.
- [17] T. Borojević, D. Ašperger, D. Dolar, Određivanje toksičnosti ksenobiotika u vodi, Kem. Ind. **67** (13) (2018) 135-142.
- [18] <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/vibrio-fischeri> (Pristup: 16. 7. 2020.)
- [19] Martin, T., P. Harten, and D. Young. TEST (Toxicity Estimation Software Tool) Ver 4.1. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/C-12/006, 2012.
- [20] <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test#methodologies> (Pristup: 16. 7. 2020.)
- [21] T. Martin, User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool), A Program to Estimate Toxicity from Molecular Structure, U.S. Environmental Protection Agency, 2016., str. 9.-12. (Pristup: 30. 7. 2020.)
- [22] https://www.mt.com/sg/en/home/phased_out_products/Laboratory_Weighing/Analytical_Balances/XA_Analytical_Balance/XA_105_DU.tabs.documents.html (Pristup: 20. 5. 2020.)
- [23] https://www.mt.com/dam/P5/labtec/02_Analytical_Balances/05_XA/03_Documentations/03_Operatin

g_Instructions/OI_XA_Analytical_Part_1_EN.pdf, str. 25-26 (Pristup: 20. 5. 2020.)

[24] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z659002?lang=en®ion=HR>
(Pristup: 4. 6 . 2020.)

[25] <https://www.atlas-mts.com/products/standard-instruments/xenon-weathering/suntest/cps>
(Pristup: 4. 6. 2020.)

[26] Conforming to the ICH Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Drug Products (ICH Q1B) Using the Atlas SUNTEST CPS+, str. 8.

[27] ICH Topic Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products, 1998. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (Pristup: srpanj 2020.)

[28] 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.

7. ŽIVOTOPIS

Mia Gotovuša [REDACTED] Poslije osnovnoškolskog obrazovanja stečenog u Osnovnoj školi Ivan Goran Kovačić u Zagrebu, upisuje matematički smjer na zagrebačkoj prirodoslovno-matematičkoj V. gimnaziji, koju završava maturom 2015. godine. Iste godine upisuje i preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Od rujna 2013. godine te za vrijeme gimnazijskog i prve dvije godine fakultetskog obrazovanja korisnica je učeničke Stipendije Grada Zagreba, a na 3. godini preddiplomskog studija dodijeljena joj je studentska Stipendija Grada Zagreba.

Proglašena je najboljom studenticom po godinama studija, primivši Dekanova priznanja za najbolju studenticu prve (2015./2016.), druge (2016./2017.) i treće (2017./2018.) godine preddiplomskih studija Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Također, dodijeljeno joj je i Dekanovo priznanje za najbolju studenticu preddiplomskog studija Kemijsko inženjerstvo generacija 2017./2018.

Tijekom preddiplomskog studija odlazi na stručnu praksu koju odrađuje u Končaru – Institutu za elektrotehniku, odnosno u njihovom Laboratoriju za fizikalno kemijska ispitivanja.

Obranom završnog rada 6. rujna 2018. godine na temu „Sorpcija cefdinira na prirodne uzorke tla i sedimente“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović, završava sveučilišni preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva te stječe akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke kemijskog inženjerstva, s najvećom pohvalom (summa cum laude).

Na diplomskom studiju Kemijskog inženjerstva, modul Kemijske tehnologije i proizvodi, upisanom u rujnu 2018. godine, kroz eksperimentalni rad primjenom metoda elektrokemijske kvarc-kristalne mikrovage te elektrokemijske impedancijske spektroskopije na projektu Zavoda za elektrokemiju u sklopu kolegija Kemijsko inženjerske vježbe sudjeluje na kongresima „9th ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry“ u Zagrebu te „7th Regional Symposium on Electrochemistry of South-East Europe“ u Splitu, posterskim priopćenjem na temu „Istraživanje stabilnosti zaštitnih filmova fosfonske kiseline na različitim metalnim podlogama“.

Za individualni znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2018./2019. na temu „Fotokatalitička razgradnja diazepama s imobiliziranim TiO₂“, izrađen na Zavodu za analitičku kemiju, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović, nagrađena je

3. srpnja 2019. godine Rektorovom nagradom, a kao najboljoj studentici 1. godine diplomskih studija (2018./2019.) dodijeljena joj je Dekanova nagrada.

Tijekom posljednje godine diplomskog studija radi preko Student servisa na pomoćnim poslovima u Pilot postrojenju Plive, na Odjelu istraživanja i razvoja, gdje joj je kroz praktičan rad pružena prilika upoznavanja s laboratorijskim postupcima obrade farmaceutski aktivnih tvari. Od analitičkih se metoda, pritom, služila tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama te Ramanovom spektroskopijom.

Od stranih jezika koristi se engleskim u govoru i pismu. U radu na računalu koristi se programskim paketom Microsoft Office (Wordom, Excelom te PowerPointom) i programom Origin. Također ima iskustva i u programiranju koristeći Python, Matlab i Scilab, u projektiranju koristeći ChemCAD te u crtanju i procjeni toksičnosti organskih spojeva pomoću računalnih programa ChemDRAW i TEST.