

# Ispitivanje stabilnosti amidino supstituiranih derivata benzotiazola spektrometrijom masa visoke razlučivosti

---

Lukač, Ivan

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:149:866018>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidat Ivan Lukač

Predao je izrađen diplomski rad dana: 22. rujna 2020.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Izv. prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Marijana Hranjec, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 25. rujna 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivan Lukač

DIPLOMSKI RAD

**Ispitivanje stabilnosti amidino supstituiranih derivata benzotiazola  
spektrometrijom masa visoke razlučivosti**

Zagreb, rujan 2020.

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

Uz nezamjenjivu ulogu koju farmaceutici imaju u medicini važno je imati na umu često negativni efekt koji njihova proizvodnja i ispuštanje imaju na okoliš. Nepoznati spojevi koji predstavljaju potencijalne nove farmaceutske proizvode je s toga važno proučavati s obzirom na nedostatak eksperimentalnih podataka koji postoje o njihovoj mogućoj štetnosti za okoliš i zdravlje ljudi.

Kako bi se maksimalno zaštitili okoliš i ljudsko zdravlje pri proizvodnji, uporabi i zbrinjavanju farmaceutika važno je dobiti što bolje rezultate o njihovoj mogućoj štetnosti. Problem leži u tome što je broj novih organskih spojeva koji se sintetiziraju u industriji ogroman, a klasična testiranja su skupocjena, dugotrajna i potencijalno etički problematična s obzirom na uporabu testnih životinja. S toga se sve više nastoji računalno procijeniti potencijalna štetnost novih spojeva.

Za procjenu moguće štetnosti, promatrani novosintetizirani spojevi LD-1 i LD-2, amidino supstituirani derivati benzotiazola, izloženi su oksidacijskim, kiselim i lužnatim uvjetima te UV/VIS zračenju i povišenim temperaturama kako bi došlo do njihove prisilne razgradnje. Tako tretirani uzorci su se zatim analizirali pomoću 2D-UHPLC-QTOF sustava i iz dobivenih kromatograma i spektra masa pretpostavljeni su njihovi razgradni produkti te predloženi razgradni putevi. Početni spojevi LD-1 i LD-2 kao i njihovi potencijalni razgradni produkti podvrgnuli su se testiranju primijenom T.E.S.T. programskog paketa s ciljem procijene bioakumulacijskog faktora, razvojne toksičnosti i mutagenosti.

T.E.S.T. je programski paket kojeg je američka agencija za zaštitu okoliša izdala kao besplatni softver za procjenu opasnosti organskih kemikalija da ugroze zdravlje ljudi ili oštete okoliš. Matematički modeli koje metode procjene u T.E.S.T.-u uspoređuju analizirane molekule s poznatim molekulama u bazi podataka na temelju velikog broja fizičkih deskriptora. Ovaj pristup omogućuje brzu, jeftinu i jednostavnu procjenu opasnosti neke molekule za zdravlje ljudi ili okoliš.

**Ključne riječi:** amidino supstituirani benzotiazoli, forsirana razgradnja, T.E.S.T., procjena toksičnosti

## ABSTRACT

### **Stability testing of amidino substituted benzothiazole derivatives by high resolution mass spectrometry**

With the irreplaceable role which pharmaceuticals have in medicine it is important to keep in mind the frequently negative effects of their production and release can have on the environment. Unknown compounds which represent potentially new pharmaceutical products are therefore important to study given the lack of experimental data that exists for their potential harmfulness to the environment and the health of humans.

In order to maximally protect the environment and human health in the production, usage and disposal of pharmaceuticals it is important to get the best possible results about their harmfulness. The problem lies in the fact that the number of new organic compounds synthesized in the industry is enormous and classical testing is expensive, time consuming and potentially ethically problematic in regards to the usage of test animals. Hence there is a striving to use computational estimates of potential harmfulness of new compounds.

For the estimation of the possible harmfulness of the new synthesized compounds LD-1 and LD-2, amidino substituted benzothiazoles, they were exposed to oxidative, acidic and basic conditions in addition to being exposed to UV/VIS radiation and high temperatures in order to bring about their forced degradations. Samples treated in such a way were analyzed with the help of a 2D-UHPLC-QTOF system and from the resulting chromatograms and mass spectra their degradation products are assumed and degradation pathways were suggested. The starting compounds LD-1 and LD-2 as well as their potential degradation products were analyzed using T.E.S.T. software package in order to estimate the bioaccumulation factor, developmental toxicity and mutagenicity.

T.E.S.T. is a program package which the American environmental protection agency has released for free as a piece of software for the estimation of the danger organic chemicals pose to human health and the environment. The mathematical models which the estimation methods incorporated into T.E.S.T. compare the analyzed molecules with known molecules in the database based on a large number of physical descriptors. This approach allows for quick, cheap and simple risk estimates of a molecule for human health or the environment.

**Key words:** amidino substituted benzothiazoles, forced degradation, T.E.S.T., toxicity estimation

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	3
<b>2.1. UPORABA BENZOTIAZOLNIH DERIVATA KAO LIJEKOVA</b> .....	4
<b>2.1.1. SVOJSTVA I DJELOVANJE BENZOTIAZOLNIH DERIVATA</b> .....	4
<b>2.1.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST</b> .....	5
<b>2.2. FORSIRANA RAZGRADNJA [4]</b> .....	6
<b>2.2.1. PROVOĐENJE FORSIRANJE RAZGRADNJE [4]</b> .....	7
<b>2.2.2. ODABIR UVJETA ZA PROVOĐENJE FORSIRANE RAZGRADNJE [4]</b> .....	7
<b>2.3. UVJETI RAZGRADNJE</b> .....	8
<b>2.3.1. HIDROLITIČKI UVJETI [5, 6]</b> .....	8
<b>2.3.2. OKSIDACIJSKI UVJETI [6, 7]</b> .....	8
<b>2.3.3. FOTOLITIČKI UVJETI [8]</b> .....	9
<b>2.3.4. TERMALNI UVJETI [6, 9, 10]</b> .....	9
<b>2.4. SPEKTROMETRIJA MASA [11]</b> .....	10
<b>2.4.1. IONIZACIJSKE TEHNIKE [11]</b> .....	10
<b>2.4.1.1. ESI [11]</b> .....	11
<b>2.4.1.2. MALDI [11]</b> .....	12
<b>2.4.2. ANALIZATORI MASA [11]</b> .....	12
<b>2.4.2.1. KVADRIPOLNI ANALIZATOR (Q) [11]</b> .....	13
<b>2.4.2.2. ANALIZATOR VREMENA PRELETA (TOF) [11]</b> .....	13
<b>2.4.2.3. HIBRIDNI ORTOGONALNI KVADRIPOLNI SPEKTROMETRI MASA S         MJERENJEM VREMENA PRELETA (Q-TOF)</b> .....	14
<b>2.5. METODA ODREĐIVANJA STABILNOSTI [13]</b> .....	16
<b>2.5.1. DOBIVANJE UZORAKA [14]</b> .....	16
<b>2.5.2. RAZVOJ METODE I OPTIMIZACIJA</b> .....	16
<b>2.5.3. VALIDACIJA METODE [18]</b> .....	17
<b>2.6. TOKSIČNOST I UTJECAJ NA OKOLIŠ [19]</b> .....	17
<b>2.6.1. ORGANIZMI ZA ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI [19]</b> .....	18
<b>2.6.1.1. BAKTERIJE [19]</b> .....	18
<b>2.6.1.2. ALGE [19]</b> .....	18
<b>2.6.1.3. BESKRALJEŽNJACI [19]</b> .....	18
<b>2.6.1.4. RIBE [19]</b> .....	19
<b>2.7. RAČUNALNI PROGRAMI PROCJENE TOKSIČNOSTI [19]</b> .....	19

2.7.1.	QSAR MODELI [19]	19
2.7.2.	T.E.S.T. PROGRAMSKI PAKET [19]	20
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1.	MATERIJALI	24
3.1.1.	KEMIKALIJE	24
3.2.	INSTRUMENTI	25
3.2.1.	ANALITIČKA VAGA	25
3.2.2.	ULTRAZVUČNA KUPELJ	25
3.2.3.	SUŠIONIK	26
3.2.4.	SUNSET CPS+	26
3.2.5.	TEKUĆINSKI KROMATOGRAF VEZAN NA SPEKTROMETAR MASA (LC/ESI-QTOF)	27
3.3.	OPIS RADA	28
3.3.1.	PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA UZORAKA	28
3.3.2.	EKSPERIMENTI PRISILNE RAZGRADNJE	28
3.3.2.1.	HIDROLIZA	28
3.3.2.2.	OKSIDACIJA	28
3.3.2.3.	TERMALNA RAZGRADNJA	29
3.3.2.4.	FOTOLIZA	29
3.3.2.	ANALIZA UZORAKA SPEKTROMETRIJOM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1.	IDENTIFIKACIJA PRODUKATA NASTALIH PRISILNOM RAZGRADNjom	32
4.1.1.	IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA SPOJA LD-1	32
4.1.2.	IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA SPOJA LD-2	39
4.2.	PROCJENA TOKSIČNOSTI RAZGRADNIH PRODUKATA	45
4.2.1.	PROCJENA TOKSIČNOSTI LD-1 I NJEGOVIH RAZGRADNIH PRODUKATA	46
4.2.2.	PROCJENA TOKSIČNOSTI LD-2 I NJEGOVIH RAZGRADNIH PRODUKATA	57
5.	ZAKLJUČAK	66
6.	LITERATURNI IZVORI	69
7.	ŽIVOTOPIS	73



# **1.UVOD**

U ovom radu su proučavani benzotiazolni spojevi u uvjetima forsirane razgradnje kako bi se procijenio njihov utjecaj na zdravlje ljudi i okoliš.

S obzirom na njihova farmakološka i ljekovita svojstva amidino supstituirani derivati benzotiazola predstavljaju obećavajuću skupinu spojeva u farmaceutskoj industriji, no potrebno je imati na umu potencijalni štetan utjecaj na okoliš i ljude njihovim ispuštanjem u vode.

Nakon izlaganja uvjetima forsirane razgradnje osnovni spojevi LD-1 i LD-2 te njihovi razgradni produkti su analizirani na kromatografskom sustavu visoke djelotvornosti povezanom na spektrometar masa visoke razlučivosti. Pomoću dobivenih rezultata određene su moguće strukture razgradnih produkata koje su se dalje analizirale računalnim programima.

Pomoću tih predloženih razgradnih puteva spoja LD-1 i LD-2 je primjenom T.E.S.T. programskog paketa provedena procjena bioakumulacijskog faktora, razvojne toksičnosti i mutagenosti. Dok su mutagenost i razvojna toksičnost procijenjeni bez većih problema T.E.S.T. se pokazao kao nedostatan za analizu bioakumulacijskog faktora velikog broja spojeva.

## **2.OPĆI DIO**

## **2.1. UPORABA BENZOTIAZOLNIH DERIVATA KAO LIJEKOVA**

U posljednjih dvadeset godina sintetiziran je velik broj heterocikličkih derivata benzotiazola te se njihova biološka i farmakološka aktivnost istražuje u svrhu razvoja medicinske kemije i dobivanja novih farmaceutika. U velikoj mjeri su se promatrala njihova protualergijska, protuupalna, protutumorska i analgetička djelovanja. Dokazano je da efikasnost cijano, amidno i amino supstituiranih benzotiazolnih derivata uvelike ovisi o položaju supstituenta na strukturi benzotiazola te o vrsti supstituenta koje se veže na osnovnu molekulu. [1]

DNK i RNK su mete biološkog djelovanja mnogih lijekova koji se koriste u terapijama za liječenje raka. Razvoj takvih molekula, koje mogu selektivno djelovati na tumorske DNK i RNK molekule predstavlja obećavajući smjer razvoja novih lijekova. [2]

Među protutumorskim lijekovima s takvim načinom djelovanja a koji su otkriveni u posljednjih nekoliko godina, benzotiazolni derivati su privukli značajnu pažnju u istraživanju lijekova protiv raka. Bilo je više pokušaja da se modificiraju benzotiazolni spojevi kako bi se poboljšala njihova protutumorska aktivnost, među njima tako i amidno supstituiranih derivata benzotiazola. [3]

### **2.1.1. SVOJSTVA I DJELOVANJE BENZOTIAZOLNIH DERIVATA**

U svrhu dobivanja benzotiazolnih derivata koji djeluju na RNK/DNK tumorskih stanica pokazale su se korisne male molekule bojila, lijekova i metalnih kompleksirajućih spojeva koji se mogu koristiti za prepoznavanje strukture i funkcije nukleinske kiseline jer se zbog promjene spektroskopskih, elektrokemijskih i drugih svojstava može ispitati njihova reakcija s DNK/RNK. [2]

Ovisno o položaju, broju i vrsti supstituenta na benzotiazolnim spojevima, mogu se značajno promijeniti njihova svojstva i djelovanje na žive stanice. U jednom istraživanju u kojem je fenilni prsten vezan za benzotiazolnu jezgru primijećena je razlika aktivnosti spojeva ovisno o tome da li je amidinski supstituent vezan za fenilni prsten ili za benzotiazolni prsten. Uz to se razlika u korištenim supstituentima odrazila na aktivnost i na selektivnost te citotoksičnost spoja. Broj i priroda supstituenta utjecala je i na aktivnost i selektivnost citotoksičnosti spoja.

Kada se na promatrani benzotiazolni derivat vezao imidazolilni supstituent i to na fenilni i benzotiazolni prsten, došlo je do povećanja aktivnosti spoja ali i smanjenje selektivnosti citotoksičnosti. [1]

Kao organski spojevi, benzotiazolni derivati su u pravilu slabo topljivi u vodi što ih čini neprikladnim za moguću uporabu kao lijekova. Jedna od mogućnosti rješavanja ovog problema je njihovo prevođenje u polarne soli koje u velikoj većini slučajeva imaju bolju topljivost u vodenim medijima. Ako se spojevi provode u soli važno je izabrati farmaceutski prikladne protuione. [2]

### **2.1.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Citotoksičnost i genotoksičnost lijekova protiv raka prema običnim ljudskim stanicama predstavljaju velike probleme u terapijama tretiranja raka i često dovode do opasnosti od metastaziranja i pojavljivanja sekundarnog raka. Iz tog razloga se predaje veliki značaj otkrivanju i razvoju lijekova sa što manjom citotoksičnošću za obične ljudske stanice i sposobnošću da efektivno uzrokuju apoptozu u stanicama raka.

Istraživanja su pokazala da derivati benzotiazola imaju dobro antitumorsko djelovanje i u jednom istraživanju deset različitih benzotiazolnih derivata velika većina njih se pokazala uspješnom u induciranju apoptoze stanica raka. Amidni supstituenti ovisno o vrsti stanica raka, imaju različite razine efikasnosti od srednje do visoke.

Amidino supstituirani benzotiazoli su se pokazali uglavnom uspješni u induciranju apoptoze tj. odumiranja stanica raka te je jedan od predloženih mehanizama koji objašnjava tu pojavu fragmentacija DNK u stanicama raka. U tretiranju s amidino supstituiranim benzotiazolima se kromosomska DNK većine stanica raka fragmentirala na nekoliko mjesta i tako dovela do apoptoze.

Uz testiranje citotoksičnosti za stanice raka, također se promatrao utjecaj na normalne ljudske stanice te se pokazalo da određeni amidno supstituirani benzotiazoli nemaju nikakav citotoksični utjecaj na njih. [3]

## 2.2. FORSIRANA RAZGRADNJA [4]

Forsirana razgradnja je postupak u kojem se novi lijek ili produkti razgradnje lijeka izlažu strogim uvjetima kako bi se promatralo ponašanje spoja i njegova razgradnja. Forsirana razgradnja potrebna je za demonstriranje specifičnosti metoda koje opisuju stabilnost i daju uvid u puteve i produkte razgradnje spoja. Poznavanje stabilnosti molekule pomaže u odabiru najboljih formulacija i pakiranja te u izboru najboljih uvjeta skladištenja i roka trajanja.

Studije stabilnosti uključuju dugoročne studije koje traju dvanaest mjeseci i ubrzane studije stabilnosti koje traju šest mjeseci. Srednje studije se mogu provoditi u manje strogim uvjetima od ubrzanih studija. U usporedbi sa studijama stabilnosti studije forsirane razgradnje mogu dobiti produkte razgradnje u puno kraćem vremenskom roku od nekoliko tjedana. Uzorci dobiveni forsiranom razgradnjom služe u razvoju metoda određivanja stabilnosti koje se mogu koristiti u kasnijoj analizi uzorka dobivenih ubrzanim i dugoročnim studijama stabilnosti.

Forsirana razgradnja se provodi kako bi se postigli ovi ciljevi:

1. Uspostaviti puteve razgradnje lijekova i produkta lijekova
2. Razlikovati produkte razgradnje nastale iz lijekova (potencijalnih lijekova) od onih koji se dobiju iz produkta koji ne potječu iz lijekova
3. Razjasniti strukture produkta razgradnje
4. Odrediti intrinzičnu stabilnost aktivne farmaceutske tvari u formulaciji
5. Otkriti mehanizme razgradnje poput hidrolize, oksidacije, termolize ili fotolize aktivne farmaceutske tvari i produkta lijeka
6. Utvrditi prirodu uspostavljanja stabilnosti razvijene metode
7. Razumjeti kemijska svojstva molekula lijeka
8. Razviti stabilnije formulacije
9. Razviti profil razgradnje sličan onome koji se može opaziti u formalnim studijama stabilnosti
10. Riješiti probleme vezane za stabilnost

### **2.2.1. PROVOĐENJE FORSIRANJE RAZGRADNJE [4]**

Potrebno je provoditi studije razgradnje pri različitim uvjetima poput pH, prisutnosti svjetla i kisika, pri povišenim temperaturama i razinama vlažnosti kako bi se odredila stabilnost aktivne farmaceutske tvari. Rano stres testiranje može dati pravovremene preporuke za poboljšanje procesa proizvodnje i pravilni odabir procedura za praćenje stabilnosti.

Stupanj do kojeg se razgrađuju aktivne farmaceutske tvari je najčešće 5-20 % za potrebe kromatografskih analiza. Nije nužno potrebno da forsirana razgradnja nužno dovodi do nastajanja produkta razgradnje. Istraživanje se može prekinuti ako ne dolazi do nikakve razgradnje nakon što su aktivna farmaceutska tvar ili produkti reakcije lijeka izloženi stresnim uvjetima koji su navedeni u protokolu za ubranu razgradnju. Ovakav rezultat je indikator stabilnosti molekule koja se testira. Prekomjerno izlaganje uzorka uvjetima razgradnje može dovesti do nastanka sekundarnih produkata razgradnje koji se ne bi javljali u realnim uvjetima dok nedovoljno strogi uvjeti razgradnje mogu dovesti do ne nastajanja razgradnih produkata.

### **2.2.2. ODABIR UVJETA ZA PROVOĐENJE FORSIRANE RAZGRADNJE [4]**

Forsirana razgradnja se provodi kako bi se proizveli reprezentativni uzorci za razvoj metoda određivanja stabilnosti za aktivne farmaceutske tvari i produkte reakcija lijekova. Izbor uvjeta pod kojima se provodi forsirana razgradnja bi trebao biti takav da daje rezultate koji adekvatno opisuju ponašanje lijeka u normalnim uvjetima skladištenja i proizvodnje. Stres faktori koji se proučavaju u sklopu istraživanja forsirane razgradnje su kisele i bazne hidrolize, termalna razgradnja, fotoliza, oksidacija i ciklusi zamrzavanja i taljenja. Ne postoje specifične upute za uvjete vezano za pH, temperaturu ili specifične oksidanse koji se moraju koristiti. Iako ne postoje propisane vrijednosti za provođenje fotolize najčešće se koriste vidljivo i UV zračenje valnih duljina od 320-400 nm.

Primarni produkti razgradnje i njihovi sekundarni produkti razgradnje se mogu razlikovati uspoređivanjem kasnijih rezultata analize s rezultatima testiranja uzorka u ranijim vremenskim periodima i tako pomoći u boljem određivanju puta razgradnje i nastanka produkta. Uz pretpostavku da je aktivna farmaceutska tvar labilna i uz promjenu uvjeta razgradnje povećanjem ili smanjenjem stresa na uzorak moguće je ostvariti bolje uvjete za proučavanje spoja. Za razliku od provođenja istraživanja u kratkom vremenu sa strožim uvjetima ova

strategija ima određene prednost. Može doći do promjene reakcijskog mehanizma u strožim uvjetima koji utječu na dobivene rezultate i postoje praktični problemi upotrebe takvih uzoraka u HPLC kolonama ako je potrebno svaki uzorak posebno razrjeđivati ili neutralizirati prije upotrebe u kromatografu. Zbog toga bi se trebalo nastojati da se koriste što blaži uvjeti pri forsiranoj razgradnji no da su i dalje dovoljno strogi da mogu dovesti do željenog stupnja razgradnje.

Koncentracije potrebne za provedbu studije forsirane razgradnje nisu definirane propisima ali se preporučuje početna koncentracija od 1 mg/mL. Korištenjem koncentracija kemikalije od 1 mg/mL moguće je dobiti i sporedne produkte razgradnje u granicama detekcije metode.

## **2.3. UVJETI RAZGRADNJE**

### **2.3.1. HIDROLITIČKI UVJETI [5, 6]**

Hidroliza je kemijski proces u kojem dolazi do dekompozicije kemijskog spoja u reakciji s vodom. Hidrolitički eksperimenti u kiselim i bazičnim uvjetima uključuju katalitičko formiranje oblika funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli koji se mogu ionizirati. Kiselinsko ili bazično stres testiranje uključuje forsiranu razgradnju aktivne farmaceutske tvari izlaganjem kiselim ili bazičnim uvjetima koji daju primarne produkte razgradnje u željenom omjeru. Izbor tipa i koncentracije kiseline ovisi o stabilnosti aktivne farmaceutske tvari. Za kiselinsku hidrolizu koristi se klorovodična ili sulfatna kiselina, a za bazične hidrolize natrijev ili kalijev hidroksid. Stres testiranje se inače provodi bi sobnoj temperaturi, no ako ne dolazi do razgradnje temperatura se može povećati i do 70 °C.

### **2.3.2. OKSIDACIJSKI UVJETI [6, 7]**

Vodikov peroksid je široko korišteni oksidans za aktivne farmaceutske tvari u forsiranoj razgradnji no drugi oksidansi poput metalnih iona, kisika i radikalnih inicijatora se također mogu koristiti. Izbor oksidansa, njegove koncentracije i uvjeta uporabe ovise o aktivnoj farmaceutskoj tvari. Oksidativna razgradnja aktivne farmaceutske tvari se temelji na



mehanizmu prijenosa elektrona kako bi se formirali anioni i kationi. Amini, sulfidi i fenoli su podložni oksidacijskom prijenosu elektrona kojim nastaju *N*-oksidi, hidroksil amini, sulfoni i sulfoksidi. Funkcionalne skupine poput benzilnog ugljika, alilnog ugljika, tercijarnog ugljika ili ugljika na  $\alpha$ -položaju u odnosu na hetero atom su podložni oksidativnom formiranju hidroperoksida, hidroksida ili ketona.

### 2.3.3. FOTOLITIČKI UVJETI [8]

Potrebno je provoditi fotolitička testiranja aktivnih farmaceutskih tvari kako bi se moglo odrediti da li izlaganje svjetlosti dovodi do neprihvatljivih promjena. Istraživanja fotostabilnosti se provode kako bi se dobili primarni produkti razgradnje izlaganjem uzorka UV ili fluorescentnim uvjetima. Valne duljine pod kojima se provode fotolitička testiranja se nalaze u rasponu od 300-800 nm. Prisutnost funkcionalnih skupina poput karbonilnih, nitro aromatskih, *N*-oksidnih, alkenkih, aril kloridnih, slabih C-H i O-H veza, sulfida i poliena će vjerojatno dovesti do fotoosjetljivosti lijeka.

### 2.3.4. TERMALNI UVJETI [6, 9, 10]

Ovisno o agregatnom stanju aktivne farmaceutske tvari potrebno je izložiti različitim vrstama topline. U slučaju čvrstog uzorka aktivne farmaceutske tvari i produkta reakcije lijeka potrebno je izlaganje suhoj i vlažnoj toplini dok se tekući produkt reakcije lijeka mora izlagati samo suhoj toplini. Istraživanja se mogu provoditi pri povišenim temperaturama u kraćem vremenu. Efekti temperature na termalnu razgradnju neke supstance se proučavaju preko Arrheniusove jednadžbe:

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

gdje je  $k$  specifična stopa konverzije,  $A$  je faktor frekvencije,  $E_a$  je energija aktivacije,  $R$  je plinska konstanta i  $T$  je apsolutna temperatura. Termalna razgradnja se provodi pri 40-80 °C.

## 2.4. SPEKTROMETRIJA MASA [11]

Spektrometrija masa (MS) je uznapredovala kroz desetljeća razvoja i postala moćan analitički alat za kvantitativne i kvalitativne primjene. Prvi spektrometri masa su mogli jedino analizirati male anorganske molekule dok današnji spektrometri masa mogu analizirati makromolekule bez gotovo ikakvih ograničenja s obzirom na masu molekule.

Sposobnost analize proteina i drugih bioloških ekstrakta je omogućeno napredcima u razvoju blagih ionizacijskih tehnika poput elektrosprej ionizacije (ESI)<sup>1</sup> i matrično-potpomognute laserske desorpcijske ionizacije (MALDI)<sup>2</sup> koje mogu pretvoriti biomolekule u ione. ESI se može efikasno kombinirati sa separacijskim tehnikama poboljšavajući njegovu upotrebu u biološkim i medicinskim znanostima. MALDI s druge strane ima prednost u tome što proizvodi ione s jednostrukim nabojem iz proteina i peptida čime smanjuje kompleksnost spektra. Bez obzira na izvor ionizacijskog zračenja osjetljivost spektrometra masa ovisi o analizatoru masa u kojem se odvija razdvajanje iona. Kvadripolni<sup>3</sup> i analizator masa s vremenom preleta (TOF)<sup>4</sup> često se koriste i mogu se konfigurirati u kombinirani Q-TOF instrument spektrometrije masa.

Spektrometrija masa se oslanja na formiranje iona u plinskoj fazi, negativnog ili pozitivnog naboja, koji se mogu električno ili magnetski razdvojiti na temelju omjera mase i naboja iona ( $m/z$ ). U MS spektru koordinate osi  $x$  predstavljaju  $m/z$  omjer, a koordinate  $y$ -osi upućuju na sveukupni broj određenog iona.

### 2.4.1. IONIZACIJSKE TEHNIKE [11]

Tradicionalna ionizacijska tehnika, EI, koristi snop energetskih elektrona za ionizaciju analita i odvija se samo u vakuumu u kojem su analiti u plinovitom agregacijskom stanju. Snop elektrona se oslobađa iz zagrijanog metala (npr. Wolfram) i ti elektroni se električno ubrzavaju i usmjeravaju tako da se sudare s analitima u plinskom agregacijskom stanju. U tom sudaru se izbijaju elektroni iz analita i dolazi do nastanka pozitivno nabijenih radikalnih kationa. Ovi uvjeti nisu prikladni za veće molekule i time za mnoge biološke materijale.

---

<sup>1</sup> engl. *Electrospray Ionization*, ESI

<sup>2</sup> engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI

<sup>3</sup> engl. *Quadropole*, Q

<sup>4</sup> engl. *Time of Flight*, TOF

Zbog ograničenja povezanih s EI ionizacijom, kemijska ionizacija (CI)<sup>5</sup> i plazmatska desorpcija (PD) su se kasnije uvodile kao novije metode ionizacije uzorka za spektrometriju masa. Obje tehnike prvenstveno stvaraju protonirane ili deprotonirane ione koji su stabilniji od radikalnih kationa koji se formiraju tijekom EI-MS analiza. Kemijska ionizacija se oslanja na interakciju između energetskih elektrona i neutralnih molekula kako bi proizvela protonirane vrste. Slično EI ionizaciji ova metoda je ograničena u rasponu masa molekula koje se mogu njome analizirati (<1000).

PD ionizacija s druge strane je jedna od ranih ionizacijskih tehnika koja je sposobna analizirati biomolekule sve do molarne mase od 100.000 Daltona. PD je blaga ionizacijska tehnika što znači da se minimalna energija prenosi do analita tijekom procesa ionizacije. PD ionizacija se s vremenom počela zamjenjivati s drugim blagim ionizacijskim tehnikama poput ionizacije bombardiranjem brzim atomima (FAB)<sup>6</sup>- tekućinske sekundarne spektrometrije masa (LSIMS)<sup>7</sup>, MALDI i ESI. Posljednje dvije tehnike su unijele revoluciju pri upotrebi spektrometara masa i omogućili analizu puno šireg raspona analita MS spektrometrijom.

#### 2.4.1.1. ESI [11]

Uzorci za ESI se najčešće otope u otapalu i onda unose u spektrometar masa u obliku aerosola. ESI-MS se trenutno koristi za kvalitativna i kvantitativna ispitivanja širokog niza nezapaljivih i termalno labilnih jednostavnih anorganskih spojeva kao i za kompleksne biološke strukture.

U ESI-MS uzorak bi idealno trebao biti otopljen u polarnom otapalu pri atmosferskom tlaku i ubrizgavao se u izvor ionizacijskog zračenja tankom iglom. Kako se uzorak raspršuje tako se na igli pojavljuje visoki električni potencijal (3-4 kV) što rezultira formiranjem visoko nabijenih kapljica i stvaranjem takozvane maglice. Te kapi se zatim električno prenose i isparavaju uz pomoć toplog neutralnog plina. ESI je riješio probleme s proučavanjem molekula visokih molekulskih masa poput proteina te se njegova efikasnost može dalje poboljšati u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom (LC-MS).

---

<sup>5</sup> engl. *Chemical Ionization*, CI

<sup>6</sup> engl. *Fast Atom Bombardment*, FAB

<sup>7</sup> engl. *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*, LSIMS

#### 2.4.1.2. MALDI [11]

MALDI je vodeći ionizacijski izvor trenutno u upotrebi za proteinsko sekvencioniranje i istraživanje te se često koristi u kombinaciji s ESI tehnologijom.

U MALDI-u se ioni desorbiraju s čvrste faze, a ne s fluidne. Uzorak se mora prvo otopiti u prikladnom otapalu i pomiješati s prikladnom matricom. Zatim se nanosi na MALDI ploču i suši na zraku ili pod strujom plinovitog dušika. Pod tim uvjetima uzorak kristalizira istodobno s matricom na MALDI ploči. Komponente u smjesi se onda prevode u plinovito agregatno stanje uz upotrebu laserske zrake koja udara od kristal uzorka dovodeći do apsorpcije energije laserske zrake sa strane matrice i potom desorpcije i ionizacije analita u uzorku. MALDI se u početku isključivo provodio u vakuumu ali se 2000. godine razvio (AP)<sup>8</sup> MALDI, tj. uređaj s kojim se ovaj proces može provoditi pri atmosferskom tlaku što je značajno smanjilo cijenu, kompleksnost upravljanja i olakšalo komercijalnu proizvodnju spektrometra masa s izmjenjivim MALDI i ESI izvorima zračenja.

#### 2.4.2. ANALIZATORI MASA [11]

Analizator masa je dio instrumenta u kojem se ioni razdvajaju na temelju omjera  $m/z$ . U spektrometru masa izolacija iona je najčešće električno potaknuta iako neki tradicionalni analizatori koriste magnetsko polje za ostvarivanje separacije. Trenutno su u uporabi četiri vrste analizatora masa. To su kvadripol, kvadripolna ionska klopka (QIT)<sup>9</sup>, TOF i analizator koji radi na principu Fourierovih transformacija (FT-ICR)<sup>10</sup>. Ovi analizatori se razlikuju ovisno o veličini, cijeni, rezoluciji, rasponu mase i mogućnosti da se koriste u kombiniranim spektrometrijskim eksperimentima (MS/MS).

---

<sup>8</sup> engl. *Atmospheric Pressure*, AP

<sup>9</sup> engl. *Quadropole Ion Trap*, QIT

<sup>10</sup> engl. *Fourier Transform Ion Cyclotrone Resonance*, FTICR

#### 2.4.2.1. KVADRIPOLNI ANALIZATOR (Q) [11]

Ovaj analizator se sastoji od četiri paralelne električne šipke. Izvor istosmjerne struje određenog potencijala se provodi kroz dvije od ovih šipki dok se preostale dvije povežu na izvor izmjeničnog radiofrekventnog potencijala. Ioni dopijevaju na kvadripol iz ionizacijske komore pod utjecajem električnog polja koje ih usmjerava.

Pozitivno nabijeni ion se kreće u smjeru negativno nabijene šipke. No kada se polaritet promijeni ion će promijeniti svoju putanju prije nego što se sudari s šipkom. U takvim situacijama ioni podliježu kompleksnom oscilirajućem gibanju i u skladu s time imaju prikladne vrijednosti frekvencije, napona i brzine i samo ioni u uskom području  $m/z$  omjera će uspješno proći taj put. Preostali ioni imaju putanju unutar koje će se sudariti s jednom od šipki i tako zaustaviti svoj put. Mijenjanje vrijednosti frekvencije, brzine i napona može dovesti do situacije u kojoj nekoliko iona s različitim  $m/z$  vrijednostima dopijuju do detektora.

Glavne prednosti kvadripolnih analizatora su niske cijene, relativno mala veličina, robusna gradnja i lakoća održavanja. No kvadripol ima ograničene sposobnosti analize u pogledu raspona molekulskih masa (najčešće <4000Da), u razlučivosti pikova spektrograma i u mogućnosti za obavljanje MS/MS analiza. Posljednji nedostatak se može nadoknaditi dodavanjem kvadripola na druge analizatore poput dodatnih kvadripola ili kvadripola vezanog na TOF spektrometar.

#### 2.4.2.2. ANALIZATOR VREMENA PRELETA (TOF) [11]

TOF se oslanja na slobodnom letu ioniziranih molekula kroz cijev duljine 1-2 m prije dolaska na detektor. Kada se dva iona formiraju u isto vrijeme i imaju isti naboj ali imaju različite mase, ion manje mase će dostići detektor prije iona veće mase. Tako se na temelju vremena potrebnog za prelet iona do detektora može odrediti masa samog iona.

Glavna prednost TOF analizatora je da svi formirani ioni u konačnici stignu do detektora (za razliku od kvadripola i drugih instrumenata). Jednadžba koja pokazuje povezanost između  $m/z$  sa sveukupnim vremenom preleta se može izraziti sljedećom formulom:

$$m/z = t_f^2 2 E s / (2s + x) \quad (2)$$

gdje je  $E$  napon koji se koristi,  $s$  je duljina puta ubrzanja iona i  $x$  duljina puta slobodnog leta iona. Teoretski su sve tri vrijednosti konstantne pa se gornja jednačba može skratiti na :

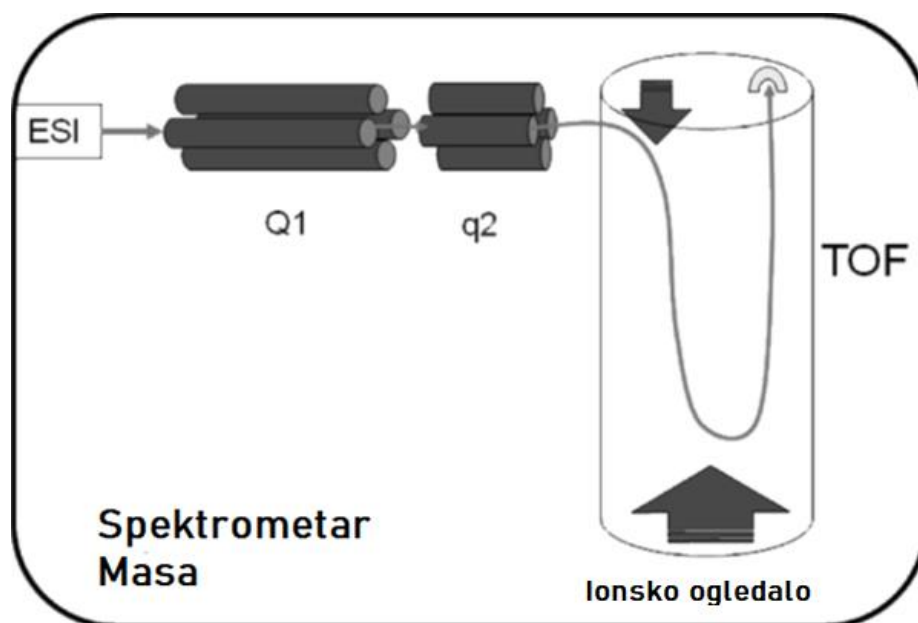
$$m/z = K t_f^2 \quad (3)$$

gdje je  $K$  kalibracijski faktor. Ova jednačba jasno prikazuje direktnu povezanost između  $m/z$  vrijednosti i vremena preleta.

Iako TOF ima prednost u detekciji iona velikog raspona masa linearnost cijevi konvencionalnog TOF analizatora može utjecati na razlučivost pojedinih pikova. Ioni imaju različite kinetičke energije što na posljeticu može utjecati na razlučivost rezultata i preciznost mjerenja. Ovaj nedostatak se može nadvladati upotrebom elektrostatskog ionskog zrcala, optičkog uređaja koji mijenja putanju iona unutar TOF analizatora. Ioni s većom kinetičkom energijom dublje prodiru u ionsko zrcalo i s toga se ti ioni postepeno odbijaju poboljšavajući razlučivost pikova u TOF spektru. Drugi faktor je duljina cijevi jer ioni u TOF s ionskim zrcalom putuju kroz dužu putanju te je moguće dobiti bolju rezoluciju i preciznija mjerenja mase iona zbog povećanog vremena putovanja iona.

#### **2.4.2.3. HIBRIDNI ORTOGONALNI KVADRIPOLNI SPEKTROMETRI MASA S MJERENJEM VREMENA PRELETA (Q-TOF)**

Q-TOF instrument je prvo upotrijebljen 1996. godine kao način kombiniranja potencijala skeniranja kvadripola s rezolucijskom moći TOF analizatora. On daje visoko kvalitetne, informativne, jednostavne, jednofazne MS i dvostruke MS/MS spektre.



**Slika 1.** Shematski prikaz Q- TOF instrumenta s ESI izvorom zračenja [11]

Kao što je vidljivo u dijagramskom prikazu ovaj primjer Q- TOF instrumenta se sastoji od dva kvadripola povezanih s TOF analizatorom koji je spojen u ortogonalnu konfiguraciju u odnosu na kvadripole. Valja naglasiti da Q- TOF instrumenti inače sadrže dodatne kvadripole ispred Q1 koji služe kao ion fokusirajuća sredstva i pridonose sudarnom hlađenju iona kako bi se kvaliteta ionskih zraka poboljšala.

Jedna od glavnih prednosti Q- TOF instrumenta je njegova sposobnost spajanja ili s ESI ili s MALDI uz minimalne promjene konfiguracije. Asocijacija s MALDI-em je od velike važnosti jer dopušta provođenje MS/MS eksperimenata. Zbog ograničenja kvadripola po pitanju raspona mase iona koji se analiziraju postoje problemi s ortogonalnom injekcijom velikih iona s nabojnim brojem  $\pm 1$  u TOF. Druge prednosti Q- TOF instrumenta su lakoća upravljanja, rezolucija, visoka točnost mase i do stotrukog povećanja u osjetljivosti kada se usporedi s trostrukim kvadripolom. [11]

Q-TOF spektrometar masa ima manju osjetljivost od ekvivalentnog trostrukog kvadripolnog instrumenta u slučajevima kada se promatra samo jedan produktni ion, kao u prekursor ionskom skeniranju ili eksperimentima promatranja višestrukih reakcija (MRM)<sup>11</sup>. U usporedbi s trostrukim kvadripolnim spektrometrom masa, Q-TOF instrument generalno ima veću

<sup>11</sup> engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM

osjetljivost i brzinu dobivanja podataka kada se koristi za snimanje spektara masa i spektara ionskih produkta, ali znatno lošiju osjetljivost i brzinu dobivanja podataka kada se koristi za snimanje spektara prekursor iona i kvantitativnu analizu. [12]

## **2.5. METODA ODREĐIVANJA STABILNOSTI [13]**

Metoda određivanja stabilnosti je analitički postupak kojim se kvantificira smanjenje količine aktivne farmaceutske tvari u produktu reakcije lijeka izazvanog razgradnjom. Metode određivanja stabilnosti se mogu koristiti za određivanje promjene stabilnosti aktivne farmaceutske tvari i produkta razgradnje lijeka s vremenom. Metoda određivanja stabilnosti točno određuje promjene koncentracije aktivne tvari bez interferencije drugih produkata razgradnje, nečistoća i pomoćnih tvari.

### **2.5.1. DOBIVANJE UZORAKA [14]**

Za dobivanje metode određivanja stabilnosti aktivne farmaceutske tvari provodi se forsirana razgradnja pri uvjetima ekstremnijim od onih za ubranu razgradnju. Uključuje hidrolitičko, oksidativno, fotolitičko i termalno testiranje koje je ranije opisano. Forsirana razgradnja aktivne farmaceutske tvari u krutom agregatnom stanju i u obliku otopine se provode kako bi se dobili produkti razgradnje koji će vjerojatno nastati u realnim uvjetima skladištenja.

### **2.5.2. RAZVOJ METODE I OPTIMIZACIJA**

Prije početka razvoja metode razna fizikalno kemijska svojstva poput  $pK_a$ ,  $\log P$ , topljivost i apsorpcijski maksimum moraju biti poznati jer oni tvore temelj razvoja HPLC metode.  $\log P$  i topljivost pomažu pri odabiru pokretne faze i otapala dok  $pK_a$  vrijednost pomaže u određivanju potrebnog pH pokretne faze. [15]

Kolona obrnutih faza je preferirani izbor za počinjanje separacije komponenti uzorka dok se razgradnja provodi u vodenoj otopini. Metanol, voda, i acetonitril se mogu koristiti kao pokretna faza u raznim omjerima u početnim stupnjevima separacije. Odabir između metanola



i acetonitrila za organsku fazu ovisi o topljivosti analita. U početku se omjer vode i organske faze održava na 1:1 i prikladne modifikacije se provode tijekom testiranja kako bi se dobile dobre separacije pikova. Varijacije u temperaturi kolone utječu na selektivnost metode jer analiti drugačije reagiraju na promjene temperature. Temperaturni raspon od 30-40 °C je prikladan za dobivanje dobre reproducibilnosti. [16]

Tijekom razvoja metode može biti da kromatogramski pik analita skriva pik nečistoće ili produkta razgradnje koji se koeluiraju s analitom. Ovo zahtjeva analizu čistoće pika koje određuje specifičnost metode. Razgradni produkt koji se koeluiraju s analitom se smatra prihvatljivim ako se ne stvara u uvjetima ubrzane razgradnje ili uvjetima dugoročnog skladištenja. [17]

### **2.5.3. VALIDACIJA METODE [18]**

Nakon razvoja metode određivanja stabilnosti ona se validira u skladu s USP/ICH smjernicama za linearnost, točnost, preciznost, specifičnost, granice kvantifikacije, granice detekcije i otpornost. Potrebno je izolirati, identificirati i kvantificirati produkte razgradnje koji se nalaze iznad granice identifikacije. Ako metoda ne zadovoljava ove kriterije potrebno ju je modificirati i ponovno validirati.

## **2.6. TOKSIČNOST I UTJECAJ NA OKOLIŠ [19]**

Toksičnost predstavlja stupanj do kojeg neka kemijska tvar ili mješavina tvari može oštetiti neki organizam. U sklopu procjene toksičnosti neke tvari na okoliš koriste se uređaji za određivanje toksičnosti. Takvi uređaji u sebi sadrže žive organizme čija se reakcija na promjenu koncentracije nekog toksičnog spoja koristi kao indikator toksičnosti. Postoji širok raspon organizama koji se koriste za toksikološka istraživanja uključujući mikroorganizme, stanice sisavaca, alge, biljke i beskralježnjake ali i složenije organizme poput riba. Promatraju se inhibicija životnog ciklusa ili promjena smrtnosti nakon izlaganja toksičnom spoju.

## **2.6.1. ORGANIZMI ZA ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI [19]**

### **2.6.1.1. BAKTERIJE [19]**

Najšire korištena kategorija organizama u procjenama toksičnosti su bakterije. Mjerenjem njihovog ponašanja u posljednjim stadijima životnog ciklusa moguće je odrediti prisutnost toksičnih spojeva na temelju smrtnosti i inhibicije rasta. Uz te često korištene indikatore također se mogu pratiti mikrobna enzimska aktivnost, inhibicija respiracije i smanjenje luminiscencije. Najčešće korištena vrsta bakterija je *Vibrio fischeri*.

### **2.6.1.2. ALGE [19]**

Alge zajedno s morskim fitoplanktonom se kategoriziraju kao primarni proizvođači. Zbog toga se promjene u njihovim populacijama mogu zapaziti u vodenim okolišima te se u skladu s time mogu koristiti za određivanje toksičnosti vodenih okoliša mjerenjem bioluminiscencije, inhibicije rasta ili fotosintetske aktivnosti. Ovisno o komponenti/zagađivalu mjere se različiti parametri. Inhibicija rasta se promatra za široki raspon zagađivala poput insekticida, teških metala, industrijskih organskih spojeva i herbicida, dok se utjecaj surfaktanta, herbicida i naftnih proizvoda mogu određivati praćenjem inhibicije fotosintetske aktivnosti.

Korištenje biljnih organizama za određivanje toksičnosti ima veliku prednost s obzirom na niz parametara koji se mogu pratiti poput enzimске aktivnosti, vrijeme razvoja sjemena i težine biomase. Uz to imaju niske troškove održavanja, malu cijenu i testovi se brzo provode.

### **2.6.1.3. BESKRALJEŽNJACI [19]**

Beskralježnjaci se često koriste za testiranje toksičnosti pošto su glavni potrošači algi i biljoždera. *Daphnia magna* je najčešće korišteni beskralježnjak za testiranje akutne i kronične toksičnosti. Korištenje *Daphnia magna* ima mnoge prednosti za rutinska toksikološka testiranja poput partenogenetskog razmnožavanja, kratkog reprodukcijuskog ciklusa i visoke osjetljivosti na toksine. Najčešći simptomi koji se promatraju su promjena načina kretanja i smrtnost.

#### 2.6.1.4. RIBE [19]

Ribe pripadaju višim biljožderima ili mesožderima u vodenom hranidbenom lancu. Poznato je da ribe pokazuju specifične reakcije promjene ponašanja i psihološke reakcije pri vrlo niskim koncentracijama zagađivala. Testovi se često baziraju na smrtnosti riba nakon njihovog izlaganja toksičnim spojevima. Rezultati se prikazuju kao koncentracije koje su smrtonosne za 50 % riba koje su izložene spoju u nekom vremenskom periodu ( $LC_{50}$ ).

Općenito testovi na ribama pokazuju dobru osjetljivost, i pod određenim uvjetima, omogućuju analizu u realnom vremenu. No ipak imaju neke nedostatke poput problema s standardizacijom, etičkih problema, dugog vremena za koji se moraju održavati i potrebe za posebnom opremom.

### 2.7. RAČUNALNI PROGRAMI PROCJENE TOKSIČNOSTI [19]

Računalni programi za procjenu toksičnosti su alati koji služe za dobivanje informacija o toksičnosti nekog spoja na temelju određenih zakonitosti temeljenih na fizikalno kemijskim svojstvima spoja. Ovi alati služe za određivanje prioriteta za skupa i dugotrajna tradicionalna biotestiranja toksičnosti. Kada uvjeti ne dozvoljavaju tradicionalna ekotoksikološka testiranja ovi programi mogu biti alternativa za procjenu toksičnosti.

#### 2.7.1. QSAR MODELI [19]

Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (QSAR)<sup>12</sup> su matematički modeli koji se koriste za predviđanje toksičnosti kemikalija iz fizikalnih karakteristika njihove strukture poznati kao molekularni deskriptori. Izvori akutne toksičnosti poput visokih koncentracija nekog zagađivala koji ubije 50 % riba u određenim uvjetima se mogu predvidjeti QSAR modelima. Jednostavni QSAR modeli određuju toksičnost kemikalija uporabom jednostavne linearne funkcije molekularnih deskriptora:

$$\textit{Toksičnost} = ax_1 + bx_1 + c \quad (4)$$

---

<sup>12</sup> engl. *Quantitative Structure Analysis Relationships*, QSAR

gdje su  $x_1$  i  $x_2$  neovisni deskriptori varijabli, a  $a$ ,  $b$  i  $c$  su promatrani parametri. Molarna masa je primjer navedenih molekularnih deskriptora.

### 2.7.2. T.E.S.T. PROGRAMSKI PAKET [19]

Softverski alat za procjenu toksičnosti (T.E.S.T.)<sup>13</sup> omogućuje korisnicima da lako procjene toksičnost nekog spoja koristeći QSAR metodologije. Spojevi čija se toksičnost želi procijeniti se mogu unijeti crtanjem u priloženom alatu za skiciranje molekula, unošenjem tekstualne datoteke strukture spoja ili importiranjem iz baze podataka poznatih struktura. Nakon što se spoj unio njegova toksičnost se može procijeniti nizom QSAR metoda. T.E.S.T. omogućuje procjenu vrijednosti raznih toksikoloških standarda poput:

1. 96 h *Pimephales promelas* LC<sub>50</sub> (koncentracija pri kojoj 50 % velikoglavih klena umire nakon 96 h)
2. 48h *Daphnia magna* LC<sub>50</sub> (koncentracija pri kojoj 50 % *Daphnia magna* umire nakon 48 h)
3. 48h *Tetrahymena pyriformis* IGC<sub>50</sub> (koncentracija pri kojoj 50 % izloženih *Tetrahymena pyriformis* pokazuje inhibiciju rasta nakon 48 h)
4. Oralno otrovani štakor LD<sub>50</sub> (količina kemikalije u mg/kg tjelesne mase štakora koja uzrokuje smrtnost 50 % testiranih štakora)
5. Bioakumulacijski faktor (omjer kemijske koncentracije u ribama kao rezultat apsorpcije preko dišnog sustava i koncentracije u okolnoj vodi)
6. Razvojna toksičnost (da li kemikalija ima toksičan efekt na razvoj ljudi ili životinja)
7. Ames mutagenost (spoj je mutagen kada uzrokuje obrat rasta kolonije u bilo kojem soju *Salmonella typhimurium*)

T.E.S.T. također omogućuje procjenu nekoliko fizikalnih svojstava spoja poput temperature vrenja, gustoće, temperaturu plamišta, toplinsku vodljivost, viskoznost, površinsku napetost, topljivost u vodi, tlak pare i temperaturu tališta.

---

<sup>13</sup> engl. *Toxicity Estimation Software Tool*, TEST

T.E.S.T. omogućuje procjenu vrijednosti toksičnosti uporabom nekoliko drugačijih naprednih QSAR metodologija:

**Hijerarhijska metoda**<sup>14</sup>: Vrijednost toksičnosti za zadani spoj se procjenjuje iz prosječnih vrijednosti predviđanja dobivenih iz nekoliko modela. Modeli koji se koriste u ove svrhe se generiraju prije pokretanja programa.

**FDA**<sup>15</sup> **metoda**<sup>16</sup>: Procjena toksičnosti za svaki kemijski spoj koji se testira provodi se koristeći novi model koji je prilagođen kemijskom spoju koji je najbliži spoju koji se testira. Svaki model se generira pri pokretanju programa.

**Jedno modelska metoda**<sup>17</sup>: Procjene toksičnosti se provode pomoću multilinearne regresijskog modela koji se prilagođava testiranom spoju koristeći molekularne deskriptore kao nezavisne varijable uporabom genetičkog algoritamskog pristupa. Regresijski model se generira prije pokretanja programa.

**Metoda doprinosa grupe**<sup>18</sup>: Procjene toksičnosti se provode pomoću multiregresijskog modela koji se prilagođava testiranom spoju koristeći broj molekularnih fragmenta kao nezavisne varijable. Regresijski model se generira prije pokretanja.

**Metoda najbližeg susjeda**<sup>19</sup>: Predviđena toksičnost se procjenjuje uzimanjem prosjeka toksičnosti triju kemijskih spojeva koji su najbliži testiranom spoju.

**Metoda konsenzusa**<sup>20</sup>: Predviđena toksičnost se procjenjuje uzimanjem predviđene prosječne toksičnosti iz prije navedenih QSAR metoda ako su dobivena predviđanja unutar domene upotrebljivosti.

**Metoda slučajnih šuma**<sup>21</sup>: Predviđena toksičnost se procjenjuje korištenjem sustava odluka koje se granaju i dodjeljuju kemikaliji određenu vrijednost toksičnosti koristeći molekularne

---

<sup>14</sup> engl. *Hierarchical method*

<sup>15</sup> engl. *Food and Drug Administration (američka državna služba za kontrolu i nadziranje hrane, lijekova i sl.)*

<sup>16</sup> engl. *FDA method*

<sup>17</sup> engl. *Single model method*

<sup>18</sup> engl. *Group contribution method*

<sup>19</sup> engl. *Nearest neighbor method*

<sup>20</sup> engl. *Consensus method*

<sup>21</sup> engl. *Random forest method*

deskriptore kao varijable za donošenje odluka. Ova metoda je trenutno samo dostupna za procjene razvojne toksičnosti.

**Metoda načina djelovanja<sup>22</sup>:** Predviđena toksičnost se procjenjuje u procesu s dva koraka. U prvom koraku se način djelovanja određuje iz modela analize linearne diskriminante. U drugom koraku se toksičnost procjenjuje korištenjem multilinearog regresijskog modela koji odgovara predviđenom načinu djelovanja. Ova metoda je trenutno samo iskoristiva za 96 h *Pimephales promelas* LC<sub>50</sub> mjerilo toksičnosti.

---

<sup>22</sup> engl. *Mode of action method*

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJALI

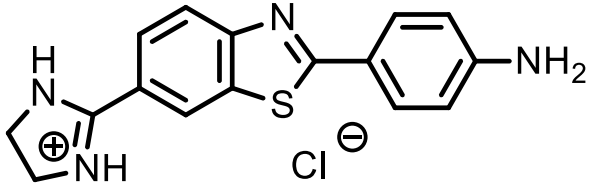
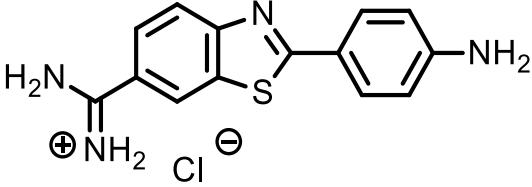
#### 3.1.1. KEMIKALIJE

Tijekom eksperimentalnog dijela ovoga rada, korištene su sljedeće kemikalije:

- 40%-na vodena otopina CH<sub>3</sub>CN
- 0,5 M vodena otopina HCl
- 0,5 M vodena otopina NaOH
- 10%-na vodena otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 0,1%-na vodena otopina HCOOH

U radu su analizirani novosintetizirani organski spojevi LD-1 i LD-2 čije su strukture prikazane u Tablici 1.

**Tablica 1.** Prikaz strukturne formule i molekulskih masa spojeva LD-1 i LD-2

uzorak	struktura	Mr / g mol <sup>-1</sup>
LD-1		330,84
LD-2		304,80



## 3.2. INSTRUMENTI

### 3.2.1. ANALITIČKA VAGA

Analitičkom vagom su se izvagali novosintetizirani organski spojevi mase 1 mg koji su se zatim koristili u pripremi standardnih otopina. Dobivene standardne otopine su se zatim koristile u daljnjim analizama forsirane razgradnje. Analitička vaga proizvođača Mettler Toledo ima maksimalni kapacitet od 120 g i odstupanje od 0,01 mg.



**Slika 2.** Slika analitičke vage korištene za vaganje analita

### 3.2.2. ULTRAZVUČNA KUPELJ

Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digital 10 P se koristila kako bi se ubrzalo otapanje LD-1 i LD-2 u njihovim otapalima i uzorci pripremili za daljnju analizu.



**Slika 3.** Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Digital 10 P korištena za pripremu uzoraka

### **3.2.3. SUŠIONIK**

Prikazani Instrumentaria sušionik se koristio u procesima termalne razgradnje LD-1 i LD-2 za postizanje potrebnih temperatura pri kojima se provodila termalna razgradnja.



**Slika 4.** Sušionik Instrumentaria korišten za termalnu razgradnju

### **3.2.4. SUNSET CPS+**

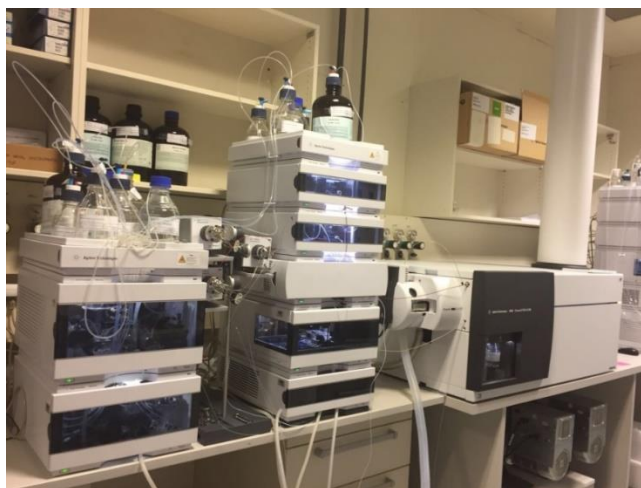
Za ozračivanje uzoraka UV/VIS zračenjem je upotrijebljen Atlas Suntest CPS+ fotolizer.



**Slika 5.** Atlas Suntest CPS+ fotolizer korišten za UV/VIS razgradnju

### **3.2.5. TEKUĆINSKI KROMATOGRAFI VEZAN 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 12). Uređaj se još sastoji od vakuumske degazera, automatskog dodavača uzorka, termostata i binarne pumpe.



**Slika 6.** 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**

Za pripremu uzoraka koji se koriste u studijama forsirane razgradnje bilo je potrebno prirediti standardne otopine spojeva. Otopine su se pripravljalje tako da se 1,00 mg spoja otopilo u 5 mL odabranog otapala. Nakon toga se iz dobivene otopine pripravljalje 1 mg/L otopina za potrebe snimanja na tekućinskom kromatografu. Za spoj označen kao LD-1 se kao otapalo koristilo 40%-na otopina acetonitrila u vodi, dok se za spoj LD-2 kao otapalo koristila 100%-na voda.

#### **3.3.2. EKSPERIMENTI PRISILNE RAZGRADNJE**

##### **3.3.2.1. HIDROLIZA**

Za provođenje hidrolize uzorci su se otapali u kiselim i bazičnim uvjetima. Prvo se 1 mg uzorka otapalo u 2 mL otapala za LD-1 i u 2,5 mL otapala za LD-2 te se zatim dodalo 500  $\mu$ L 0,5 M HCl te se ostavilo na sobnoj temperaturi u mraku idućih šest sati. Zatim se otopina neutralizira s 500  $\mu$ L 0,5 M NaOH otopine i napunila do oznake (5 mL) s Milli-Q vodom za LD-1 odnosno 40%-nom otopinom acetonitrila za LD-2.

Za provođenje hidrolize u bazičnim uvjetima se provodio analogni postupak tako da se prvo dodavalo 500  $\mu$ L 0,5 M otopine NaOH, te se zatim nakon ostavljanja u mraku šest sati neutralizira s 500  $\mu$ L 0,5 M otopine HCl. Tako pripremljeni uzorak se zatim nosio na instrumentalnu analizu.

##### **3.3.2.2. OKSIDACIJA**

Za ispitivanje spojeva u uvjetima oksidacije se 1 mg spoja otopio u 2 mL otapala za LD-1, odnosno u 2,5 mL otapala za LD-2 uz dodatak 1 mL 10%-ne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tako pripremljeni uzorci su se zatim ostavljali u mraku na sobnoj temperaturi šest sati. Nakon toga se tikvica napunila do oznake od 5 mL. Tako pripremljeni uzorak se zatim nosi na instrumentalnu analizu.

### **3.3.2.3. TERMALNA RAZGRADNJA**

Za određivanje utjecaja visokih temperatura na novosintetizirane spojeve LD-1 i LD-2 1 mg krutog uzorka se ostavljao u sušioniku na 24h pri temperaturi od 100 °C. Nakon sušenja spoj bi se otopio u odgovarajućem otapalu u tikvici volumena 5 mL.

U drugom slučaju nakon otapanja spojeva, 2 mL otopine koncentracije 200 mg/L se stavljalo na vodenu kupelj na 80 °C šest sati i zatim se nadopuni odgovarajućim otapalom do oznake 5 mL. Tako pripremljeni uzorak se zatim nosi na instrumentalnu analizu.

### **3.3.2.4. FOTOLIZA**

Za ispitivanje utjecaja fotolize na spojeve bilo je potrebno prirediti standardnu otopinu otapanjem spojeva LD-1 i LD-2. Otapalo je 2 mL Mili Q vode za LD1 te 2,5 mL 40%-ne otopine acetonitrila. Nakon toga se 2 mL standardne otopine koncentracije 200 mg/L izlagalo svjetlu jačine 500 Wh/m<sup>2</sup> petnaest sati. Nakon obavljenog osvjetljivanja se priredila otopina koncentracije 1 mg/L iz uzorka te se dalje instrumentalno analizira.

## **3.3.2. ANALIZA UZORAKA SPEKTROMETRIJOM MASA VISOKE RAZLUČIVOSTI**

Uzorci su snimani na spektrometru masa visoke razlučivosti te se nakon razgradnje dalje analiziralo u kromatografskoj koloni. Kolona koja se koristila je BEH C18 kolona dimenzija 100 x 2,1 mm i promjera 1,7 µm. Pokretna faza u kromatografskoj koloni se sastojala od 0,1%-ne otopine mravlje kiseline u vodi (A) i 0,1%-ne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu uz gradijentno eluiranje. Gradijenti pokretnih faza za spojeve LD-1 i LD-2 su prikazani u Tablicama 2. i 3.

**Tablica 2.** Gradijent pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom za spoj LD-1

Vrijeme, min	Volumen otapala A, %
0,00	90
1,00	90
5,00	50
7,00	40
9,00	90
9,01	90

**Tablica 3.** Gradijent pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom za spoj LD-2

Vrijeme, min	Volumen otapala A, %
0,00	85
1,00	85
5,00	60
7,00	35
9,00	85
9,01	85

Prije početka same analize, kromatografska kolona se kondicionirala. Kolona je termostatorana na 50 °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 bilo je potrebno kolonu prethodno uravnotežiti. Za to je potrebno 1 minutu. Uvjeti izvora iona spektrometra masa prilikom analize prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Uvjeti izvora iona spektrometra masa

<b>Temperatura plina</b>	<b>200 °C</b>
<b>Protok plina</b>	14 L/min
<b>Tlak raspršivača plina</b>	35 psi
<b>Napon kapilare</b>	3000 V

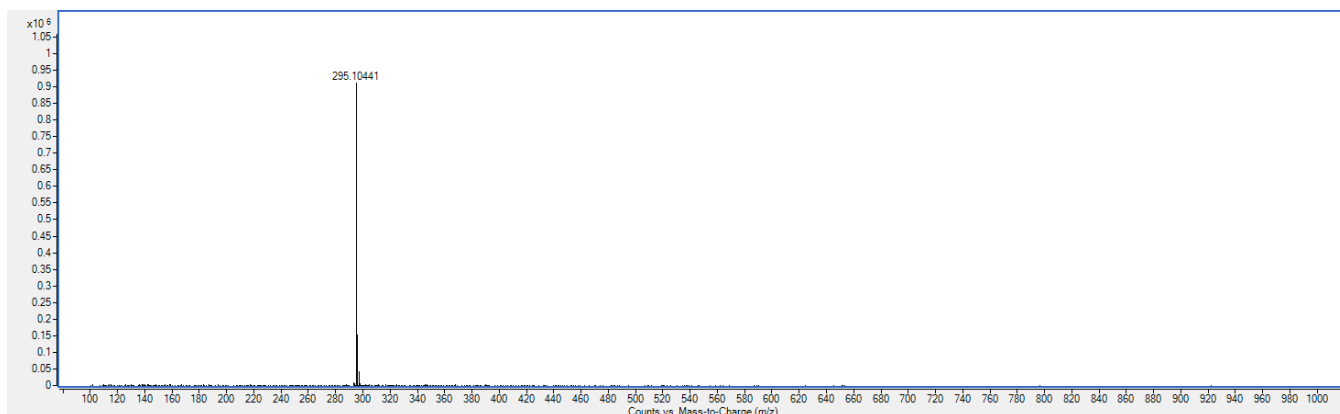
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. IDENTIFIKACIJA PRODUKATA NASTALIH PRISILNOM RAZGRADNJOM

Produkti nastali prisilnom razgradnjom su se analizirali u kromatografskom sustavu visoke djelotvornosti povezanom na spektrometar masa koji mjeri vrijeme preleta (2D-UHPLC-QTOF). Na temelju dobivenih spektara masa i kromatograma mogu se odrediti razgradni produkti te pretpostaviti razgradni put spojeva LD-1 i LD-2.

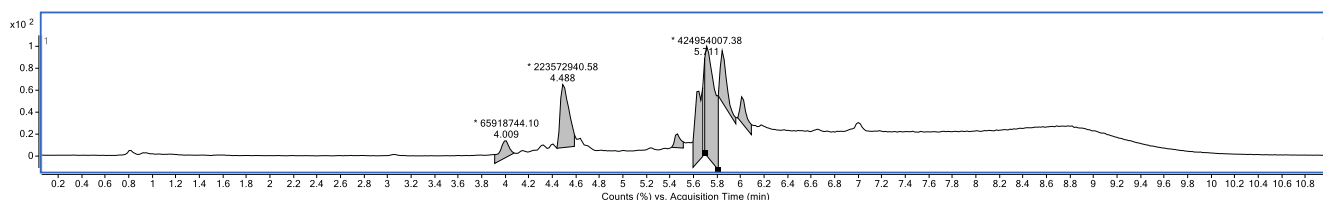
### 4.1.1. IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA SPOJA LD-1

Najprije je snimljen kromatogram i spektar masa osnovnog spoja LD-1. Spektar masa je prikazan na Slici 7, a iz kromatograma primijećeno je da se osnovni spoj LD-1 pojavljuje na vremenu zadržavanja od  $t_R = 4,47$  min.



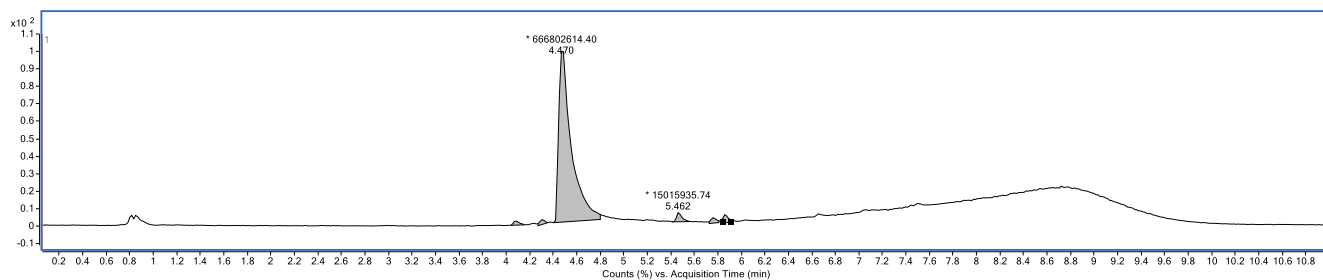
Slika 7. MS spektar osnovnog LD-1 spoja

Zatim su snimljeni kromatogrami uzoraka LD-1 koji su bili podvrgnuti razgradnji s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl, NaOH, umjetnoj Sunčevoj svjetlosti te povišenoj temperaturi. Provedena ispitivanja pokazala su da je LD-1 podložan razgradnji u svim ispitivanim eksperimentalnim uvjetima (Slike kromatograma 8-12.).

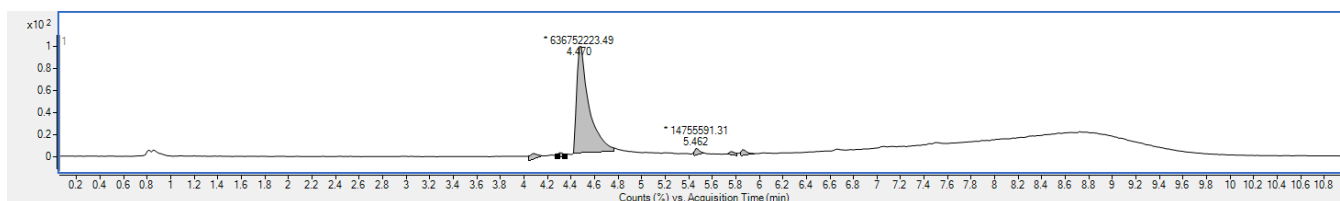


Slika 8. Kromatogram LD-1 u uvjetima oksidacije peroksidom (uvećani kromatogram)

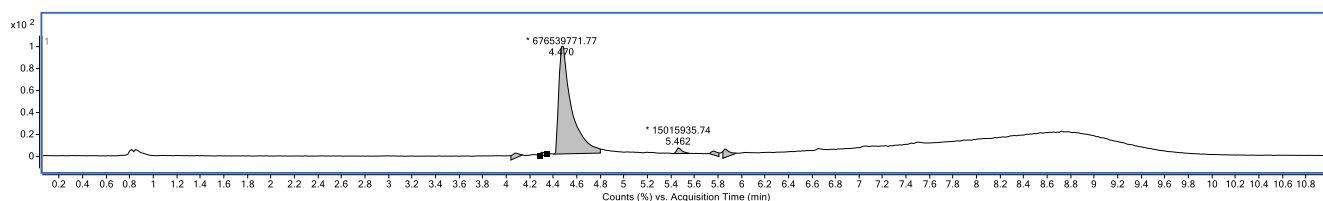




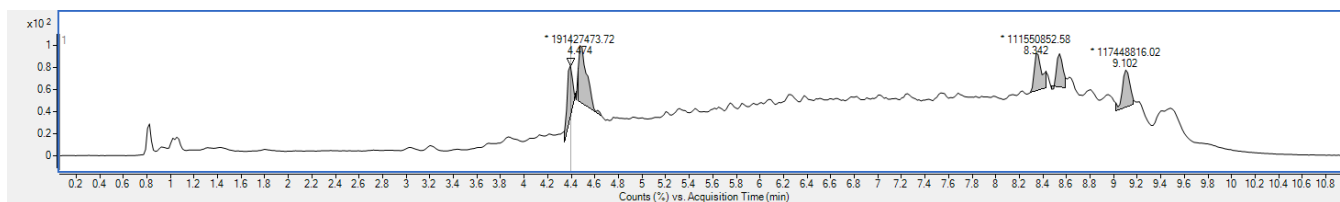
**Slika 9.** Kromatogram LD-1 razgrađenog u 0,5 M HCl (kisela hidroliza)



**Slika 10.** Kromatogram LD-1 razgrađenog u 0,5 M NaOH (lužnata hidroliza)



**Slika 11.** Kromatogram LD-1 izloženog temperaturi od 100 °C

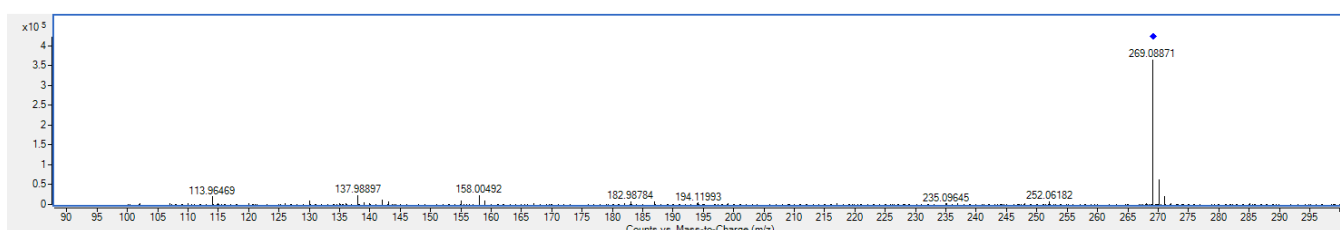


**Slika 12.** Kromatogram LD-1 izloženog fotolizi UV/VIS (500 Wh/m<sup>2</sup>)

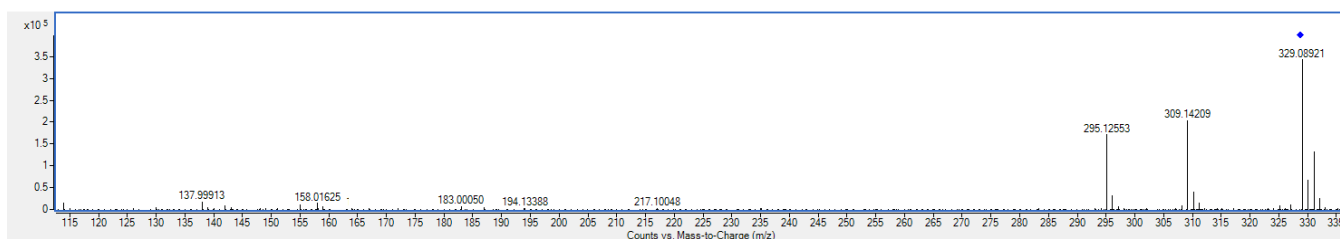
Nakon što su snimljeni spektri kod svih provedenih eksperimenata, utvrđeno je da prisilnom razgradnjom nosintetiziranog spoja LD-1 nastaje devet razgradnih produkata. Od devet nastalih razgradnih produkata najveći broj, njih 5, nastaje u uvjetima oksidacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od čega njih tri (*m/z* 301, *m/z* 309 i *m/z* 341) nastaju isključivo oksidacijom dok *m/z* 329 i *m/z* 325 također nastaju i u kiselim i u bazičnim uvjetima te pri povišenim temperaturama. Svi spojevi koji su podložni nastajanju pri kiselim, bazičnim ili temperaturno intenzivnim uvjetima nastaju

u sva tri slučaja. Postoje četiri razgradna produkta koji nastaju u ovim uvjetima. Već spomenuti  $m/z$  329 i  $m/z$  325 te  $m/z$  269 i  $m/z$  280 koji nastaju isključivo u kiselim/bazičnim/vrućim uvjetima. Samo dva razgradna produkta nastaju ozračivanjem pod UV/VIS spektrom. To su ujedno i spojevi s najvećim vremenom zadržavanja,  $m/z$  405 i  $m/z$  331, koji nastaju isključivo u ovim uvjetima forsirane razgradnje.

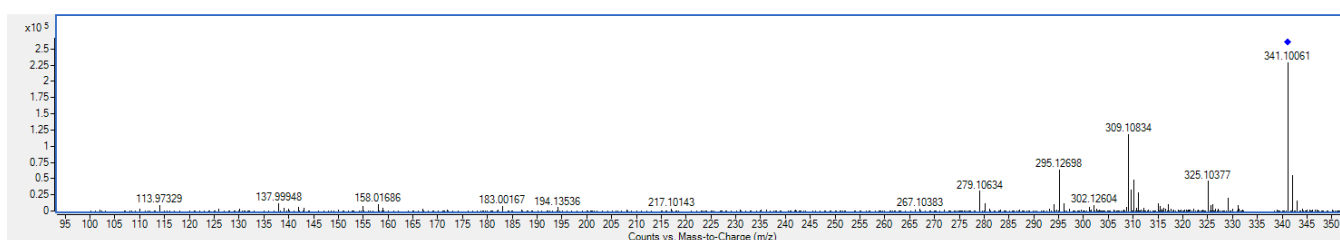
Za tih devet razgradnih produkata, napravljena je fragmentacija s ciljem određivanja njihove strukture. Njihovi MS/MS spektri prikazani su na Slikama 13-21.



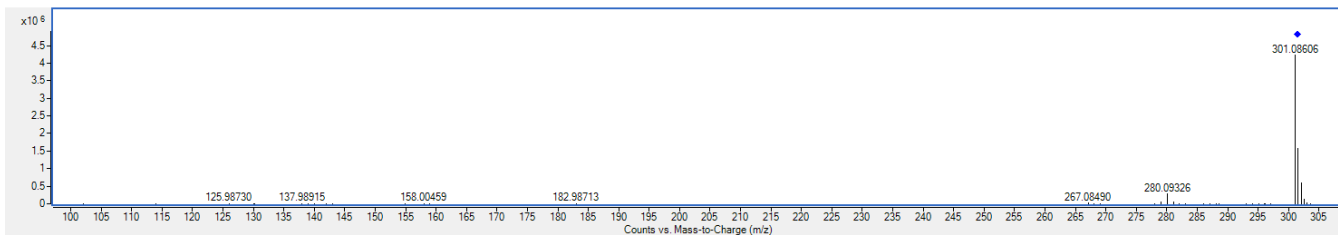
**Slika 13.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  269, vremena zadržavanja 4,074 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



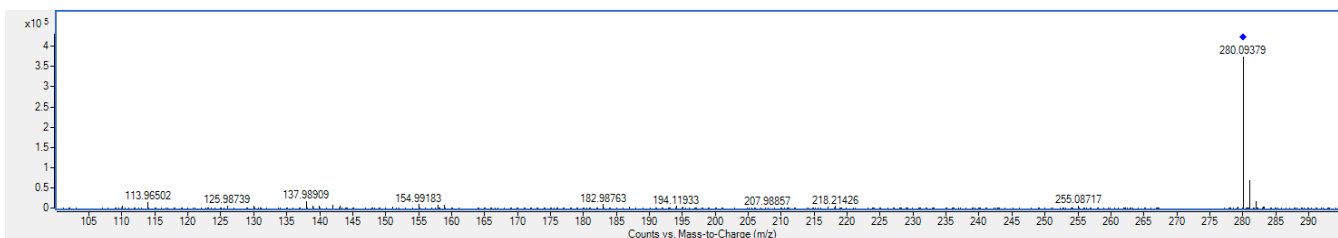
**Slika 14.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  329, vremena zadržavanja 5,463 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



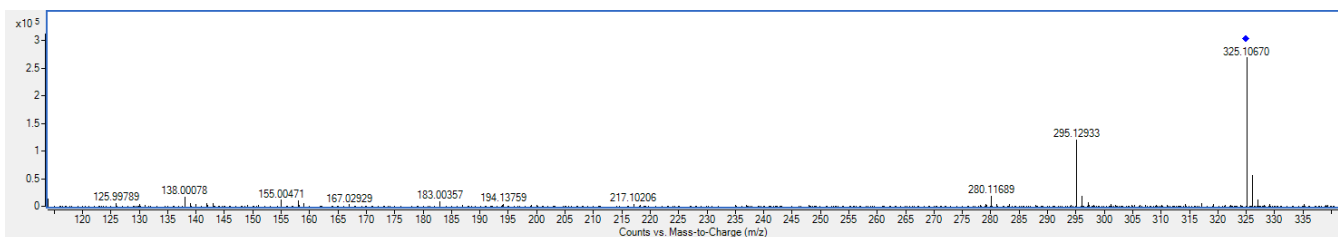
**Slika 15.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  341, vremena zadržavanja 5,678 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



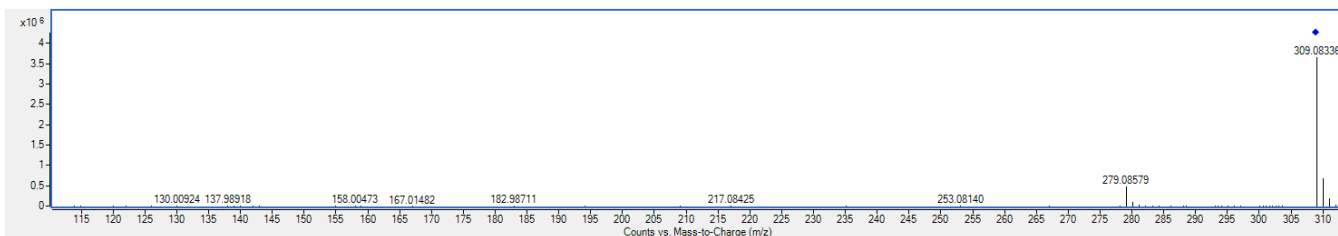
**Slika 16.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  301, vremena zadržavanja 5,711 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



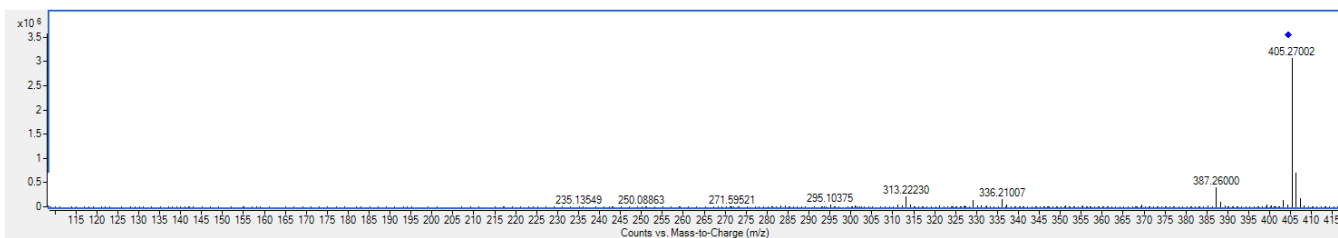
**Slika 17.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  280, vremena zadržavanja 5,760 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



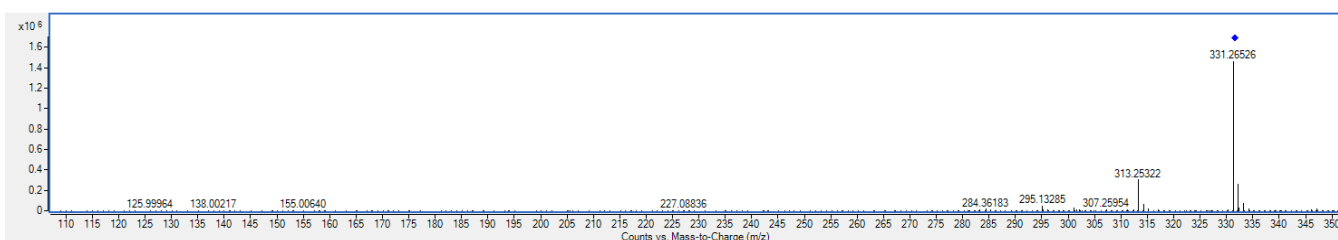
**Slika 18.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  325, vremena zadržavanja 5,859 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 19.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  309, vremena zadržavanja 6,009 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

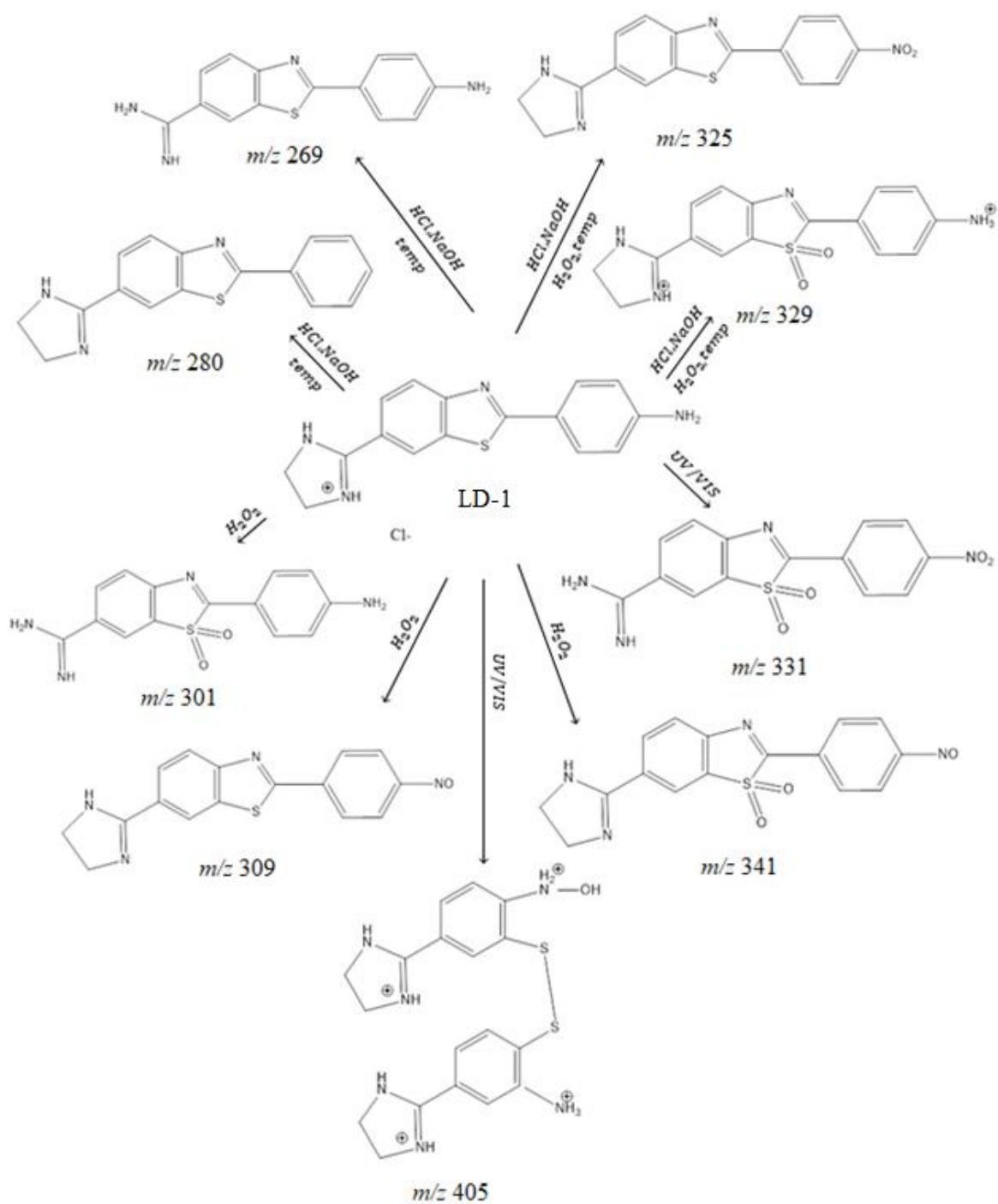


**Slika 20.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  405, vremena zadržavanja 8,342 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 21.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  331, vremena zadržavanja 9,102 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

Na osnovi fragmentacije detektiranih razgradnih produkata LD-1 odredila se njihova struktura i predložio razgradni put spoja LD-1. Predloženi razgradni put je prikazan na Slici 22. Većina predloženih struktura su nacrtane kao neutralne molekule, ali njihova vrijednost  $m/z$  odgovara MS/MS spektrima.



Slika 22. Predloženi razgradni put spoja LD-1

**Tablica 5.** Udio nastalih razgradnih produkata spoja LD-1 po eksperimentima

Razgradni produkti	Udio nastalih razgradnih produkata u stres uvjetima, %				
	Oksidacija, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 %	Hidroliza, HCl	Hidroliza, NaOH	Fotoliza, UV/VIS	Termalna razgradnja
269	-	1,04	2,91	-	2,16
329	2,93	2,09	2,08	-	2,00
341	17,26	-	-	-	-
301	36,81	-	-	-	-
280	-	1,28	1,37	-	1,63
325	11,82	1,59	2,18	-	3,20
309	6,11	-	-	-	-
405	-	-	-	18,02	-
331	-	-	-	18,97	-

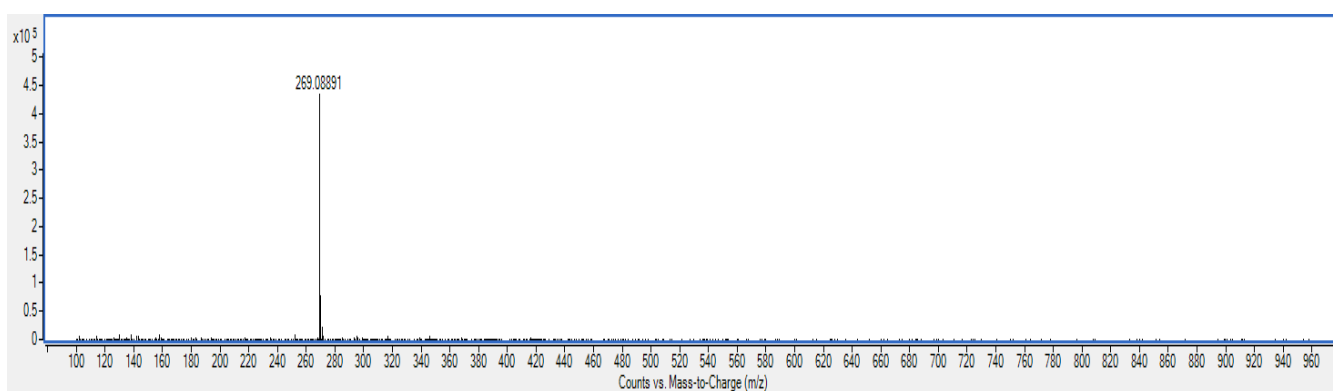
Od razgradnih produkata koji nastaju u uvjetima kisele i lužnate hidrolize te termalnoj razgradnji većina vrijednosti se nalazi ispod 3% i može se reći da je LD-1 podložan razgradnji u tim uvjetima ali u malim postocima. Većina razgradnih produkata uopće ne nastaje pod djelovanjem UV/VIS-a, no razgradni produkti koji se javljaju u tim uvjetima nastaju u relativno visokim udjelima od 18,97% (*m/z* 331) i 18,02% (*m/z* 405). Oksidacija s 10%-nim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je dala najveći broj različitih razgradnih produkata te najveći individualni udio od 36,81% za razgradni produkt *m/z* 301. Iz predloženih rezultata vidljivo je da se čak 74,93% LD-1 razgradi u pet različitih produkata pri oksidacijskim uvjetima, fotoliza daje samo dva razgradna produkta ali je njihov ukupni udio 36,99%. U procesu kisele hidrolize, lužnate hidrolize i temperaturnoj razgradnji nastaju četiri različita razgradna produkta, ali samo u udjelima od 6,00%, 8,54% i 8,99%.

Iz dobivenih rezultata vidi se da je LD-1 najpodložniji oksidaciji s 5 različitih razgradnih produkata koji čine udio od čak 74,93% te fotolizi sa samo dva razgradna produkta čiji je udio

od 34,99%. Uvjeti kisele i lužnate hidrolize te temperaturne razgradnje stvaraju razgradne produkte u manjim udjelima od drugih metoda pa se može reći da je LD-1 podložan razgradnji u tim uvjetima ali ne i u istoj mjeri kao oksidaciji i fotolizi.

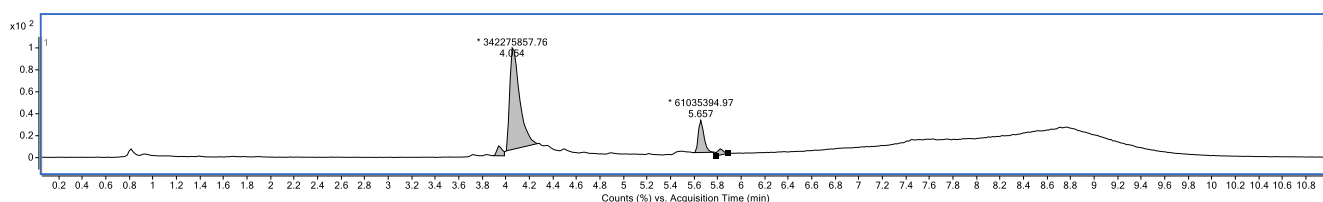
#### 4.1.2. IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA SPOJA LD-2

Najprije je snimljen kromatogram i spektar masa osnovnog spoja LD-1. Spektar masa je prikazan na Slici 23, a iz kromatograma primijećeno je da se osnovni spoj LD-1 pojavljuje na vremenu zadržavanja od  $t_R = 4,07$  min.

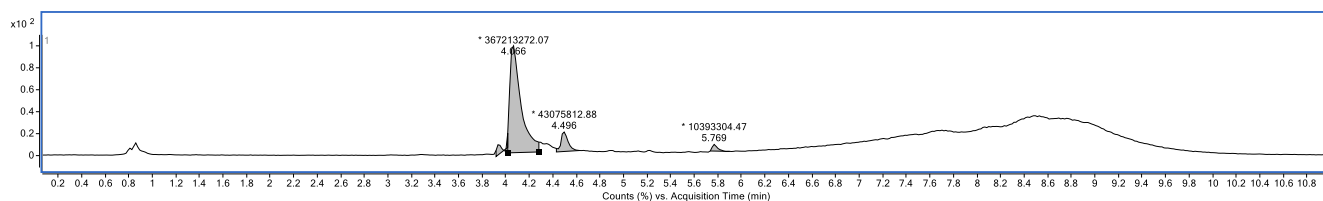


**Slika 23.** MS spektar osnovnog LD-2 spoja

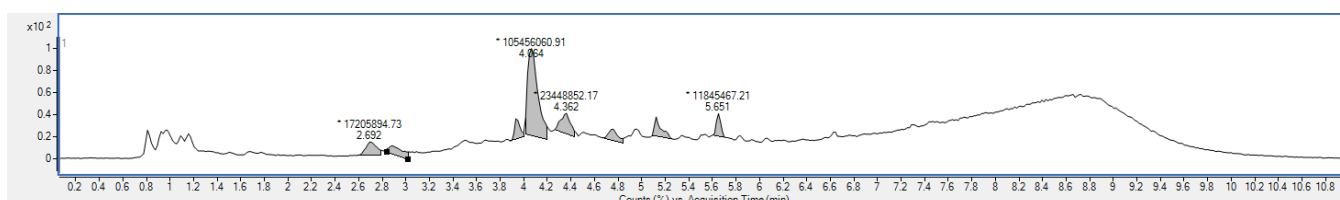
Zatim su snimljeni kromatogrami uzoraka LD-2 koji su bili podvrgnuti razgradnji s  $H_2O_2$ , HCl, NaOH, umjetnoj Sunčevoj svjetlosti te povišenoj temperaturi. Provedena ispitivanja pokazala su da je LD-2 podložan razgradnji u uvjetima kisele i lužnate hidrolize, oksidacijom s  $H_2O_2$  i uvjetima simuliranog sunčevog zračenja (Slike kromatograma 24-26.).



**Slika 24.** Kromatogram LD-2 u uvjetima oksidacije peroksidom (uvećani kromatogram)

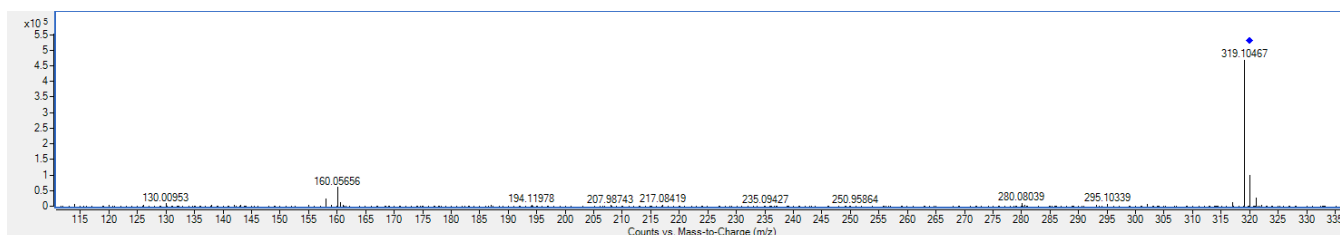


**Slika 25.** Kromatogram LD-2 razgrađenog u 0,5 M HCl (kisela hidroliza) i u 0,5 M NaOH (lužnata hidroliza)



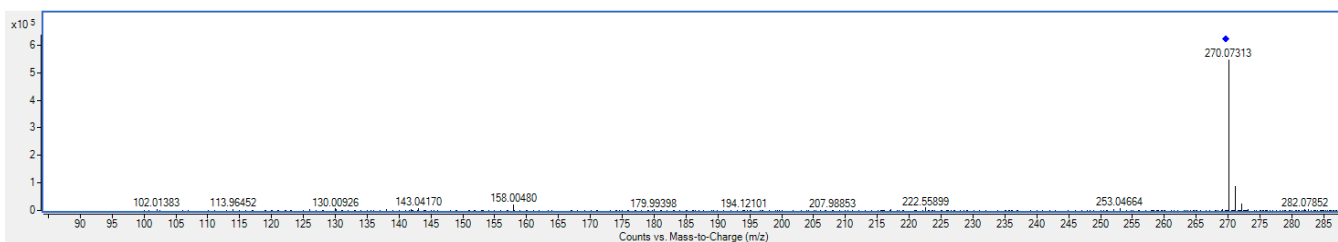
**Slika 26.** Kromatogram LD-1 izloženog fotolizi UV/VIS (500 Wh/m<sup>2</sup>)

Većina razgradnih produkata, četiri od njih sedam, nastaju u uvjetima fotolize dok u uvjetima oksidacije i hidrolize nastaju po tri različita razgradna produkta. Nijedan razgradni produkt ne nastaje u uvjetima termalne razgradnje. Jedino razgradni produkt  $m/z$  319 nastaje u svim uvjetima osim temperaturnoj razgradnji, razgradni produkt  $m/z$  299 nastaje u uvjetima oksidacije i fotolize dok svi ostali produkti nastaju u samo jednoj vrsti uvjeta. Razgradni produkt  $m/z$  283 nastaje isključivo pri oksidacijskim uvjetima,  $m/z$  360 i  $m/z$  295 pri hidrolizi te  $m/z$  270 i  $m/z$  397 pri fotolizi. Njihovi MS/MS spektri prikazani su na Slikama 27-33.

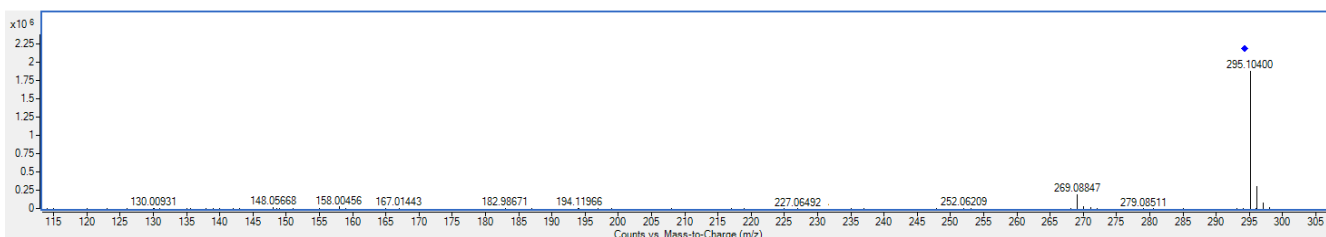


**Slika 27.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  319, vremena zadržavanja 3,938 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

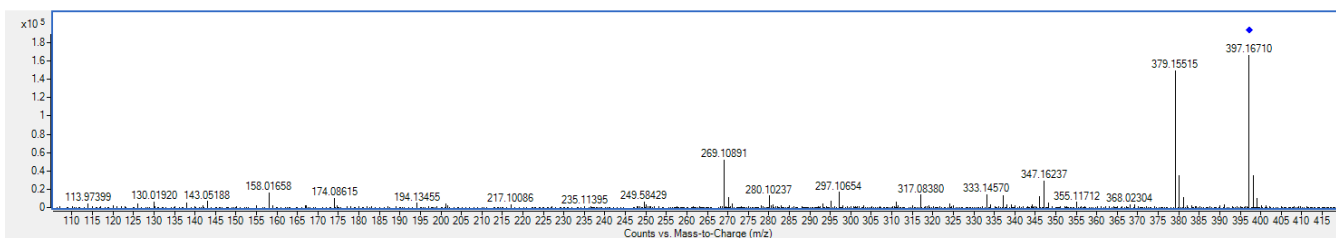




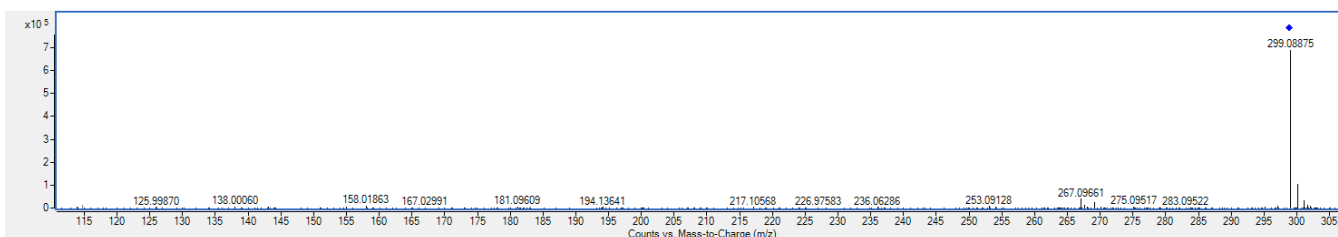
**Slika 28.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  270, vremena zadržavanja 4,362 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



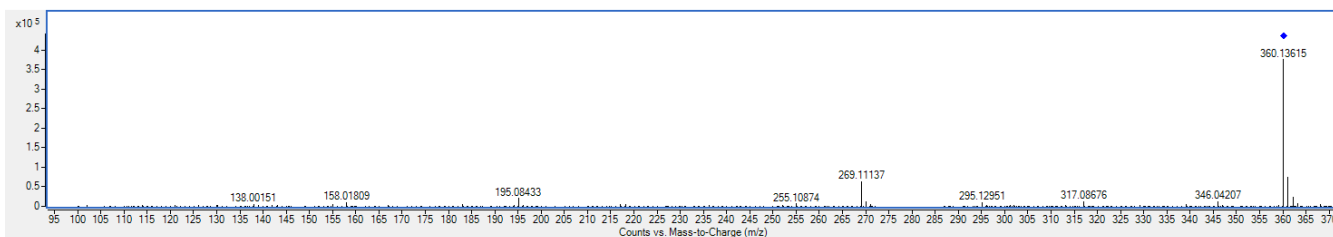
**Slika 29.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  295, vremena zadržavanja 4,496 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



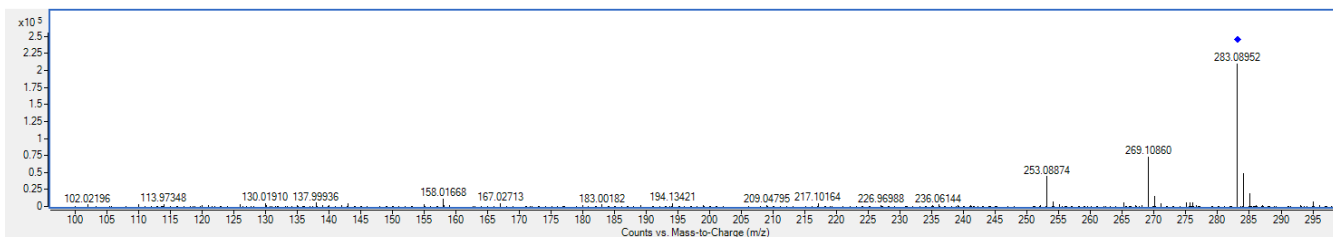
**Slika 30.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  397, vremena zadržavanja 4,758 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 31.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  299, vremena zadržavanja 5,651 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

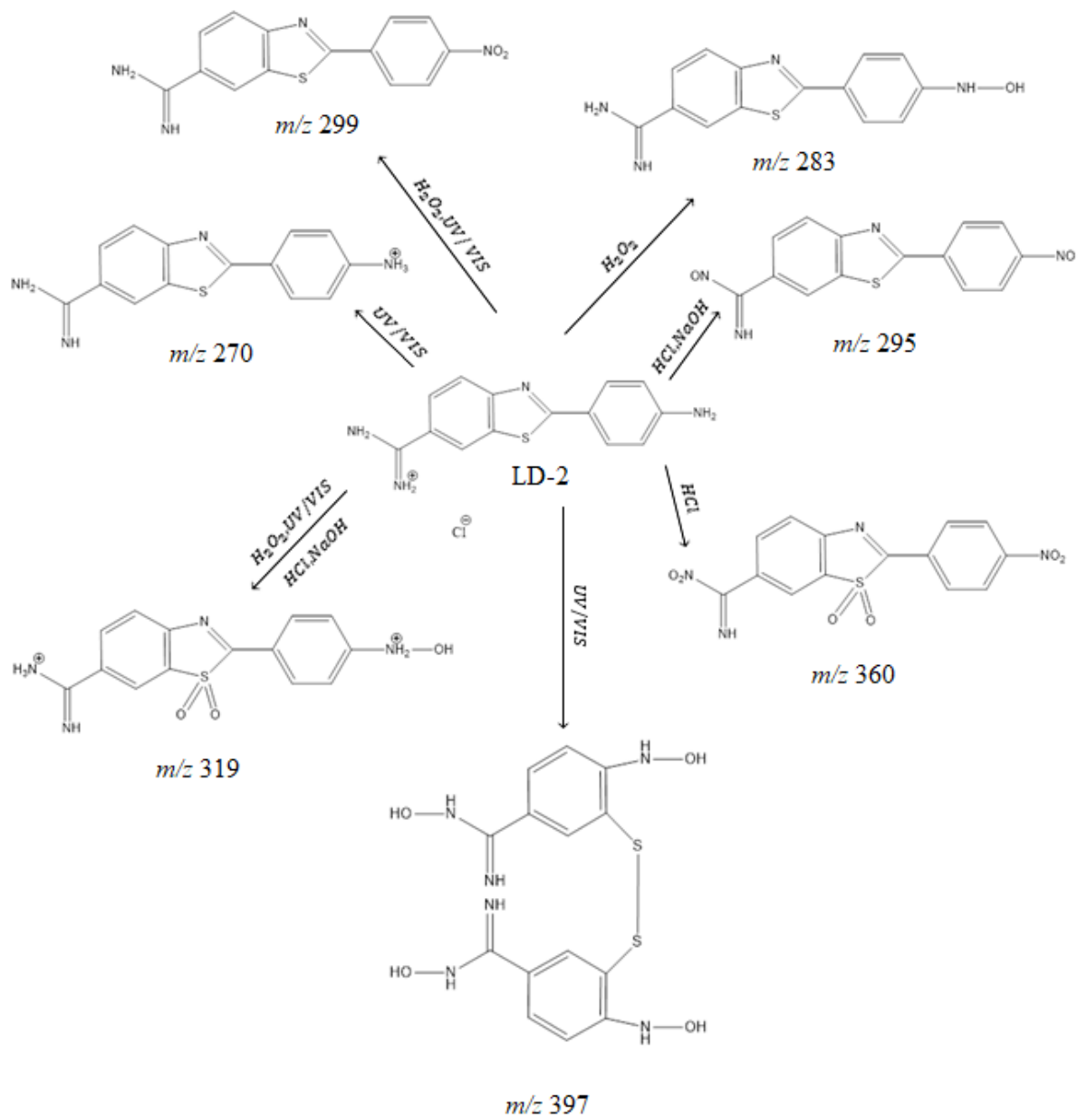


**Slika 32.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  360, vremena zadržavanja 5,769 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 33.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  283, vremena zadržavanja 5,822 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

Na osnovi fragmentacije detektiranih razgradnih produkata LD-2 odredila se njihova struktura i predložio razgradni put spoja LD-2. Predloženi razgradni put je prikazan na Slici 34. Većina predloženih struktura su nacrtane kao neutralne molekule, ali njihova vrijednost  $m/z$  odgovara MS/MS spektrima.



**Slika 34.** Predloženi razgradni put LD-2

**Tablica 6.** Udio nastalih razgradnih produkata spoja LD-2 po eksperimentima

Razgradni produkti	Udio nastalih razgradnih produkata u stres uvjetima, %			
	Oksidacija, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 %	Hidroliza, HCl i NaOH	Fotoliza, UV/VIS	Termalna razgradnja
319	4,1	3,47	5,95	-
270	-	-	10,97	-
295	-	9,88	-	-
397	-	-	5,84	-
299	14,1	-	5,54	-
360	-	2,38	-	-
283	2,71	-	-	-

Za hidrolizu u kiselim i lužnatim uvjetima dobiveni su identični rezultati pa se vode pod istim poljem u tablici rezultata.

Najveći individualni udjeli nekog razgradnog produkta su 14,1% nastalog  $m/z$  299 koji nastaje pri oksidaciji LD-2,  $m/z$  295 koji nastaje pri hidrolizi u udjelu od 9,88% te  $m/z$  270 koji u fotolizi čini 10,97% udjela. Sveukupni udjeli razgradnih produkata fotolize čine 28,30%, oksidacije 20,91% te hidrolize 15,73%. Iz rezultata se može pretpostaviti da od promatranih razgradnih produkata nijedan ne nastaje pri uvjetima povišene temperature.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je LD-2 podložan razgradnji fotolizom, oksidacijom i hidrolizom, a da ne podliježe termalnoj razgradnji.

## 4.2. PROCJENA TOKSIČNOSTI RAZGRADNIH PRODUKATA

Za procjenu bioakumulacijskog faktora, toksičnosti i mutagenosti spojeva LD-1, LD-2 i njihovih razgradnih produkata korišten je T.E.S.T. programski paket. Za sve procjene je korištena konsenzus metoda osim ako nije drugačije naglašeno u naslovu tablice rezultata za određeni spoj i proučavani faktor.

Bioakumulacija je proces u kojem se kemijska supstanca apsorbira unutar organizma iz okoliša s kojim je organizam u doticaju. Bioakumulacija je rezultat procesa apsorpcije kemikalija u organizmu kojemu su suprotstavljeni razni biološki i kemijski procesi eliminacije istih tih kemikalija u organizmu. Stupanj bioakumulacije se može odrediti preko bioakumulacijskog faktora izraženog kao omjera koncentracije kemikalije u organizmu i koncentracije kemikalije u vodi. [20]

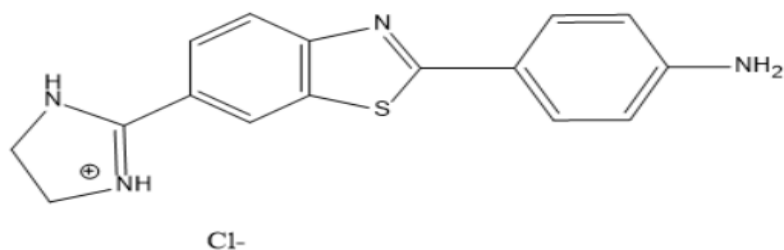
Skлонost kemikalije bioakumulaciji može se predvidjeti vrijednošću bioakumulacijskog faktora, prema kojoj je < 30 niska, 30-100 umjerena, 100-1000 visoka i > 1000 jako visoka sklonost bioakumulaciji. [21]

Razvojna toksičnost obuhvaća štetne utjecaje neke tvari na organizam u razvoju. Kemikalija se smatra razvojno toksičnom ako zbog izloženosti njoj neki organizam ima poteškoće u razvoju. U proučavanju razvojne toksičnosti prati se utjecaj na roditeljske organizme prije začeca promatranog organizma, prenatalni razvoj promatranog organizma i nakon rođenja sve do potpunog seksualnog razvoja organizma. [22]

Mutagenost se odnosi na induciranje trajno prenosive promjene u genetski materijal stanice ili organizma. Ove promjene mogu djelovati ili na jedan gen, skupinu gena ili kromosome. Svi mutageni agensi su genotoksični u nekoj mjeri. [23]

Pri procjeni razvojne toksičnosti i mutagenosti T.E.S.T. programskim paketom rezultati su dobiveni QSAR matematičkim modelima koji prezentiraju razvojnu toksičnost i mutagenost u binarnom sistemu gdje spojevi ili imaju ili nemaju određeno svojstvo. Na temelju niza fizikalnih deskriptora molekula koje se procjenjuju dobivaju se bezdimenzijske vrijednosti koje opisuju razvojnu toksičnost i mutagenost. Ako je tako dobivena bezdimenzijska vrijednost za razvojnu toksičnost ili mutagenost jednaka ili manja 0,5 spoj se smatra netoksičnim/nemutagenim. [24, 25]

#### 4.2.1. PROCJENA TOKSIČNOSTI LD-1 I NJEGOVIH RAZGRADNIH PRODUKATA



**Slika 35.** Prikaz molekulske strukture spoja LD-1

**Tablica 7.** Bioakumulacija za osnovni LD-1

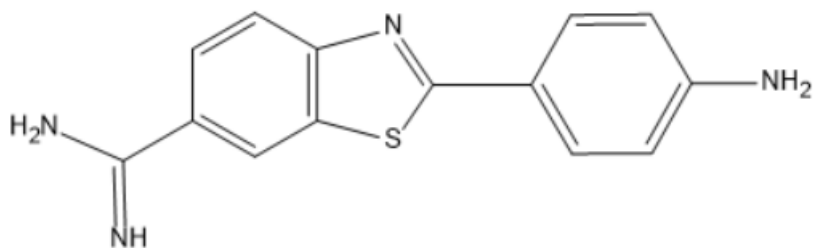
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	0,47
Bioakumulacijski faktor	2,93
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	0,62
Jedno modelska metoda	0,18
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	0,65
Metoda najbližeg susjeda	0,42

**Tablica 8.** Razvojna toksičnost za osnovni LD-1

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,55
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,52
Jedno modelska metoda	+0,57
FDA metoda	+0,56
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 9.** Mutagenost za osnovni LD-1

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,48
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,29
FDA metoda	+0,49
Metoda najbližeg susjeda	+0,67



**Slika 36.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  269

**Tablica 10.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  269

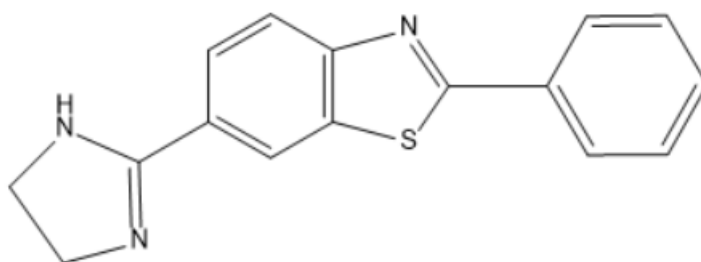
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 11.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  269

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,76
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,72
Jedno modelska metoda	+0,86
FDA metoda	+0,69
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 12.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  269

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,20
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,31
FDA metoda	+0,28
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 37.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  280

**Tablica 13.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  280

Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	1,09
Bioakumulacijski faktor	12,40
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	1,27
Jedno modelska metoda	1,23
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	1,45
Metoda najbližeg susjeda	0,42

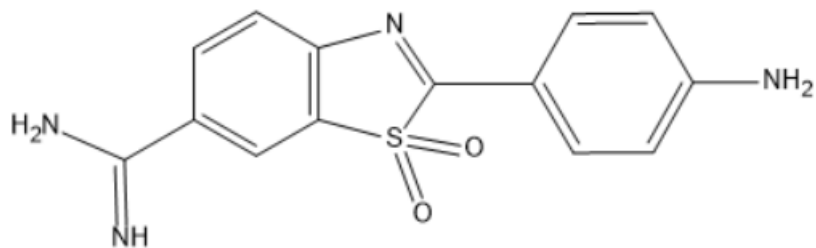
**Tablica 14.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  280

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,41
Rezultat procjene toksičnosti	Nije toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,49
Jedno modelska metoda	+0,50
FDA metoda	+0,25
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 15.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  280

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,61
Rezultat procjene mutagenosti	Mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,37
FDA metoda	+0,79
Metoda najbližeg susjeda	+0,67





**Slika 38.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  301

**Tablica 16.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  301

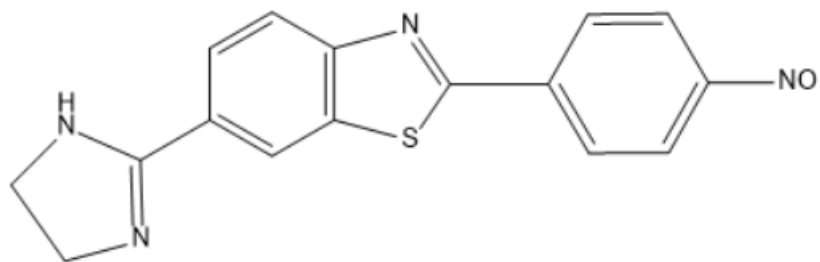
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 17.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  301

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,90
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,90
Jedno modelska metoda	+1,08
FDA metoda	+0,72
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 18.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  301

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,08
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,15
FDA metoda	+0,09
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 39.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  309

**Tablica 19.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  309 (Metoda najbližeg susjeda)

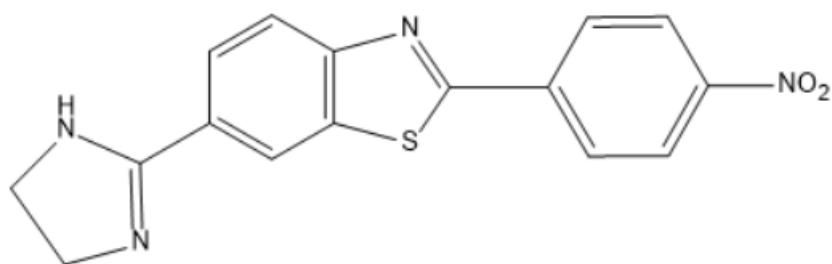
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	0,42
Bioakumulacijski faktor	2,63

**Tablica 20.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  309

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,90
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,68
Jedno modelska metoda	+0,71
FDA metoda	+1,31
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 21.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  309

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,69
Rezultat procjene mutagenosti	Mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,45
FDA metoda	+0,95
Metoda najbližeg susjeda	+0,67



**Slika 40.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  325

**Tablica 22.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  325

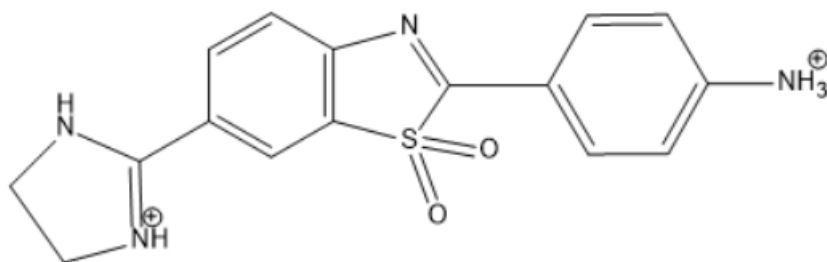
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	0,86
Bioakumulacijski faktor	7,30
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	1,27
Jedno modelska metoda	1,10
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	0,67
Metoda najbližeg susjeda	0,42

**Tablica 23.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  325

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,72
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,75
Jedno modelska metoda	+0,79
FDA metoda	+0,61
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 24.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  325

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,75
Rezultat procjene mutagenosti	Mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,56
FDA metoda	+1,02
Metoda najbližeg susjeda	+0,67



**Slika 41.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  329

**Tablica 25.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  329

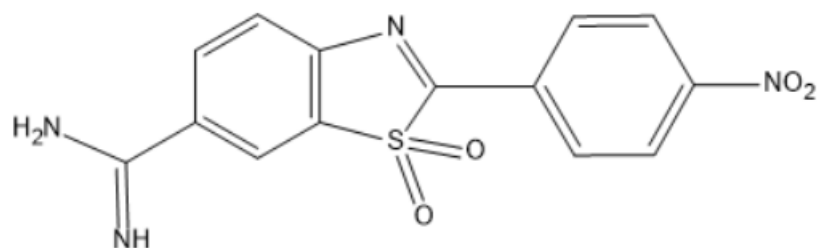
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	0,57
Bioakumulacijski faktor	3,71
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	0,20
Jedno modelska metoda	0,22
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	0,95
Metoda najbližeg susjeda	0,91

**Tablica 26.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  329

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,85
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,83
Jedno modelska metoda	+0,78
FDA metoda	+0,95
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 27.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  329

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,48
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,41
FDA metoda	+0,36
Metoda najbližeg susjeda	+0,67



**Slika 42.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  331

**Tablica 28.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  331

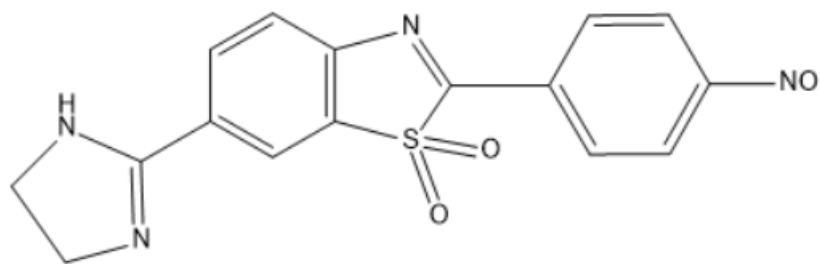
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 29.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  331

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+1,07
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+1,06
Jedno modelska metoda	+1,24
FDA metoda	+0,91
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 30.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  331

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,26
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,16
FDA metoda	+0,63
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 43.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1 s  $m/z$  341

**Tablica 31.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  341 (Najbliži susjed)

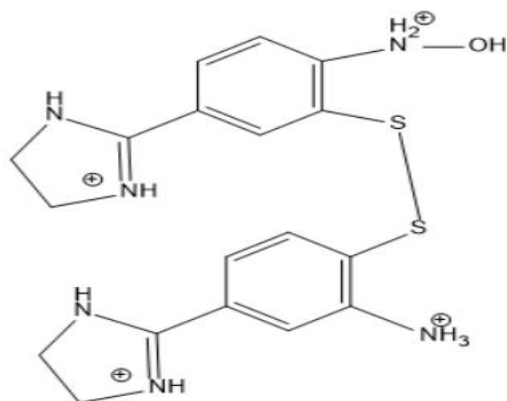
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	0,91
Bioakumulacijski faktor	8,05

**Tablica 32.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  341

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,96
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,91
Jedno modelska metoda	+0,86
FDA metoda	+1,12
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 33.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  341

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,50
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,63
FDA metoda	+0,20
Metoda najbližeg susjeda	+0,67



**Slika 44.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-1  $m/z$  405

**Tablica 34.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  405

Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log <sub>10</sub>	-0,14
Bioakumulacijski faktor	0,72
Metoda	Procijenjena Log <sub>10</sub> vrijednost
Hijerarhijska metoda	-0,14
Jedno modelska metoda	-0,14
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 35.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-1 s  $m/z$  405

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,90
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,85
Jedno modelska metoda	+0,87
FDA metoda	+0,99
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 36.** Mutagenost za razgradni produkt LD-1-a s  $m/z$  405

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,26
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,05
FDA metoda	+0,08
Metoda najbližeg susjeda	+0,67

Iz rezultata procjene toksičnosti u T.E.S.T. programskom paketu za spoj LD-1 i njegove razgradne produkte može se pretpostaviti da su većina ovih spojeva toksična. Za sve spojeve se može pretpostaviti da su toksični, osim spoj  $m/z$  280 koji s procijenjenom bezdimenzijskom vrijednosti razvojne toksičnosti od 0,41 pada ispod granice od 0,5 potrebne za klasifikaciju toksičnog spoja. Sam spoj LD-1 je procijenjen da je toksičan no valja naglasiti da su gotovo svi spojevi, osim spoja  $m/z$  280 koji ima manju toksičnost od LD-1, pokazali povećanu toksičnost u odnosu na spoj LD-1.

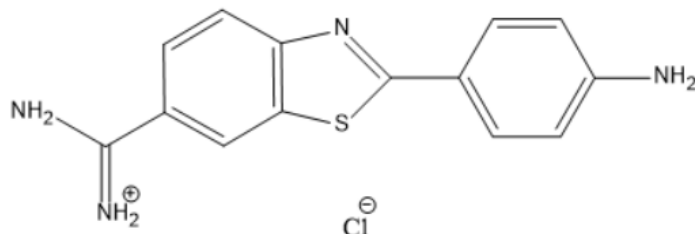
Samo su tri spoja pokazala potencijalnu mutagenost ( $m/z$  280,  $m/z$  309 i  $m/z$  325) za razliku od početnog spoja LD-1 koji nije procijenjen da ima mutageno djelovanje. Među njima su spojevi  $m/z$  309 i  $m/z$  325 posebno značajni jer imaju povećanu toksičnost i mutagenost u odnosu na LD-1 dok spojevi  $m/z$  280 i 405 ima manju mutagenost od LD-1.

Bioakumulacijski faktor se nije mogao odrediti za razgradne produkte  $m/z$  269,  $m/z$  301,  $m/z$  331. Među preostalim razgradnim produktima spojevi  $m/z$  309 (bioakumulacijski faktor od 2,63) i  $m/z$  329 (bioakumulacijski faktor od 3,71) pokazuju slične vrijednosti bioakumulacijskog faktora u usporedbi s LD-1 (bioakumulacijski faktor od 2,93) dok skoro svi ostali razgradni produkti imaju veće bioakumulacijske faktore (12,40 za spoj  $m/z$  280, bioakumulacijski faktor od 8,05 za spoj  $m/z$  341 i faktor od 7,30 za spoj  $m/z$  325). Jedino  $m/z$  405 ima bioakumulacijski faktor manji (0,72) od LD-1. Sve ove vrijednosti spadaju pod vrlo niske vrijednosti bioakumulacijskog faktora što ide u prilog tome da svi ispitivani spojevi pokazuju nisku sklonost bioakumulaciji. [21]

Od promatranih spojeva su po ovim procjenama spojevi  $m/z$  309 i  $m/z$  325 od posebnog interesa s obzirom da imaju slične ili veće vrijednosti bioakumulacije u usporedbi s LD-1 te vrijednosti toksičnosti i mutagenosti koje za oba prelaze vrijednost od 0,5 čineći ih i razvojno toksičnim i mutagenima.



#### 4.2.2. PROCJENA TOKSIČNOSTI LD-2 I NJEGOVIH RAZGRADNIH PRODUKATA



Slika 45. Prikaz molekulske strukture spoja LD-2

Tablica 37. Bioakumulacija za osnovni LD-2

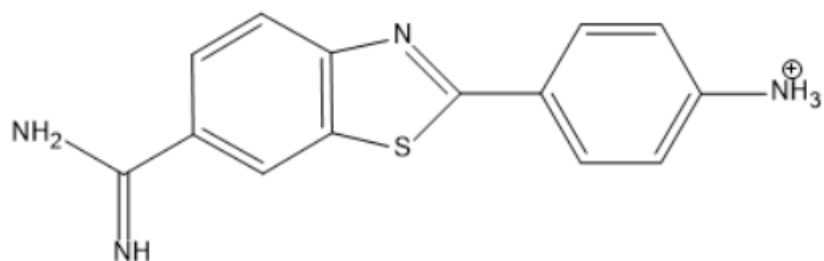
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	0,63
Bioakumulacijski faktor	4,30
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	0,95
Jedno modelska metoda	0,31
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

Tablica 38. Razvojna toksičnost za osnovni LD-2

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,77
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,57
Jedno modelska metoda	+0,75
FDA metoda	+1,00
Metoda najbližeg susjeda	/

Tablica 39. Mutagenost za osnovni LD-2

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,68
Rezultat procjene mutagenosti	Mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,56
FDA metoda	+0,82
Metoda najbližeg susjeda	+0,67



**Slika 46.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  270

**Tablica 40.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  270

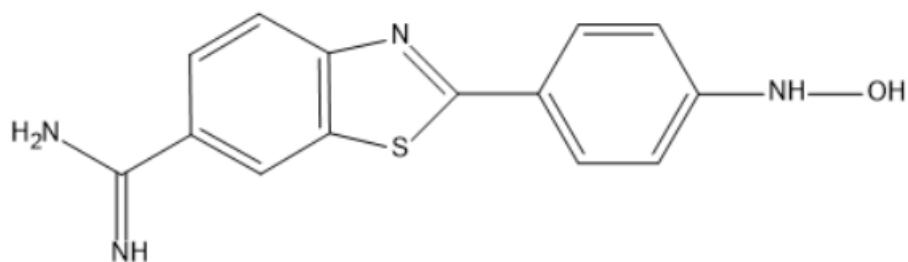
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 41.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  270

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,76
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,72
Jedno modelska metoda	+0,86
FDA metoda	+0,69
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 42.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  270

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,20
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,31
FDA metoda	+0,28
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 47.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  283

**Tablica 43.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  283

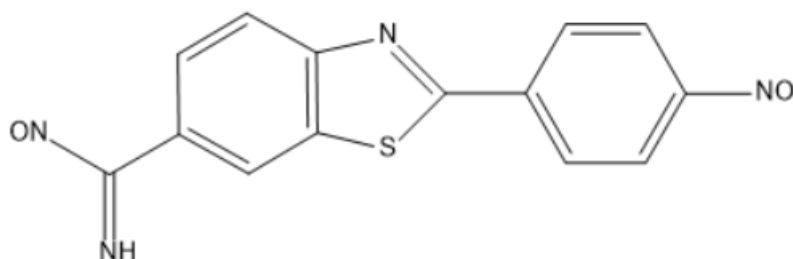
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 44.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  283

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,97
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,84
Jedno modelska metoda	+0,99
FDA metoda	+1,07
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 45.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  283

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,39
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,31
FDA metoda	+0,87
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 48.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  295

**Tablica 46.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  295

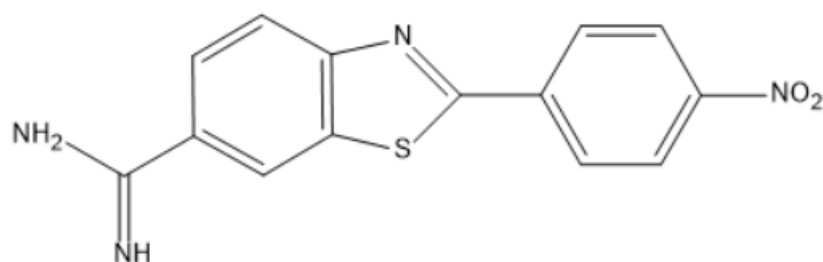
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 47.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  295

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,71
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,80
Jedno modelska metoda	+0,77
FDA metoda	+0,57
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 48.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  295

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,54
Rezultat procjene mutagenosti	Mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,63
FDA metoda	+0,65
Metoda najbližeg susjeda	+0,33



**Slika 49.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  299

**Tablica 49.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  299

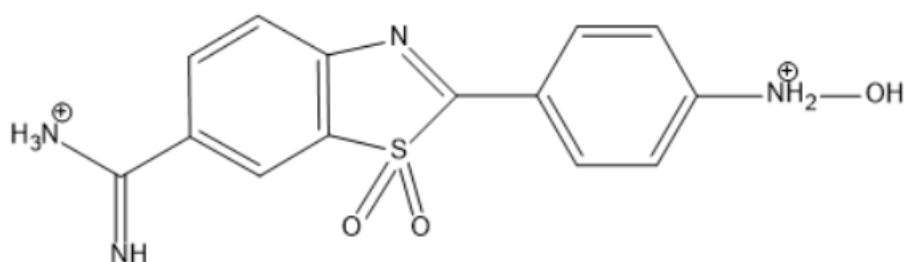
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 50.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  299

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,88
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,89
Jedno modelska metoda	+1,07
FDA metoda	+0,66
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 51.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  299

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,30
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,29
FDA metoda	+0,62
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 50.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  319

**Tablica 52.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  319

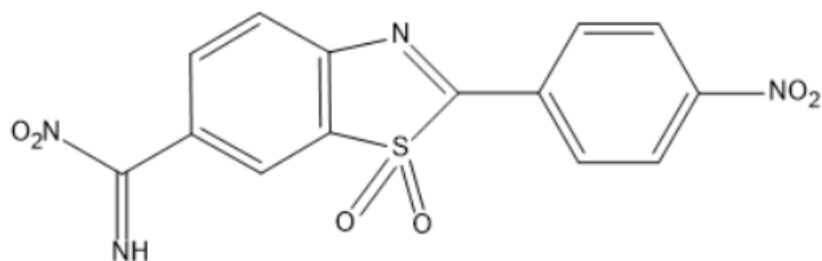
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 53.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2-a s  $m/z$  319

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+1,08
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+1,02
Jedno modelska metoda	+1,17
FDA metoda	+1,05
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 54.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2-a s  $m/z$  319

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,13
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,15
FDA metoda	+0,23
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 51.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  360

**Tablica 55.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  360

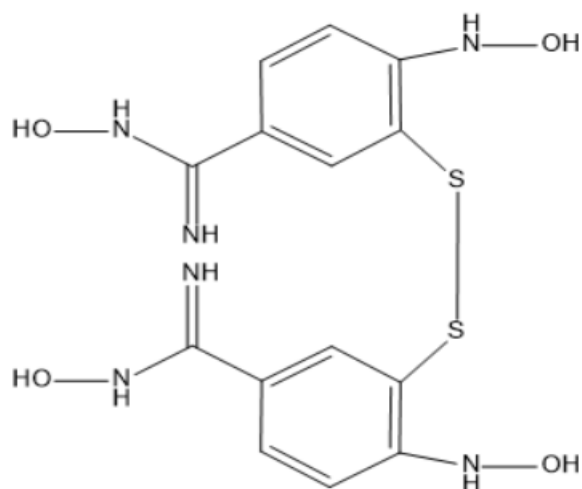
Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 56.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  360

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+1,07
Rezultat procjene toksičnosti	Toksično
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+1,05
Jedno modelska metoda	+1,07
FDA metoda	+1,11
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 57.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  360

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,27
Rezultat procjene mutagenosti	Nije mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,24
FDA metoda	+0,59
Metoda najbližeg susjeda	0,00



**Slika 52.** Prikaz molekulske strukture razgradnog produkta spoja LD-2 s  $m/z$  397

**Tablica 58.** Bioakumulacija za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  397

Krajnja točka	Procijenjena vrijednost
Bioakumulacijski faktor Log10	/
Bioakumulacijski faktor	/
Metoda	Procijenjena Log10 vrijednost
Hijerarhijska metoda	/
Jedno modelska metoda	/
Metoda doprinosa grupe	/
FDA metoda	/
Metoda najbližeg susjeda	/

**Tablica 59.** Razvojna toksičnost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  397 (FDA metoda)

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost toksičnosti	+0,48
Rezultat procjene toksičnosti	Nije toksično

**Tablica 60.** Mutagenost za razgradni produkt LD-2 s  $m/z$  397

Krajnja točka	Rezultat
Vrijednost mutagenosti	+0,52
Rezultat procjene mutagenosti	Mutageno
Metoda	Procijenjena vrijednost
Hijerarhijska metoda	+0,33
FDA metoda	+0,90
Metoda najbližeg susjeda	+0,33



Za ovaj niz spojeva se T.E.S.T. programski paket pokazao neprikladan za procjenu bioakumulacijskog faktora s obzirom da je jedini bioakumulacijski faktor koji je uspješno određen bioakumulacijski faktor spoja LD-2.

Od promatranih spojeva svi osim spoja *m/z* 397 su procijenjeni kao toksični dok svi ostali spojevi imaju sličnu (*m/z* 270 i *m/z* 297) ili veću toksičnost od ionako već toksičnog LD-2.

Većina spojeva u ovom setu su procijenjena da nisu mutageni osim samog spoja LD-2 i spojeva *m/z* 295 i *m/z* 397. Iako su spojevi *m/z* 295 i *m/z* 397 procijenjeni mutagenima oni su i dalje manje mutageni od početnog LD-2 pa se može reći da svi razgradni produkti LD-2-a imaju manju mutagenost od polaznog spoja te da većina razgradnih produkta nije mutagena.

## **5. ZAKLJUČAK**

Izlaganjem novosintetiziranih organskih spojeva LD-1 i LD-2 uvjetima forsiranja razgradnje, njihovim snimanjem spektrometrijom masa visoke razlučivosti te konačnom procjenom bioakumulacije, razvojne toksičnosti i mutagenosti u T.E.S.T programskom paketu smo došli do sljedećih zaključaka:

- Rezultati analize na 2D-UHPLC-QTOF instrumentu ukazuju na nastajanje devet razgradnih produkata spoja LD-1 te na nastajanje sedam razgradnih produkata spoja LD-2. Za daljnje potvrđivanje predloženih razgradnih produkata preporučuje se daljnja provjera drugim metodama za određivanje strukture organskih spojeva poput NMR ili IR.
- U radu su se procjenjivali bioakumulacijski faktor, razvojna toksičnost i mutagenost spojeva T.E.S.T. programskim paketom. Sve procjene su se vršile uglavnom konsenzus metodom osim ako nije drugačije naglašeno.
- Bioakumulacijski faktor se nije mogao odrediti za nijedan razgradni produkt spoja LD-2, te za tri od devet razgradnih produkata spoja LD-1 ( $m/z$  269, 301 i 331). Od uspješno procijenjenih bioakumulacijskih faktora svi razgradni produkti i spojevi LD-1 i LD-2 su imali vrlo niske vrijednosti te se za ove spojeve može pretpostaviti da ne postoji rizik od bioakumulacije. S obzirom da za velik broj spojeva nije uspješno procijenjen bioakumulacijski faktor preporučuje se procjena drugim programskim paketom ili eksperimentalna provjera.
- LD-1, LD-2 i svi njihovi razgradni produkti, osim  $m/z$  280 LD-1 i  $m/z$  397 LD-2, su procijenjeni kao toksični te njihovo ispuštanje u okoliš predstavlja potencijalni rizik za zdravlje ljudi i ekološki sustav.
- Svi razgradni produkti spoja LD-1, osim  $m/z$  280, imaju veću bezdimenzijsku procjenu toksičnosti od polaznog spoja LD-1. U kombinaciji s rezultatima koji pokazuju da razgradni produkti nastali oksidacijom s  $H_2O_2$  čine 74,93% masenog udjela u tim uvjetima te da je udio razgradnih produkata 36,99% pri uvjetima ozračivanja UV/VIS zračenjem može se zaključiti da su ovi uvjeti nepoželjni ukoliko se želi maksimalno smanjiti razvojna toksičnost. Među razgradnim produktima spoja LD-1 posebno se ističu  $m/z$  325 i 309 koji su ujedno procijenjeni da su i razvojno toksični i mutageni.

- LD-2 se pokazao stabilnijim od LD-1 u gotovo svim uvjetima. Od identificiranih razgradnih produkata nijedan nije nastao termalnom forsiranom razgradnjom te su ukupni udjeli nastalih razgradnih produkata manji nego što su za LD-1. LD-2 je procijenjen razvojno toksičnim i mutagenim. Svi razgradni produkti spoja LD-2, osim *m/z* 397, su procijenjeni kao razvojno toksični, no samo je jedan razgradni produkt razvojno toksičan i mutagen, *m/z* 295.
- LD-1 je procijenjen nemutagenim te su samo tri njegova razgradna produkata procijenjena mutagenima, *m/z* 280, 309 i 325. Spoj LD-2 je procijenjen mutagenim uz dva njegova razgradna produkata *m/z* 295 i 397. LD-2 u usporedbi sa svim svojim razgradnim produktima ima veću procijenjenu mutagenost te se može reći da procijenjena mutagenost LD-2 opada u procesima forsirane razgradnje.
- S obzirom na procijenjene vrijednosti toksičnosti i mutagenosti LD-1, LD-2 i njihovi razgradni produkti se mogu smatrati potencijalno opasnima za okoliš. U slučaju uporabe u industrijske svrhe preporučuje se detaljnije istraživanje ovih svojstava. Bioakumulacijski ovi spojevi ne predstavljaju potencijalnu opasnost.

## **6. LITERATURNI IZVORI**

- [1] L. Racané, M. Kralj, L. Šuman, R. Stojković, V. Tralić-Kulenović, G. Karminski-Zamola, Novel amidino substituted 2-phenylbenzothiazoles: Synthesis, antitumor evaluation in vitro and acute toxicity testing in vivo, *Bioorgan. Med. Chem.* **18** (2010) 1038-1044.
- [2] L. Racané, R. Stojković, V. Tralić-Kulenović, H. Cerić, M. Đaković, K. Ester, A. Mišir Krpan, M. Radić Stojković, Interactions with polynucleotides and antitumor activity of amidino and imidazolinylyl substituted 2-phenylbenzothiazole mesylates, *Eur. J. Med. Chem.* **86** (2014) 406-419.
- [3] M. Singh, A. Modi, G. Narayan, S. K. Singh, Benzothiazole derivatives bearing amide moiety: potential cytotoxic and apoptosis-inducing agents against cervical cancer, *Anti-Cancer Drug* **27** (2016) 519-532.
- [4] M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review, *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 159-165.
- [5] S. Singh, M. Bakshi, Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs, *Pharm. Technol.* **24** (2000) 1-14.
- [6] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, et al., The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59** (2007) 29-37.
- [7] A. Gupta, J. S. Yadav, S. Rawat, et al., Method development and hydrolytic degradation study of Doxofylline by RP HPLC and LC-MS/MS, *Asian J. Pharm. Anal.* **1** (2011) 14-18.
- [8] ICH Guidance for Industry, Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Product, International Conference on Harmonization. Dostupno na: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073373.pdf> ), 1996. (Posljedni pristup stranici 03.07.2020)
- [9] K. M. Alsante, T. D. Hatajik, L. L. Lohr, D. Santafianos, T.R. Sharp Solving impurity/degradation problems: Case studies, *Sep. Sci. Technol.* **5** (2004) 361-400.
- [10] F. Qiu, D. L. Norwood, Identification of pharmaceutical impurities, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **30** (2007) 877-935.

- [11] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers, *App. Spectrosc. Rev.* **44** (2009) 210-230.
- [12] R. H. Bateman, R. Carruthers, J. B. Hoyes, C. Jones, J. I. Langridge, A. Millar, J. P. C. Vissers, A Novel Precursor Ion Discovery Method on a Hybrid Quadrupole Orthogonal Acceleration Time-of-Flight (Q-TOF) Mass Spectrometer for Studying Protein Phosphorylation, *J. Am. Soc. Mass. Spectr.* **13** (2002) 792-803.
- [13] FDA Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologic, Food and Drug Administration. Dostupno na: ( <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics> ), 2015. (Posljedni pristup stranici 03.07.2020)
- [14] M. M. Annapurna, C. Mohapatro, A. Narendra, Stability-indicating liquid chromatographic method for the determination of Letrozole in pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Anal.* **2** (2012) 298-305.
- [15] M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods – critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28** (2002) 1011-1040.
- [16] L. R. Snyder, J. L. Glajch, J. J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, drugo izdanje, Wiley, New York, 1997.
- [17] M. P. Riddhiben, M. P. Piyushbhai, M. P. Natubhai, Stability indicating HPLC method development – a review, *Int. Res. J. Pharm.* **2** (2011) 79-87.
- [18] N. W. Ali, S. S. Abbas, H. E. Zaazaa, Validated stability indicating methods for determination of Nitazoxanide in presence of its degradation products, *J. Pharm. Anal.* **2** (2012) 105-116.
- [19] User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool) A Program to Estimate Toxicity from Molecular Structure. Dostupno na: ( <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> ), 2016. (Posljedni pristup 20.07.2020)

- [20] J. Arnot, F. A. Gobas, A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* **14** (2006), 257-297.
- [21] C. Franke, G. Studinger, G. S. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg, U. Jöhncke, The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere* **29** (1994) 1501-1514.
- [22] [https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/dev\\_tox.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/dev_tox.pdf) (Posljedni pristup 17.09.2020.)
- [23] [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Mutagenicity\\_and\\_Genotoxicity.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Mutagenicity_and_Genotoxicity.html) (Posljedni pristup 17.09.2020)
- [24] A. Cassano, A. Manganaro, T. Martin, D. Young, N. Piclin, M. Pintore, E. Benfenati, CAESAR models for developmental toxicity. *Chem Cent J*, **4** (2010).
- [25] T. Ferrari, G. Gini, An open source multistep model to predict mutagenicity from statistical analysis and relevant structural alerts. *Chem Cent J*, **4** (2010).



## **7. ŽIVOTOPIS**



# IVAN LUKAČ

**STUDENT  
EKOINŽENJERSTVA, FKIT**

## O MENI

████████████████████  
██████████ Vrlo sam znatiželjna osoba i uvijek tražim načine da primijenim teoretsko znanje u praktičnim i realnim okolnostima. Uživam u učenju novih vještina i u poboljšavanju postojećih. Dobro surađujem s drugima u timskom radu i uvijek nastojim da su svi zadovoljni i da pridonose na način koji će najbolje iskoristiti njihove sposobnosti.

## KLJUČNE KOMPETENCIJE

Samostalni rad s kemikalijama u miligramskim količinama  
Analiza velike količine podataka u sklopu izrade završnoga rada  
Interpretacija rezultata MS spektrometrije u sklopu pisanja diplomskoga rada

## AKADEMSKA POVIJEST

### Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Preddiplomski studij Primijenjena Kemija | Lis 2015 - Ruj 2018

- ♦ Prvostupnička diploma Primijenjene Kemije
- ♦ Tema preddiplomskog rada "Sorpcija memantina na prirodnim uzorcima tla i sedimenta"
- ♦ Eksperimentalni dio preddiplomskog rada odrađen na Zavodu za Analitičku Kemiju u suradnji s PLIVA d.o.o.

### Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Trenutni diplomski studij Ekoinženjerstva | od Lis 2018

- ♦ Tema diplomskog rada "Ispitivanje stabilnosti amidino supstituiranih derivata benzotiazola spektrometrijom masa visoke razlučivosti"
- ♦ Eksperimentalni dio odrađen na Zavodu za Analitičku Kemiju u suradnji s PLIVA d.o.o.

## DODATNA ISKUSTVA

Sudjelovanje na 2. ZORH susretu  
26.04.2019-27.04.2019  
Split, Hrvatska

Prisustvo na seminaru "Shimadzu Lab4You with LabSolutions Software"  
09.05.2019-10.05.2019  
Zagreb, Hrvatska

Demonstrator na laboratorijskim vježbama  
Zavod za Elektrokemiju, FKIT  
Lis 2020- Pro 2020  
Zagreb, Hrvatska

## OSTALE VJEŠTINE

74

Poznavanje njemačkog jezika na razini izvornog govornika (C2)  
Poznavanje engleskog jezika na naprednoj razini (C1)