

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Vendi Barbir

**Ispitivanje stabilnosti amidnih derivata benzimidazola i benzotiazola te  
određivanje strukture njihovih potencijalnih razgradnih produkata  
spektrometrijom masa visoke razlučivosti**

Zagreb, kolovoz 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 i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Razvoj novih lijekova.....	4
2.1.1. Preformulacija.....	4
2.1.2. Određivanje strukture novih aktivnih tvari [4].....	5
2.1.3. Djelovanje farmaceutika .....	6
2.1.4. Biološki aktivna tvar.....	6
2.2. Heterocikli.....	7
2.2.1. Benzimidazol .....	7
2.2.2. Biološka aktivnost derivata benzimidazola .....	8
2.2.3. Benzotiazol .....	9
2.2.4. Biološka aktivnost derivata benzotiazola .....	10
2.2.5. Nitro i amino supstituirani benzimidazol/benzotiazol-2-karboksamid [23] .....	11
2.3. Ispitivanja stabilnosti.....	12
2.3.1. ICH smjernice.....	13
2.3.2. Prisilna razgradnja .....	14
2.3.3. Nestabilnost farmaceutskih tvari i proizvoda .....	16
2.3.4. Uvjeti stres testova .....	17
2.4. Onečišćenja u novim aktivnim tvarima i lijekovima.....	21
2.4.1. Klasifikacija onečišćenja [37] .....	22
2.4.2. Propisani pragovi (granice) izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije .....	24
2.4.3. Kontrola onečišćenja [41] .....	25
2.4.4. Kvalifikacija onečišćenja.....	26
2.5. Analitičke metode.....	28
2.5.1. Tekućinska kromatografija.....	28
2.5.2. Q-TOF .....	29
2.6. Programski paketi za procjenu toksičnosti spojeva.....	30
2.6.1. QSAR modeli .....	30
2.6.2. TEST [56-57] .....	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	36
3.1. Materijali .....	37
3.1.1. Kemikalije.....	37
3.1.2. Ispitivani derivati benzimidazola i benzotiazola .....	37

3.2. Instrumenti.....	38
3.2.1. Analitička vaga.....	38
3.2.2. Vodena kupelj i sušilica.....	38
3.2.3. Suntest CPS+.....	39
3.2.4. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF).....	39
3.3. Računalni programi .....	40
3.3.1. ChemDraw Professional .....	40
3.3.2. TEST .....	41
3.4. Opis rada.....	42
3.4.1. Priprema uzoraka.....	42
3.4.2. Ispitivanje prisilne razgradnje .....	42
3.4.3. 2D-UHPLC-QTOF.....	43
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	47
4.1. Identifikacija produkata nastalih prisilnom razgradnjom.....	48
4.1.1. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-1 .....	48
4.1.2. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-2 .....	55
4.1.3. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-3 .....	61
4.1.4. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-4 .....	67
4.2. Procjena toksičnosti razgradnih produkata pomoću računalnog programa TEST .....	76
4.2.1. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-1 TEST-om.....	77
4.2.2. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-2 TEST-om.....	78
4.2.3. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-3 TEST-om.....	79
4.2.4. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-4 TEST-om.....	80
5. ZAKLJUČAK .....	90
6. LITERATURA .....	95
7. ZAHVALA .....	103
8. SAŽETAK .....	105
9. ABSTRACT.....	107
10. ŽIVOTOPIS.....	109

# **1. UVOD**

Održavanje zdravlja ljudi i životinja važna je odgovornost kroz povijest od drevnih civilizacija pa sve do današnjeg modernog društva. Upravo je ono dovelo do velikih otkrića brojnih terapijskih sredstava prvenstveno iz prirodnih izvora od kojih su mnogi i danas u primjeni. U posljednjih pedesetak godina suradnja između brojnih farmaceutskih tvrtki i akademskih te znanstvenih institucija dovela je do boljeg razumijevanja mehanizama djelovanja te uklanjanja bolesti. Dolazi do razvijanja sve selektivnijih i manje toksičnih lijekova. No, prije razvoja samoga procesa dobivanja novog farmaceutskog proizvoda potrebno je poznavati temeljne fizikalno-kemijske karakteristike novog kemijskog entiteta kako bi se osigurali potrebni uvjeti proizvodnje te se predvidio opseg djelovanja lijeka.

Kako bi se uz djelatnu aktivnu tvar prepoznala i onečišćenja koja mogu biti prisutna kao posljedica proizvodnje ili razgradnje, farmaceutska industrija sustavno provodi ispitivanja stabilnosti. Ona se provode u svrhu praćenja promjena koje se mogu pojaviti tijekom proizvodnje ili skladištenja te ukazuje na ponašanje i stabilnost samog lijeka. Prema ICH smjernicama onečišćenja se klasificiraju kao organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Organska onečišćenja i nusprodukti nastali razgradnjom aktivne tvari pod utjecajima (temperature, svjetla, promjene pH-vrijednosti, oksidacije) mogu imati različita toksična djelovanja te u konačnici utjecati na sigurnost i samu djelotvornost tvari.

Benzimidazoli i benzotiazoli su biciklički heteroatomski spojevi koji pokazuju izraženu biološku aktivnost, između ostaloga i antiproliferativnu te antioksidativnu aktivnost. Oni su zbog niza svojih dobrih svojstava (antitumorska, antimikrobna, protuupalna, itd.) vrlo važni potencijalni biološki agensi te su posljednjih godina privukli veliku pažnju znanstvenika. Upravo iz tog razloga, u ovom radu ispitana je stabilnost biološki aktivnim amidnim derivatima benzimidazola i benzotiazola pod utjecajem temperature i svjetla, podložnost oksidaciji, te kiseloj i lužnatoj hidrolizi.

Definiran je put razgradnje ispitivanih spojeva i predložene su strukture glavnih razgradnih produkata. Za separaciju, identifikaciju te karakterizaciju ispitivanih spojeva korišten je tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF). Također je računalnim programom TEST (*Toxicity Estimation Software Tool*) procijenjena toksičnost identificiranih razgradnih produkata.

Ovaj rad daje pregled praktične uspješnosti sustava prisilne razgradnje i njezine primjene za razvitak metoda indikacije stabilnosti.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Razvoj novih lijekova

Drevne civilizacije i moderno društvo, imale su veliki interes za zdravlje čovjeka i drugih životinja. Ovaj interes tijekom vremena doveo je do otkrića velikog broja terapijskih sredstava prvenstveno iz prirodnih izvora od kojih se mnogi još uvijek koriste kao bazne strukture za otkriće novih, unaprijeđenih lijekova. U novije vrijeme (~50 godina), uz sudjelovanje velikog broja farmaceutskih tvrtki i mnogih akademskih institucija, napredak u razumijevanju procesa bolesti, mehanizma za kontrolu i uklanjanja bolesti su se ubrzali. Povećanje znanja o osnovnim uzrocima bolesti omogućuje otkrivanje selektivnijih, manje toksičnih lijekova. Napredak u molekularnoj biologiji (npr. sekvenciranje ljudskog genoma, proteomika, farmakogenomika i inženjerstvo proteina) dovodi do novih puteva za precizno razumijevanje mehanizma bolesti (biokemijski putevi) i otkrivanje novih meta širenja bolesti. Očekuje se da će napredak dovesti do visoko selektivnih i djelotvornih lijekova. Rekombinantne tehnologije sada omogućavaju sintezu većih biološki aktivnih proteina u dovoljnim količinama. Proteini i monoklonska antitijela postaju sve važnija i češća terapijska sredstva. Dolazi i do razvoja novih cjepiva protiv infekcijskih zaraza. Jednako je važan razvoj na području kombinatorne kemije koja omogućava sintezu milijuna spojeva. Tehnologije probira kao i druge automatizirane tehnike olakšavaju brže otkrivanje novih lijekova. Dugoročno gledano, kombinacija svih ovih novih razvojnih procesa vjerojatno će stvoriti sigurnije i učinkovitije lijekove, ne samo za postojeće, već i za buduće bolesti, kao i dovesti do promjena u načinu života i povećanju životne dobi ljudi [1]. Međutim, prema izvoru [2] Američka agencija za hranu i lijekove, FDA<sup>1</sup> u svom statističkom pregledu navodi kako većina proizvoda ne zadovolji klinička ispitivanja u razvojnim fazama II i III, zbog neučinkovitosti lijeka (56 %), pojave toksičnosti (28 %), komercijalnih razloga (5 %), operativnih prepreka (5 %) i strateških razloga (7 %). Stoga, kako bi se izbjegle prepreke koje se mogu pojaviti tijekom formulacije, kasnijih razvojnih faza, registracije i isporuke samog proizvoda potrebno je provesti preformulacijska ispitivanja [3].

### 2.1.1. Preformulacija

Iz industrijske perspektive, preformulacija se često smatra aktivnošću koja objedinjuje koordinirane napore između različitih područja i vještina kao što su analitika, razvojna formulacija, regulatorna i druga tijela tijekom čitavog razvojnog ciklusa proizvoda [3]. Prije

---

<sup>1</sup> eng. *Food and Drug Administration*, FDA



razvoja procesa dobivanja novog farmaceutskog proizvoda, temeljne fizikalno-kemijske karakteristike o novom kemijskom entitetu, NCE<sup>2</sup> ili lijeku, IND<sup>3</sup> moraju biti poznate. One osiguravaju vrijedne podatke za daljnji razvoj procesa proizvodnje, postavljanja potrebnih uvjeta i predviđanja opsega djelovanja lijeka. U ranim fazama razvoja lijeka bit će dostupne samo male količine ljekovite tvari što dovodi do kompetencije između farmakologije i ranih *in vivo* ispitivanja te preformulacijskih testiranja. Upotreba ovih malih količina mora biti umjerena te osigurati da se dobiju sve potrebne informacije za daljnji razvoj proizvodnog procesa [4]. Preformulacijska ispitivanja koriste se da bi se utvrdila fizikalno-kemijska svojstva aktivnih tvari, postupak proizvodnje kao i dozirni oblici [5]. Kemijska čistoća i stabilnost važne su i u farmakologiji kao i u preformulacijskim ispitivanjima [4]. Kritični čimbenici koji utječu na kvalitetu pri proizvodnji „rasutih“ farmaceutski aktivnih tvari su [6]: 1) Kristalizacija, 2) Pranje mokrog kolača, 3) Sušenje, 4) Pakiranje.

### **2.1.2. Određivanje strukture novih aktivnih tvari [4]**

Nakon sinteze važno je utvrditi kemijsku strukturu potencijalno novih aktivnih tvari. Ovaj postupak obuhvaća tehnike poput spektrometrije masa, nuklearne magnetske rezonancije ( $H^1$  i  $C^{13}$ ), IR i UV/VIS spektrofotometrije uz upotrebu elementarnih analiza. Ovi postupci omogućavaju određivanje kemijske strukture te dobivanja novih korisnih podataka koji će pomoći u daljnjim koracima razvoja lijeka poput analitičkog razvoja. Početni prioritet pri razvoju novog lijeka je razviti analitičku metodu koja može detektirati glavnu komponentu kao i intermedijere nastale u procesu sinteze ili razgradnje uvjetovane kemijskim putem ili nestabilnošću. Razgradni produkti su od velike važnosti jer o njihovoj identifikaciji, kvantifikaciji i kontroli ovisi kvaliteta krajnjih proizvoda. Nadalje, pojava razgradnih produkata očituje se više u povećanju koncentracije glavne komponente, nego u smanjenju. Također metode su zadužene za otkrivanje i nekih drugih onečišćenja poput ostatnih otapala, katalizatora, teških metala i mikrobioloških kontaminacija. Povrh toga, analitičke tehnike važne su pri određivanju osnovnih svojstava, boje, temperature tališta i gubitaka pri sušenju tvari, a moraju se prilagođene provoditi na svim razinama procesa. Analiza lijekova obično se provodi separacijskim tehnikama poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti,

---

<sup>2</sup> eng. *New chemical entity*, NCE

<sup>3</sup> eng. *Investigational new drug*, IND

HPLC<sup>4</sup> i kapilarne zonske elektroforeze, CZE<sup>5</sup>. Ove tehnike osiguravaju kvantifikaciju i odvajanje ljekovite tvari od njenih onečišćenja i razgradnih produkata.

### **2.1.3. Djelovanje farmaceutika**

Znanstvenu osnovu djelovanja farmaceutika na ljude pruža disciplina koja se naziva klinička farmacija. Klinička farmacija bavi se učincima lijekova kod ljudi. To uključuje proučavanje interakcije lijekova sa svojim receptorima, transdukcijske sustave za koje su povezani i promjene koje oni stvaraju u stanicama, organima i cijelom organizmu. Proučavanjima učinaka farmaceutika na biološke procese bavi se farmakodinamika. Čovjek je sisavac te da bi se predvidjelo djelovanje farmaceutika na njegov organizam važno je provesti razna ispitivanja, ponekad i na životinjama, što ipak nije uvijek vjerodostojno te je često i ograničeno. Dokazi o stvarnoj učinkovitosti kao i neželjeni učinci lijeka mogu se sa sigurnošću utvrditi tek u kliničkim ispitivanjima, dok profili nuspojava postaju jasniji tek kod njegove šire primjene [1]. Klinička farmacija sadrži skup funkcija koje promiču sigurnu, učinkovitu i ekonomičnu uporabu lijekova za pacijente. Nastanak kliničke farmacije omogućio je farmaceutima prebaciti se s proizvodnje lijeka na direktan angažman s pacijentima i problemima s kojima se oni susreću prilikom same primjene lijekova [7].

### **2.1.4. Biološki aktivna tvar**

Djelatna tvar je sastojak farmaceutskog lijeka ili pesticida koji je biološki aktivan. U medicini mogu se pronaći i slični uporabni nazivi ovisno o svrsi primjene lijeka, a pojam aktivna tvar može se koristiti i za prirodne proizvode. Neki lijekovi mogu sadržavati više aktivnih sastojaka. Pripravljena i oblikovana doza lijeka sadrži aktivni farmaceutski sastojak, API<sup>6</sup>, odnosno ljekovitu supstancu, pomoćne tvari, koje su sastojci tablete, kapljevinu u kojoj je aktivno sredstvo suspendirano ili drugi materijal koji je inertan. Lijekovi se biraju prvenstveno zbog njihovih aktivnih sastojaka. Tijekom formulacije, pomoćne tvari biraju se pažljivo, tako da aktivni sastojak može doći do željenog mjesta u tijelu u potrebnom opsegu i brzinom [8]. Znanstvene smjernice Europske agencije za lijekove, EMA<sup>7</sup> o biološkim aktivnim tvarima pomažu proizvođačima u pripremi zahtjeva za odobrenje stavljanja, odnosno implementacije aktivnih tvari u lijekove namijenjene za humanu primjenu [9].

---

<sup>4</sup> eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC

<sup>5</sup> eng. *Capillary zone electrophoresis*, CZE

<sup>6</sup> eng. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API

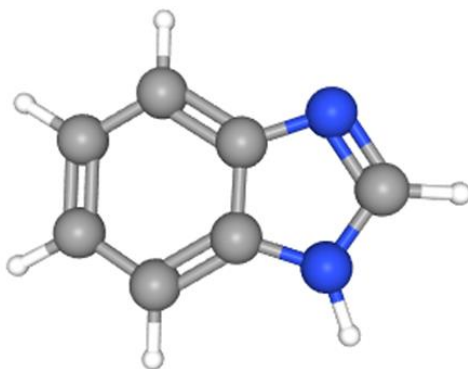
<sup>7</sup> eng. *European Medicines Agency*, EMA

## 2.2. Heterocikli

Heterociklički spojevi su oni ciklički spojevi čiji prsten sadrži, osim ugljika, jedan ili više atoma ostalih elemenata. Ne-ugljikovi atomi u takvim prstenovima se nazivaju heteroatomi. Najčešći heteroatomi su dušik, sumpor i kisik. Poznati su mnogi heterocikli s tri do šest atoma u prstenu, ali samo su oni koji imaju pet ili šest atoma u prstenu najvažniji, zbog svoje stabilnosti. Heterociklički spojevi su u prirodi vrlo rasprostranjeni i posebno su važni zbog raznih fizioloških aktivnosti. Nalazimo ih kao dijelove strukture mnogih važnih molekula poput vitamina, alkaloida, klorofila i drugih pigmenata, itd. [10]. Heterocikli također imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i medicinskoj kemiji koja se bavi razvojem novih lijekova kao i u organskoj kemiji usredotočenoj na njihove sinteze. Dušikovi heterocikli posebno pokazuju različite biološke i farmakološke aktivnosti dijelom zahvaljujući sličnostima s mnogim prirodnim i sintetskim molekulama s poznatim biološkim djelovanjem [11].

### 2.2.1. Benzimidazol

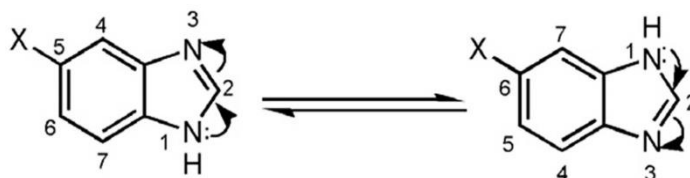
Benzimidazol je biciklički, aromatski spoj u kojem je benzenski prsten spojen na položaju 4 i 5 s imidazolskim prstenom, molekulske formule  $C_7H_6N_2$ . Benzimidazol je također poznat kao *1H*-benzimidazol, a njegova struktura prikazana je na Slici 2.1. [10-11]. Benzimidazoli zbog svoje strukture posjeduju kiseli i bazni karakter. NH grupa prisutna u benzimidazolu je relativno jako kisela i također slabo bazična. Još jedna karakteristika benzimidazola je da ima sposobnost formiranja soli. S nesupstituiranim NH skupinama stvara se ravnotežna smjesa asimetrično supstituiranih spojeva procesom tautomerizacije [10], kako je prikazano na Slici 2.2.



**Slika 2.1.** Molekula benzimidazola [12]

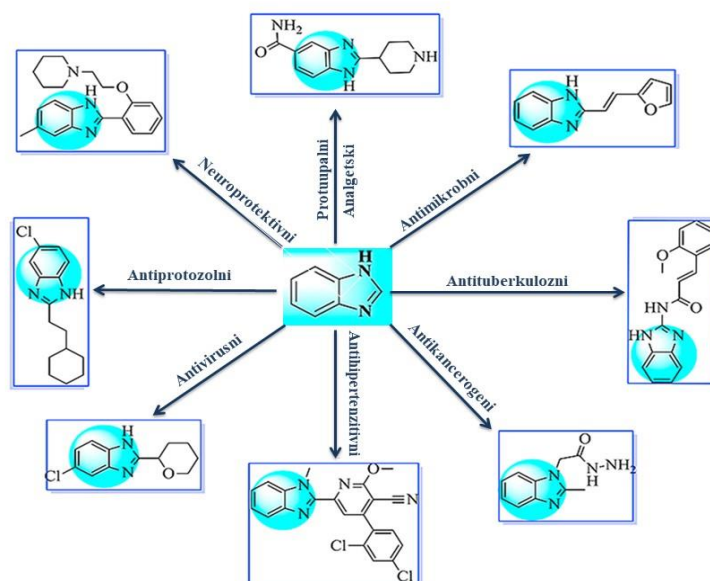
### 2.2.2. *Biološka aktivnost derivata benzimidazola*

Jezgra benzimidazola je strukturni dio mnogih bioaktivnih heterocikličkih spojeva koji su od širokog interesa zbog raznolike biološke i farmakološke primjene. Nadalje, derivati benzimidazola su strukturni izosteri prirodnih nukleotida, što im omogućava laku interakciju s biopolimerima živih sustava [13]. Benzimidazoli su jedni od najistraživanijih skupina heterocikla. Pridobili su veliku pažnju unutar organske i medicinske kemije upravo zbog svoje velike biološke aktivnosti, poput antitumorske, hormonalnih antagonista, antimikrobiološke, anti-HIV, antihelminetičke, antivirusne, antialergijske, anksiolitičke, koagulantske, antikoagulantske, antihipertenzivne kao i antidijabetske aktivnosti [11]. Optimiranje supstituenata na jezgri benzimidazola rezultiralo je razvojem antihelmintika (albendazol, mebendazol, tiabendazol), inhibitora protonske pumpe (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol), antihistaminika (astemizol), antivirusnih (enviradin), antihipertenzivnih (kandesartan cileksitil i telmisartan) lijekova kao i mnogih drugih spojeva u raznim terapijskim područjima. Vodikov atom vezan za prvi dušikov atom benzimidazolne jezgre lako se tautomerizira, Slika 2.2. te je odgovoran za izomerizaciju u izvedenim spojevima [14].



**Slika 2.2.** *Tautomerne strukture benzimidazola (preuzeto i prilagođeno) [14]*

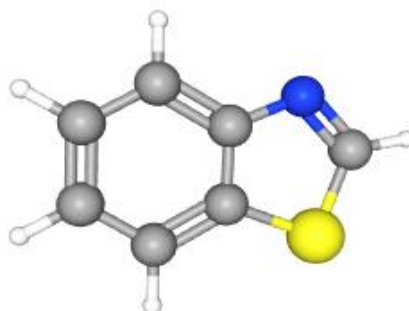
Prsten benzimidazola posjeduje razna biološki aktivna svojstva koja su se tijekom godina iskoristila za razne primjene u lijekovima. Ona su potaknula mnogobrojna istraživanja ovakvih spojeva u raznim područjima farmacije i medicine. Rak je naziv složene skupine bolesti u kojima se stanice brzo dijele, nekontrolirano rastu te ponekad dolazi do stvaranja metastaza. Svaki od njih posjeduje svojstvene karakteristike i za liječenje je potreban poseban, različit pristup. Za otkrivanje pojedine vrste potrebne su različite metode poput elektrokemijskih, biosenzora, imunocitne kemije i mikrofluidnih uređaja [15]. Različite vrste raka koje utječu na razne organe su karcinom, sarkom, limfom ili leukemija [16]. Postoji nekoliko skupina spojeva koje se koriste u terapijske svrhe njihova liječenja, a među njima su i benzimidazoli koji se upravo u tu svrhu danas sve više istražuju [15].



**Slika 2.3.** Derivati benzimidazola i njihova biološka aktivnost (preuzeto i prilagođeno) [15]

### 2.2.3. Benzotiazol

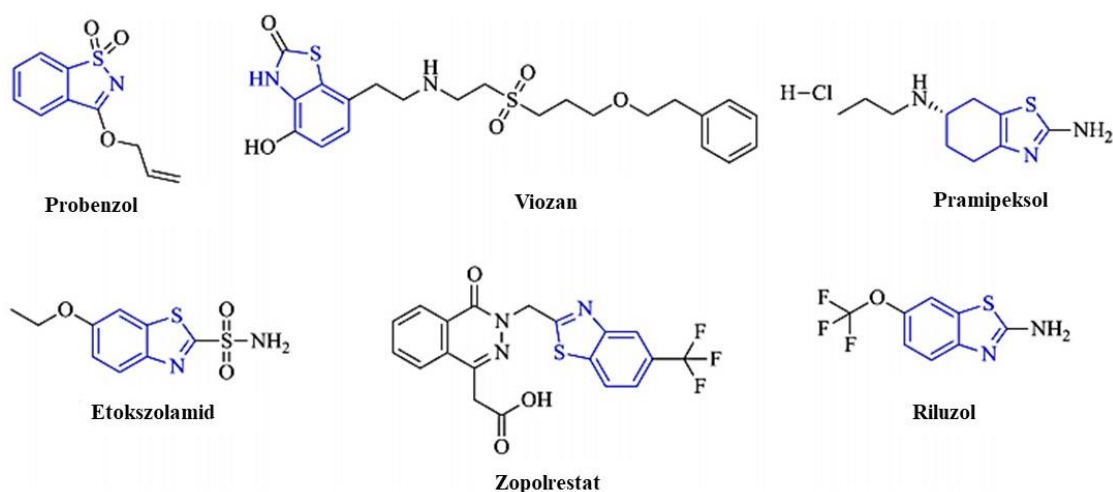
Benzotiazol je biciklički, aromatski spoj u kojem je benzenski prsten spojen na položaju 4 i 5 s tiazolnim prstenom. Tiazolni peteročlani prsten sadrži atome sumpora i dušika na položajima 1 i 3. Benzotiazol je bezbojna, blago viskozna kapljevin molekulske formule  $C_7H_5NS$  koja posjeduje slabo bazični karakter. Ima temperaturu tališta od  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  te vrelišta  $227\text{--}228\text{ }^{\circ}\text{C}$  [17]. Neutralnu molekulu benzotiazola čini ukupno negativan heterociklički i ukupno pozitivan naboj benzenskog dijela. Molekula posjeduje delokalizirane elektrone te najveći negativan naboj na atomima sumpora i dušika, kao i eksperimentalno dokazan pozitivan naboj na C-2 atomu koji mu omogućava da reagira kao elektrofil. U tiazolnom dijelu molekule, vrijednosti Wibergovih veza pokazuju da veza C-2-N ima svojstvo dvostruke, dok su ostale veze između N, S i ugljikovih atoma jednostruke, kako je to i prikazano na Slici 2.4. [18].



**Slika 2.4.** Molekula benzotiazola [19]

#### 2.2.4. Biološka aktivnost derivata benzotiazola

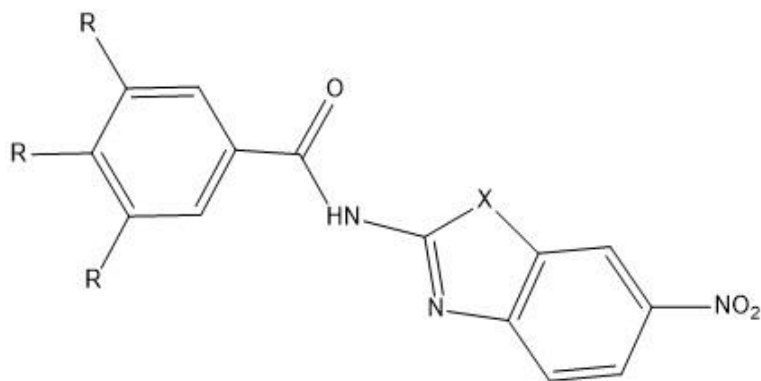
Benzotiazol je organski spoj koji sadrži heterocikličku tiazolnu jezgru koja mu pruža široki spektar bioloških aktivnosti, a kojoj ujedno pridonosi sama priroda kao i položaj supstituenata [20]. Derivati benzotiazola posjeduju širok spektar biološke aktivnosti, kao što su antikancerogena, antioksidativna, protuupalna, antitumorska, antivirusna, antibakterijska, antiproliferativna, antidijabetička, antikonvulzivna, analgetska, antituberkulozna, antimalarijska, antihistaminska i antifungalna [21]. Dosadašnja istraživanja pokazuju kako su zamjene na drugom, četvrtom, petom i šestom položaju vrlo ključne za postizanje raznolikosti u aktivnostima ovih spojeva. Merkapto i hidrazinska skupina na položaju 2 dovele su do naglašenih antibakterijskih i protuupalnih svojstava. Nadalje, uvođenjem OCH<sub>3</sub> skupine na položaju 4 snažno se poboljšavaju antibakterijska svojstva, dok se zamjenom OCH<sub>3</sub> skupine s Cl antibakterijska svojstva mijenjaju na antifungalna [20]. Na području medicinske kemije glavni izazov postavljen pred istraživače je identifikacija novih struktura koje mogu biti korisne u pripravi novih selektivnih i manje toksičnih sredstava [22]. Stoga su upravo biološka svojstva benzotiazola dovela do toga da se oni danas koriste kao jezgra u raznim, već pripremljenim lijekovima te kao podloga u raznim fazama novih kliničkih ispitivanja. Neki već pripremljeni lijekovi na bazi benzotiazola poput viozana (lijek za plućne bolesti), probenzola (herbicid), riluzola (antidepresiv i anksiolitik), zopolrestata (dijabetički lijek) prikazani su na Slici 2.5. [17].



**Slika 2.5.** Lijekovi na tržištu koji sadrže benzotiazolni dio (preuzeto i prilagođeno) [17]

### 2.2.5. Nitro i amino supstituirani benzimidazol/benzotiazol-2-karboksamid [23]

Benzimidazoli i benzotiazoli su poznate kao jedne od najvažnijih strukturnih jedinica u medicinskoj kemiji. Oni imaju važnu ulogu u raznim biološkim sustavima, a među mnogim farmakološkim svojstvima koja posjeduju najvažnija su konstituiranje raznih bioaktivnih komponenti s antitumorskim, antimikrobiološkim, antivirusnim te protuupalnim djelovanjem. Na navedena svojstva utjecat će priroda i položaj određenih supstituenata vezanih na prstenove koji čine osnovu strukture. Razna istraživanja pokazuju antioksidativni potencijal i antiproliferativna svojstva derivata benzimidazola i benzotiazola. Također, izvor navodi prethodna ispitivanja u kojima je prikazan utjecaj broja metoksi skupina i vrste supstituenta na učinak antioksidativnih i antiproliferativnih svojstva, te je prikazano kako su sustavi s najvišim antioksidativnim djelovanjem manje citotoksični i ne inaktiviraju proliferaciju stanica tumora. Novija istraživanja su usmjerena na biološku aktivnost različitih benzimidazol/benzotiazol-2-karboksamida supstituiranih s varijabilnim brojem metoksi i/ili hidroksilnih skupina te jezgrama koje nose nitro, amino ili amino protonirane skupine (Slika 2.6.). Antiproliferativna svojstva su ispitana *in vitro* na stanicama karcinoma i na netumorskim stanicama, a antioksidativna svojstva na radikalima i smanjenju njihove aktivnosti.



**Slika 2.6.** Osnovna struktura derivata benzimidazol ( $X=N$ )/benzotiazol( $X=S$ )-2-karboksamida (preuzeto i prilagođeno) [23]

### 2.3. Ispitivanja stabilnosti

Stabilnost je kritično svojstvo kvalitete farmaceutskih proizvoda. Ispitivanja stabilnosti su bitna sastavnica u proizvodnji farmaceutika. Svrha ovakvih ispitivanja je prikupiti potrebne podatke o kvaliteti aktivnih tvari kao i gotovih farmaceutskih proizvoda ovisno o vremenu kao i uvjetima u okolišu [24]. Ispitivanja stabilnosti lijekova provode se u svrhu praćenja promjena tijekom proizvodnje i čuvanja koje mogu utjecati na djelotvornost, sigurnost i kvalitetu gotovog proizvoda. Stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda ovisna je o mnogim čimbenicima, a oni uključuju stabilnost samih djelatnih tvari, potencijalne interakcije između djelatnih i pomoćnih tvari, dozirne oblike, postupak proizvodnje, vrijeme od proizvodnje do upotrebe, kao i uvjete u okolini tijekom distribucije, skladištenja te rukovanja proizvodom [25]. Ispitivanja stabilnosti su rutinska kontrola pri proizvodnji farmaceutika koja se provode na aktivnim tvarima kao i gotovim proizvodima. Provode se u raznim fazama razvoja lijekova. U početnim stadijima proizvodnje provode se tzv. ubrzana testiranja (pri visokim temperaturama i relativnoj vlažnosti) kako bi se predvidjeli razgradni produkti i put razgradnje proizvoda pri dugotrajnom skladištenju. Testiranja pri manje agresivnim uvjetima (preporučena za dulja skladištenja proizvoda) provode se u svrhu predviđanja razgradnih produkata koja će nastati pri skladištenju te u vremenu do isteka roka trajanja. Upravo se ova ispitivanja često provode kako bi se provjerila valjanost lijeka do isteka roka trajanja. Rezultat ovih ispitivanja je pružanje određene garancije od strane farmaceutskih tvrtki o primjenjivosti lijeka za namijenjenu svrhu tijekom cijelog perioda od skladištenja, distribucije te dolaska do pacijenata. Vrijeme upotrebe do posljednjeg farmaceutika u jednom dozirnom paketu nije navedeno pod ovu definiciju jer se ne može predvidjeti kako će se provoditi sama primjena kao i skladištenje kod potrošača. Stabilnost farmaceutskog proizvoda može se definirati kao sposobnost određene formulacije u zatvorenom spremniku da zadrži svoja fizikalna, kemijska, mikrobiološka, terapijska, toksikološka, zaštitna svojstva kao i informacijske specifikacije. Stabilnost se također definira kao opseg u kojem proizvod zadržava, u određenim granicama i tijekom razdoblja skladištenja i uporabe (tj. do isteka roka trajanja), ista svojstva i karakteristike koje je posjedovao u vrijeme izrade [26].



### 2.3.1. ICH smjernice

Skup smjernica koje su prihvaćene od strane Europskih, Američkih te Japanskih regulatornih tijela donio je Međunarodni odbor za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu<sup>8</sup> [27]. Kemijska stabilnost farmaceutskih molekula je ozbiljna stvar koja odražava posebnu zabrinutost jer utječe prvenstveno na sigurnost i djelotvornost lijeka. ICH<sup>9</sup> smjernice navode zahtjeve za ispitivanje stabilnosti, kako bi se opisala promjena kvalitete aktivne tvari i konačnih proizvoda, lijekova s vremenom pod utjecajem različitih čimbenika u okolišu. Poznavanje stabilnosti molekula pomaže u odabiru odgovarajuće formulacije, pakiranja, kao i osiguranje ispravnih uvjeta skladištenja i roka trajanja. ICH smjernice navode da je testiranje otpornosti na stres namijenjeno za identifikaciju mogućih produkata razgradnje, što dalje pomaže u određivanju unutarnje stabilnosti molekule i uspostavljanju putova razgradnje te za vrednovanje korištenih postupaka indikacije stabilnosti [28]. Dostignuća usklađivanja u području kvalitete obuhvaćaju ključne točke kao što su provođenje ispitivanja stabilnosti, definiranje relevantnih pragova za ispitivanje onečišćenja i fleksibilniji pristup farmaceutskoj kvaliteti utemeljen na upravljanju rizikom dobre proizvodne prakse, GMP<sup>10</sup>. Smjernice obuhvaćaju Q1-Q14 glavnih točaka.

ICH smjernice za studije stabilnosti:

- ICH Q1A- Ispitivanje stabilnosti nove ljekovite tvari i novog ljekovitog proizvoda
- ICH Q1B- Ispitivanje fotostabilnosti nove ljekovite tvari i novog ljekovitog proizvoda
- ICH Q1C- Ispitivanje stabilnosti novih dozirnih oblika
- ICH Q1D- „Bracketing and Matrixing Designs“ za ispitivanje stabilnosti nove ljekovite tvari i novog ljekovitog proizvoda
- ICH Q1E- Procjena podataka o stabilnosti
- ICH Q1F- Paket podataka o stabilnosti za prijavu registracije u klimatskim zonama III i IV

Prisilna razgradnja lijekova vrši se u sklopu ispitivanja stabilnosti [29].

---

<sup>8</sup> eng. *International Committee for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

<sup>9</sup> eng. *International Conference on Harmonization, ICH*

<sup>10</sup> eng. *Good Manufacturing Practice, GMP*

### 2.3.2. *Prisilna razgradnja*

Prije unošenja novih ljekovitih tvari u registar obavezno je provoditi ispitivanja njihove stabilnosti. Ispitivanja stabilnosti uključuju dugotrajna ispitivanja<sup>11</sup> (12 mjeseci) i ubrzana ispitivanja<sup>12</sup> stabilnosti (6 mjeseci). Srednja ispitivanja<sup>13</sup> (6 mjeseci) mogu se izvoditi u uvjetima blažim od onih korištenih za ubrzana ispitivanja. Ovakve vrste ispitivanja zahtijevaju duže vrijeme za identifikaciju razgradnih produkata te njihovu kvantifikaciju. U odnosu na ispitivanja o stabilnosti, ispitivanja prisilne razgradnje omogućava stvaranje razgradnih produkata u mnogo kraćem vremenu, uglavnom nekoliko tjedana. Uzorci nastali prisilnom razgradnjom mogu se upotrijebiti za razvijanje indikacije stabilnosti metoda koje se mogu primijeniti za analizu uzoraka nastalih iz ubrzanih i dugotrajnih ispitivanja stabilnosti. Prisilna razgradnja je razgradnja nove ljekovite tvari i pripremljenog lijeka u teškim uvjetima u kojima su pojave ubrzane. Zahtjeva se da specifičnost metoda ukazuje na stabilnost ljekovite tvari, da također pruži uvid u načine same razgradnje i da se okarakteriziraju nastali razgradni produkti. Ispitivanja prisilne razgradnje pokazuju kemijsko ponašanje molekule što zauzvrat pomaže u razvoju formulacije i pakiranja. Stres ispitivanja trebaju se provoditi u otopinama različitih pH-vrijednosti, u prisutnosti kisika i svjetla te pri povišenim temperaturama i različitim vrijednostima vlage, da bi se utvrdila stabilnost lijeka [28]. Priroda testiranja otpornosti na stres ovisit će o pojedinoj ljekovitoj tvari i vrsti lijeka u kojem je uključena. Treba uključivati učinak temperature (iznad one za ubrzano ispitivanje), vlage (npr. 75 % relativne vlažnosti ili veća), oksidacije i fotolize lijeka. Testiranje također obuhvaća procjenu osjetljivosti ljekovite tvari na hidrolizu u širokom rasponu pH-vrijednosti u otopini ili suspenziji. Spomenuto testiranje fotostabilnosti je također sastavni dio testiranja otpornosti na stres, a standardni uvjeti za njihovu provedbu opisani su pod smjernicom ICH Q1B. Ispitivanje produkata razgradnje pod stresnim uvjetima korisno je za utvrđivanje puteva razgradnje te razvijanja i potvrđivanja odgovarajućih analitičkih postupaka. ICH smjernice ne navode koliko je razgradnje potrebno u ispitivanjima prisilne razgradnje. Ako se primijeni premalo stresa, možda se neće primijetiti neki od razgradnih puteva, što smanjuje mogućnost otkrivanja i nadgledanja produkata razgradnje tijekom ispitivanja stabilnosti. Ako se primijeni previše stresa, tada se mogu primijetiti

---

<sup>11</sup> eng. *Long-term studies*

<sup>12</sup> eng. *Accelerated studies*

<sup>13</sup> eng. *Intermediate studies*

nerealni produkti razgradnje i rezultirajuća analitička metoda može biti neprikladna za otkrivanje stvarnih produkata razgradnje nastalih tijekom ispitivanja stabilnosti [30].

Većina farmaceutskih proizvoda, lijekova su u krutom stanju pri sobnoj temperaturi.

Razlikujemo dva načina razgradnje krutih farmaceutika [31]:

1. Fizikalna razgradnja: niti se stvara niti se kida kovalentna veza u spoju. Obuhvaća polimorfnu transformaciju nestabilnih kristala ili amorfnih tvari u stabilnije kristalne strukture. Ponekad obuhvaća desolvataciju kada je otapalo ugrađeno u kemijsku rešetku, npr. voda. Novonastale stabilnije kristalne strukture imaju niže temperature tališta što utječe na bioraspoloživost tvari.
2. Kemijska razgradnja: uključuje stvaranje i/ili kidanje kovalentnih veza u spoju (npr. hidroliza, oksidacija, fotoliza i termalna razgradnja). Najčešće se odvija u otopinama i kinetika reakcija je pseudo nultog reda.

Prema smjernicama, ispitivanja prisilne razgradnje izvode se zbog sljedećih razloga:

- Razvoj i validacija metoda za ispitivanje stabilnosti
- Određivanje putova razgradnje farmaceutskih tvari i produkata
- Prepoznavanje razgradnih produkata vezanih uz aktivne tvari naspram onih vezanih uz neaktivne tvari npr. pomoćne tvari
- Određivanje strukture razgradnih produkata
- Određivanje unutarnje stabilnosti farmaceutskih molekula

Ispitivanja prisilne razgradnje imaju nekoliko karakteristika:

- Provode se u otopinama i/ili krutinama
- Posjeduju mnogo teže uvjete, nego ona u ubrzanim ispitivanjima (npr. temperature  $> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $\geq 75\%$  relativne vlažnosti)
- Obično se izvode na jednoj grupi materijala
- Uključuju uvjete koji ispituju mehanizme hidrolize, oksidacije, termalne i fotolitičke razgradnje farmaceutskih tvari i produkata
- Nisu dio standardnog protokola ispitivanja stabilnosti

Iako prisilna razgradnja nije obavezan dio protokola za ispitivanje stabilnosti, ona se ipak provodi kao preliminarno ispitivanje za dobivanje informacija potrebnih za razvoj metoda stabilnosti tvari [32]. U primjeni FDA i ICH smjernice preporučuju uključivanje u rezultate ispitivanja kromatograme uzorka nakon izlaganja stresu, prikaz prirode analitičkih postupaka i put razgradnje farmaceutski aktivne tvari u čvrstom stanju, kapljevini i gotovog

farmaceutskog proizvoda. Kemijske strukture značajnih produkata razgradnje i pridruženi postupci njihove izolacije i/ili karakterizacije također se očekuje da budu navedeni. Eksperimentalni protokol prisilne razgradnje će ovisiti o aktivnoj tvari i uključenoj formulaciji jer je kemija svakog spoja drugačija [33]. Općenito, poželjno je između 5-20 %, a cilj je postići oko 10 % razgradnje API-ja tijekom prisilne razgradnje ili tijekom izlaganja energiji u malom iznosu. Na ovaj način se mogu proučiti najgori slučajevi razgradnje [28, 33].

### ***2.3.3. Nestabilnost farmaceutskih tvari i proizvoda***

Pred farmaceute je postavljen zadatak razvitka novih analitičkih metoda koje pokazuju stabilnost novih ljekovitih tvari i gotovih farmaceutskih proizvoda. Potrebna je velika selektivnost metode za sve razgradne produkte, bez dostupnih identifikacijskih informacija o istima, koji se pojavljuju pri samoj formulaciji. Prije upotrebe ovih metoda u realnim formulacijama, potrebno ih je dugoročno ispitivati [28]. Da se premosti ova poteškoća, postavljaju se modeli prisilne razgradnje da provedu u danu istu razgradnju tvari kao što se to u stvarnim formulacijama postiže tek nakon par mjeseci do godine dana. Ako se pravilno koriste, ovi modeli mogu izvući snažne uvide od ograničenih količina ljekovitih tvari do razvoja novih, učinkovitijih metoda indikacije stabilnosti. Regulatorne smjernice uvelike potiču korištenje stres-metoda, iako uz vrlo malo detalja samog provođenja. Puteve hidrolize u kiselom i lužnatom pojedinih tvari nije teško predvidjeti, dok je s druge strane za oksidacijske putove to mnogo teže postići. Stoga je određivanje putova oksidacijske razgradnje farmaceutskih tvari u ovako ranoj fazi razvoja proizvoda vrlo bitno [34]. Mnogi čimbenici utječu na stabilnost ljekovitih proizvoda, uključujući stabilnost aktivnih sastojaka, potencijalnu interakciju između aktivnih i takozvanih neaktivnih sastojaka, postupak proizvodnje, dozirni oblik, sustav zatvaranja spremnika, okolišni uvjeti koji su se javljali tijekom otpreme, skladištenja i rukovanja, duljina vremena između proizvodnje i upotrebe, itd. Uvjeti u okolišu poput topline, svjetlosti, vlage i kemijskih čimbenika poput oksidacije, redukcija, hidrolize ili racemizacije mogu svi biti od vitalnog značaja u farmaceutskoj stabilnosti. Reakcije razgradnje u farmaceutskim formulacijama mogu ovisiti o uvjetima kao što su: koncentracija reaktanata, pH-vrijednost, zračenje, temperatura, katalizator, itd. Od svih čimbenika okoliša temperatura je najrizičniji faktor koji može utjecati na razgradnju jer se ne može kontrolirati izborom načina pakiranja proizvoda. Stabilnost proizvoda ovisi i o početnim sirovinama, uvjetima skladištenja i transporta. Posljedice raspada lijeka su gubitak aktivnosti, povećanje koncentracije aktivne tvari, promjene u biološkoj aktivnosti, gubitak

jednolikosti u sadržaju, pojava mikroorganizama, pojava toksičnih produkata i drugih pojava koje ograničavaju primjenu [26].

### 2.3.4. *Uvjeti stres testova*

Iz prethodnog je vidljiva važnost prisilne razgradnje ne samo u razvoju metoda indikacije stabilnosti, nego pružaju i korisne informacije o putevima razgradnje i strukturama razgradnih produkata koji mogu nastati tijekom proizvodnje i/ili skladištenja. U razvitku samog postupka prisilne razgradnje moraju se primijeniti uvjeti agresivniji nego oni kod ubrzanih ispitivanja (25 °C/60 % relativne vlažnosti ili 40 °C/75 % relativne vlažnosti). Najmanje što je potrebno istražiti su: (1) hidroliza u kiselini i lužini, (2) hidroliza pri različitim pH-vrijednostima, (3) termalna razgradnja, (4) fotoliza i (5) oksidacija. Za farmaceutsku tvar i gotov proizvod Tablica 2.1. može biti koristan vodič prilikom odabira vrste ispitivanja [33]. Regulatornim uputama nije navedena točna koncentracija aktivne tvari koju je potrebno upotrijebiti u ovakvim ispitivanjima, međutim preporučuje se da ispitivanja započnu s koncentracijom od 1 mg/mL jer se tako mogu detektirati i manji razgradni produkti. Također se ispitivanja trebaju provesti na koncentracijama u kojima će se određena aktivna tvar dozirati u konačnoj formulaciji [28].

**Tablica 2.1.** *Stres-testovi za farmaceutske tvari i proizvode [33]*

<b>PRISILNA RAZGRADNJA</b>		
<b>Farmaceutska tvar</b>	Krutina	Fotoliza Termalna razgradnja Termalna razgradnja/Vlaga
	Kapljevina/Suspencija	Kisela hidroliza Lužnata hidroliza Oksidacija
<b>Farmaceutski proizvod</b>	Krutina	Fotoliza Oksidacija Termalna razgradnja Termalna razgradnja/Vlaga
	Polukrutina	Fotoliza Oksidacija Termalna razgradnja Termalna razgradnja/Vlaga
	Kapljevina/Suspencija	Fotoliza Oksidacija Termalna razgradnja

Vrste i uvjeti stres-ispitivanja za pojedine sustave dane su u nastavku:

### **2.3.3.1. Hidroliza [28, 35]**

Hidroliza je jedna od najčešćih reakcija za razgradnju kemikalija u širokom rasponu pH-vrijednosti. Hidroliza je kemijski proces koji uključuje raspadanje kemijskog spoja reakcijom s vodom. Ispitivanje otpornosti na kiselinu ili lužinu uključuje prisilnu razgradnju ljekovite tvari izlaganjem kiselim ili lužnatim uvjetima, koja stvara primarne produkte razgradnje u željenom rasponu. Odabir vrste i koncentracije kiseline ili lužine ovisi o stabilnosti ljekovite tvari. Klorovodična ili sumporna kiselina (0,1-1,0 M) za kiselinsku hidrolizu i natrijev hidroksid ili kalijev hidroksid (0,1-1,0 M) za lužnatu hidrolizu predlažu se kao prikladni reagensi. Ako su spojevi za testiranje otpornosti na stres slabo topljivi u vodi, mogu se koristiti za njihovo otapanje HCl ili NaOH. Rezultati ovakva ispitivanja će pokazati imaju li molekule lijeka nestabilnost u vodenim sustavima ovisno o pH-vrijednosti. Može se uspostaviti približan profil ovisnosti razgradnje o pH-vrijednosti, upravo iz razloga jer je izlaganje lijekova uvjetima u kojima se raspon pH-vrijednosti mijenja vrlo čest te može doći npr. do ne otapanja lijeka pri nekim određenim vrijednostima. Također, neki uzorci zahtijevaju kootapalo da bi se postiglo zadovoljavajuće, potpuno otapanje. Ako je potrebno dobiti precizne informacije o kinetici i rasponu pH-vrijednosti pri kojima se postiže maksimalna stabilnost, potrebno je provoditi pažljivo ispitivanja u kojima je precizno kontrolirana koncentracija otapala, pufera i ionska snaga. Ovakva vrsta stres-testa može biti relevantna kod prikupljanja podataka za ADME<sup>14</sup> koja opisuje utjecaj farmaceutika na ljudski organizam. Podaci prikupljeni testovima provođenima pri uvjetima pH-vrijednosti između 1-2 može pomoći oko određivanja o potrebi za vanjskom ovojnicom na lijeku koji će se primjenjivati oralnim putem. pH-vrijednost želučane kiseline može se simulirati korištenjem klorovodične kiseline, HCl pH-vrijednosti 1.

---

<sup>14</sup> eng. *Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion*, ADME

### 2.3.3.2. *Oksidacija*

Postoje tri glavna puta oksidacije koja su važna kod razgradnje lijekova:

(i) radikalna oksidacija, poznata kao autooksidacija

(ii) oksidacija posredovana peroksidom

(iii) oksidacija posredovana transferom elektrona

Stres-ispitivanja se provode tako da oponašaju svaki od ovih potencijalnih putova oksidacije. Neki od reagensa mogu biti hidroksilni radikali, kisik ili ozon. Vodikov peroksid,  $H_2O_2$  se široko koristi za oksidaciju ljekovitih tvari u ispitivanjima prisilne razgradnje, ali mogu se koristiti i drugi oksidativni agensi poput metalnih iona, kisika ili radikalnih inicijatora. Odabir oksidirajućeg agensa, njegova koncentracija i uvjeti ovise o vrsti ljekovite tvari. Oksidativna razgradnja ljekovite tvari uključuje mehanizam prijenosa elektrona da bi se stvorili reaktivni anioni i kationi [28, 35]. Ako se koristi vodikov peroksid nužno je da se skladišti pri uvjetima sobne temperature. Zagrijavanje otopine  $H_2O_2$  povećava homolitičko cijepanje veze HO-OH da bi se dobio alkoksi radikal ( $2HO\cdot$ ). Ovaj alkoksi radikal je veoma reaktivan te može dominirati nad promatranom prisilnom razgradnjom. Da bi se zaobišli problemi koji mogu nastati s vodikovim peroksidom, neki znanstvenici uvijek rade paralelna ili alternativna oksidativna ispitivanja koristeći azobisisobutironitril (AIBN), koji je manje reaktivan oksidans te se pokazalo da proizvodi reprezentativnije produkte razgradnje [33].

### 2.3.3.3. *Fotoliza* [28, 35]

Fotolitičkim ispitivanjima mora se procijeniti stabilnost lijekova na izloženost svjetlu te da posljedično ne nastaju neprihvatljive promjene. Stabilnost se ispituje pod utjecajem UV zračenja ili fluorescentnim uvjetima. Uzorci krutih/kapljevitih, ljekovitih tvari trebaju se izlagati na minimalno 1,2 milijuna lux h i 200 Wh/m<sup>2</sup> svjetla. Najčešća prihvaćena valna duljina svjetlosti je u rasponu od 300–800 nm. Svjetlost valne duljine < 300 nm nije potrebno ispitivati jer lijek neće biti u doticaju s takvom vrstom svjetlosti tijekom uporabnog ciklusa. Maksimalno preporučeno osvjetljenje je 6 milijuna lux h. Fotolitički stresni uvjeti mogu potaknuti fotooksidaciju mehanizmom slobodnih radikala. Također, da bi došlo do fotolitičke razgradnje, zračenje mora biti apsorbirano, bilo da ga apsorbira ljekovita tvar ili formulacija. Razina razgradnje pod djelovanjem svjetla, stoga izravno ovisi o količini upadnog zračenja i o količini energije zračenja koju apsorbira sama aktivna tvar ili formulacija. Stoga, lijek se može podvrgnuti fotolitičkoj razgradnji, iako sam ne apsorbira zračenje unutar UV i VIS

područja, ako postoji neki drugi agens, namjerno dodan (pomoćna tvar) ili slučajno prisutan (onečišćenje) u formulaciji koji će ju apsorbirati. Važno je naglasiti da se ova vrsta stres-testa ne provodi uvijek u ispitivanjima stabilnosti već njena primjenjivost ovisi prvenstveno o fizikalnim svojstvima tvari. Na primjer, ovisi ako je riječ o krutini (npr. kristalična ili amorfna tvar, polimorfan oblik) ili otopini (npr. koncentracija, vrsta otapala, stupanj protoniranja), te o drugim fizikalnim svojstvima poput veličine čestica i uvjetima na površini.

#### **2.3.3.4. Termalna razgradnja [26, 35]**

Termalnu razgradnju (suhu ili vlažnu) treba provoditi u mnogo težim uvjetima, nego je to kod ubrzanih ispitivanja stabilnosti navedenih pod smjernicom ICH Q1A. Uzorci aktivnih tvari kao i gotovih ljekovitih proizvoda u krutom stanju trebaju se izlagati suhoj i vlažnoj toplini, dok se kapljevitih produkti trebaju izlagati samo suhoj toplini. ICH smjernice sugeriraju proučavanje učinka temperature u koracima od 10 °C. Tako se može provjeriti mijenjaju li se ili ne mehanizmi razgradnje ovisno o temperaturi te se može utjecaj temperature na termalnu razgradnju tvari opisati Arrheniusovom jednačinom:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

gdje su:

- $k$ - konstanta brzine kemijske reakcije
- $A$ - frekvencijski faktor
- $E_a$ - energija aktivacije (kJ/mol)
- $R$ - opća plinska konstanta (8,314 JK/mol)
- $T$ - termodinamička temperatura (K)

#### **2.3.3.5. Vlaga [36]**

Vlaga je jedan od utjecajnih faktora u utvrđivanju potencijalnih razgradnih produkata u gotovim farmaceutskim proizvodima i aktivnim tvarima. Kako bi se utvrdila prisilna razgradnja uzoraka preporučuje se izlaganje uzorka 90 % vlažnosti u trajanju od tjedan dana.



## 2.4. Onečišćenja u novim aktivnim tvarima i lijekovima

Kontrola farmaceutskih onečišćenja trenutno je jedno od najvažnijih tema farmaceutske industrija. Međunarodna konferencija o usklađivanju (ICH) formulirala je smjernice u vezi s kontrolom onečišćenja. Onečišćenja u lijekovima su neželjene kemikalije koje zaostaju uz aktivni farmaceutski sastojak, API ili se razvijaju tijekom formulacije ili starenja. Prisutnost ovih neželjenih kemikalija čak i u malim količinama mogu utjecati na učinkovitost i sigurnost farmaceutskih proizvoda [37]. Skup tih onečišćenja može biti potencijal za genotoksičnost i stoga predstavljaju dodatnu brigu o sigurnosti za pacijente. Farmaceutska industrija mora regulirati te ograničiti genotoksičnost onečišćenja. Stoga se tijekom proizvodnje farmaceutika ulažu znatni naponi za razvoj kontrole svih onečišćenja i održavanjem istih u sigurnim koncentracijama. Razina rizika mora biti visoka u svim fazama razvoja do distribucije samog proizvoda [38]. Dakle, onečišćenja u novim aktivnim tvarima mogu se promatrati iz dvije važne perspektive:

1) **Kemijski aspekt:** uključuje klasifikaciju i identifikaciju onečišćenja, stvaranje izvještaja, popis onečišćenja u specifikacijama te kratku raspravu o analitičkim postupcima.

2) **Sigurnosni aspekt:** uključuje posebne smjernice za kvantifikaciju onečišćenja prisutnih u lijekovitim tvarima, uglavnom na nižim razinama.

Stoga je ključno poznavati strukturu nastalih onečišćenja u lijeku kako bi se promijenili uvjeti reakcije i smanjila njihova količina na prihvatljivu razinu. Izolacija, identifikacija i kvantifikacija onečišćenja pomažu da bi se dobila čista tvar s manje toksičnosti i sigurnija u primjeni [39]. Izolacija onečišćenja potrebna je za precizan nadzor, ali samo ako instrumentalna metoda nije dostupna, jer izravno karakterizira onečišćenja. Koja metoda će se koristiti za izolaciju i karakterizaciju onečišćenja ovisi o prirodi onečišćenja, odnosno podrazumijeva strukturu, fizikalno-kemijska svojstva i dostupnost. Za izoliranje onečišćenja koriste se kromatografske i nekromatografske metode [6].

### 2.4.1. Klasifikacija onečišćenja [37]

Onečišćenja zaostala uz aktivnu tvar, API mogu se podijeliti u sljedeće kategorije:

1. Organska onečišćenja (vezana uz proces ili farmaceutsku tvar)
2. Anorganska onečišćenja
3. Ostatna otapala

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnje i/ili pri skladištenju. Ona mogu biti identificirana i neidentificirana te hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju:

- a) *Polazne sirovine i međuprodukti*: ovo su najčešća onečišćenja u svakom API-u osim ako se ne vodi visoka kontrola prilikom svih koraka u sintezi. Iako su konačni proizvodi uvijek na samom kraju isprani otapalima, uvijek postoji određena vjerojatnost zaostatka neizreagiranih polaznih sirovina.
- b) *Nusprodukti*: u sintezama organske kemije gotovo nikada nije ostvarivo dobiti samostalni, čisti produkt. Stoga uvijek postoji mogućnost nastanka nusprodukata uz onaj željeni.
- c) *Razgradni produkti*: onečišćenja nastala razgradnjom konačnih proizvoda tijekom formulacije, skladištenja, starenja te doziranja.
- d) *Ligandi, reagensi i katalizatori*: ove vrste onečišćenja se rjeđe pronalaze u API-u.

Anorganska onečišćenja mogu nastati proizvodnim postupkom. Obično su poznata i identificirana, a to su:

- a) *Ligandi, reagensi i katalizatori*: rijetko se pronalaze u API-u, iako u nekim proizvodnjama mogu stvarati određene probleme ako se proces neprikladno kontrolira.
- b) *Teški metali ili drugi ostatni metali*: izvor ove vrste onečišćenja najčešće je procesna voda, reaktori te procesi gdje se provodi kiselinska hidroliza. Ovakva vrsta onečišćenja može se vrlo lako zaobići korištenjem demineralizirane vode i reaktora sa staklenim slojevima.
- c) *Anorganske soli*
- d) *Drugi materijali*: posljedica su filtriranja, korištenja centrifuge i aktivnog ugljena.

Ostatna otapala su anorganske ili organske kapljevine koje se koriste kao sredstva za pripremu otopina ili suspenzija u sintezi nove ljekovite tvari. Njihova toksičnost je poznata te se lako provodi prikladna kontrola prilikom njihove upotrebe (ICH Q3C). S obzirom na utjecaj na ljudsko zdravlje dijele se na:

*I. skupina:* benzen (ograničenje na 2 mg/L) i tetraklorugljik (ograničenje na 4 mg/L); treba ih izbjegavati

*II. skupina:* metilen klorid (600 mg/L), metanol (3000 mg/L), piridin (200 mg/L), toluen (890 mg/L), *N,N*-dimetilformamid (880 mg/L) te acetonitril (410 mg/L); najčešća su u upotrebi

*III. skupina:* acetatna kiselina, aceton, butanol, izopropil alkohol, etil acetat i etanol (ograničenje na 50 mg/dan ili manje)

Onečišćenja nastala u procesu formulacije mogu biti posljedica korištenih metoda, uvjeta u okolišu te dozirnih oblika:

- a) *Metoda:* neki uvjeti poput temperature, pH-vrijednosti, sterilizacije u autoklavu.
- b) *Okoliš:* mnoge aktivne tvari su osjetljive na promjenu temperature i svjetla. Većina ih je sklona djelomičnoj ili potpunoj razgradnji prilikom višesatnog izlaganja UV zračenju. Vlaga je također jedan od uvjeta u okolišu koji može utjecati na onečišćenje higroskopskih tvari.
- c) *Doziranje:* prije stavljanja proizvoda na tržište nužno je provesti preformulacijska ispitivanja koja uključuju i ispitivanja stabilnosti. Ponekad je upravo doziranje razlog povlačenja lijeka s tržišta. Jedno od ključnih faktora su: udio vode, pH otopine/suspenzije, kompatibilnost kationa i aniona te međudjelovanje svih sastojaka.

Onečišćenja nastala procesom starenja:

- a) *Višestruke interakcije među komponentama:* onečišćenja ove vrste pojavljuju se kod vitamina koji su jako osjetljivi na starenje, pogotovo u kapljevitim dozirnim oblicima.
- b) *Funkcionalne grupe:* najčešće posljedica hidrolize koja se pojavljuje kod farmaceutika s esterskim skupinama, a posebno u kapljevitim dozirnim oblicima. Također se razgrađuju pod utjecajem oksidacije, fotolize te karboksilacijom (uklanjanje ugljikovog dioksida pod utjecajem topline).

## 2.4.2. Propisani pragovi (granice) izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije

Prvi dio ICH smjernica obuhvaća propisane pragove (granice)<sup>15</sup> količine onečišćenja za njihovu identifikaciju te izradu izvještaja, dok se u drugom dijelu navode smjernice za onečišćenja koja se nalaze u količinama većim od propisanih [34]. Prema ICH smjernicama o onečišćenjima u novim farmaceutskim proizvodima i novim farmaceutskim tvarima, identifikaciju onečišćenja u količini manjoj od propisanih nije potrebno razmatrati, osim u slučaju pojave toksičnosti, dok je u svim slučajevima onečišćenje potrebno kvalificirati [35]. U nastavku su navedeni pragovi (granice) količine za izvještaj<sup>16</sup>, identifikaciju<sup>17</sup> (strukturna karakterizacija) te kvalifikaciju<sup>18</sup> (procjena biološke sigurnosti) onečišćenja i razgradnih produkata u farmaceutskim aktivnim tvarima i proizvodima, a njihove vrijednosti ovise o maksimalnoj dnevnoj dozi<sup>19</sup> [42-43].

Propisani pragovi (granice) količine razgradnih produkata za izvještaj, identifikaciju i kvalifikaciju u novim farmaceutskim proizvodima prema ICH smjernicama, Q3B(R2) [42]:

Maksimalna dnevna doza:	Prag za izvještaj:
< 1 g	0,10 %
> 1 g	0,05 %
Maksimalna dnevna doza:	Prag za identifikaciju:
< 1 mg	1,0 % ili 5 µg TDI <sup>20</sup>
1 mg–10 mg	0,5 % ili 20 µg TDI
> 10 mg–2 g	0,2 % ili 2 mg TDI
> 2 g	0,1 %
Maksimalna dnevna doza:	Prag za kvalifikaciju:
< 10 mg	1,0 % ili 50 µg TDI
10 mg–100 mg	0,5 % ili 200 µg TDI
> 100 mg–2 g	0,2 % ili 3 mg TDI
> 2 g	0,15 %

---

<sup>15</sup> eng. *Threshold limits*

<sup>16</sup> eng. *Reporting treshold*

<sup>17</sup> eng. *Identification treshold*

<sup>18</sup> eng. *Qualification treshold*

<sup>19</sup> eng. *Maximum Daily Dose*

<sup>20</sup> eng. *Total Daily Intake, TDI*

Propisani pragovi (granice) količine onečišćenja za izvještaj, identifikaciju i kvalifikaciju u novim farmaceutski aktivnim tvarima prema ICH smjernicama, Q3A(R2) [43]:

Maksimalna dnevna doza:	Prag za izvještaj:
≤ 2 g	0,05 %
> 2 g	0,03 %
Maksimalna dnevna doza:	Prag za identifikaciju:
≤ 2 g	0,10 % ili 1,0 mg/dan unosa
> 2 g	0,05 %
Maksimalna dnevna doza:	Prag za kvalifikaciju:
≤ 2 g	0,15 % ili 1,0 mg/dan unosa
> 2 g	0,05 %

Navedena podjela i izračuni odnose se na organska onečišćenja, dok su granice za ostatna otapala definirana u poglavlju Q3C. Ako su granice za onečišćenja u novim farmaceutski aktivnim tvarima i farmaceutskim proizvodima veće od praga identifikacije slijedi se dijagram odluke<sup>21</sup> za identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prikazan na Slici 2.7. [43].

### **2.4.3. Kontrola onečišćenja [41]**

Zadavanje potrebne kakvoće ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika provodi se u cilju kontrole potencijalnih onečišćenja. Specifikacija obuhvaća set parametara, odnosno popis testova određenih zadanim analitičkim postupkom te definiranih odgovarajućim parametrima unutar propisanih kriterija. Ono uspostavlja određene kriterije koje pojedina ljekovita tvar i/ili farmaceutski oblik mora zadovoljiti da bi bio uzet u razmatranje za namjeravanu uporabu. „Sukladno specifikacijama“ označava da ljekovita tvar i/ili farmaceutski oblik, ako se testira u skladu s navedenim analitičkim postupkom zadovoljava navedene kriterije prihvatanja. Specifikacije su kritični standardi kvalitete koji su predloženi i opravdani od strane proizvođača te odobreni od strane regulatornih tijela.

---

<sup>21</sup> eng. *Decision tree*

#### **2.4.4. Kvalifikacija onečišćenja**

Kvalifikacija je postupak prikupljanja i procjene podataka koja uspostavlja biološku sigurnost pojedinog onečišćenja ili dani profil onečišćenja na razini/razinama na kojima se razmatra. Kada je prikladno preporučuje se da podnositelji zahtjeva daju obrazloženje za uspostavljanje kriterija za onečišćenja uz koji se uključuje razmatranje sigurnosti [42].

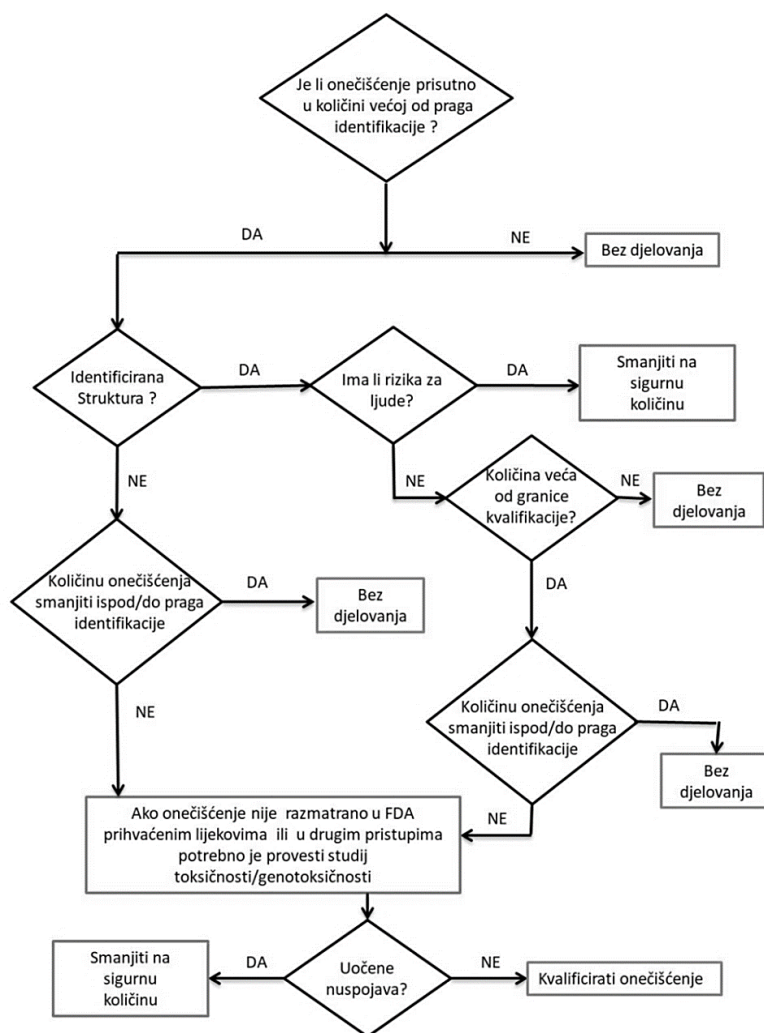
Onečišćenje se smatra kvalificiranim kad zadovolji jedno ili više sljedećih uvjeta:

- Kad promatrana razina i predloženi kriterij prihvaćanja onečišćenja ne prelazi razinu uočenu u FDA odobrenom humanom lijeku
- Kada je onečišćenje značajan metabolit ljekovite tvari
- Kada je promatrana razina i predloženi kriterij prihvaćanja onečišćenja adekvatno opravdan sa znanstvenom literaturom
- Kad promatrana razina i predloženi kriterij prihvaćanja onečišćenja ne prelazi razinu koja je bila adekvatno procijenjena u usporedbi *in vitro* genotoksičnim ispitivanjima

Iako se QSAR<sup>22</sup> program može koristiti za predviđanje toksičnosti individualnog onečišćenja ili profila onečišćenja, rezultati se ne mogu smatrati konačnima pri kvalifikaciji. Preporučeni pragovi kvalifikacije onečišćenja u novim farmaceutskim aktivnim tvarima i gotovim proizvodima temeljeni na maksimalnoj dnevnoj dozi prema ICH smjernicama navedeni su pod naslovom 2.4.2. Kada se ovi navedeni pragovi prekorače, razinu onečišćenja je potrebno kvalificirati. U nekim slučajevima prikladno je povećati prag npr. kada je briga za sigurnost mala ili smanjiti navedene pragove ako npr. postoje klinički dokazi prethodnih ispitivanja gdje je prikazano da je onečišćenje kod određenih skupina lijekova prilikom primjene kod pacijenata izazvalo određene nuspojave. Dakle, populacija bolesnika, učinci klase lijekova i povijesni podaci o sigurnosti uzimaju se u obzir prilikom uspostavljanja alternativnih pragova kvalifikacije [44]. Detaljan postupak odluke o identifikaciji i kvalifikaciji onečišćenja prikazan je dijagramom na Slici 2.7.

---

<sup>22</sup> eng. *Quantitative Structure Activity Relationships*, QSAR



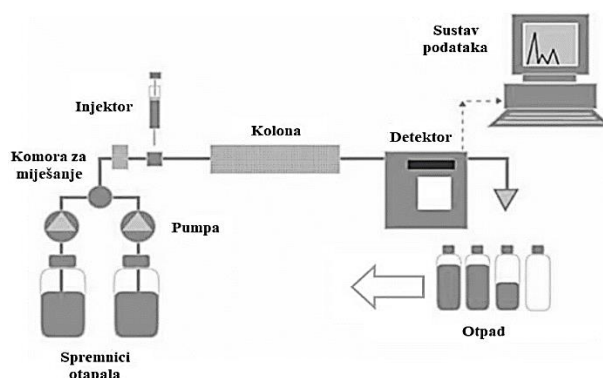
**Slika 2.7.** Dijagram identifikacije i kvalifikacije onečišćenja prema ICH smjernicama (preuzeto i prilagođeno) [43]

## 2.5. Analitičke metode

Analitički pristup probira lijekova u biološkim uzorcima su opsežni i dobro dokumentirani, mada mnogim brzim tehnikama često nedostaje odgovarajuća osjetljivost i specifičnost. Neprekidno nastajanje novih supstanci predstavlja značajan analitički izazov u održavanju suvremenih metoda za otkrivanje relevantnih lijekova. Prilagođavanje i validacija novih metoda za detekciju novih supstanci može biti zahtjevno [45]. Mnogi instrumenti koji se nalaze u kliničkim laboratorijima koriste analizatore vremena preleta (TOF) koji koriste vrijeme ionskog preleta za mjerenje mase [46].

### 2.5.1. Tekućinska kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda kojom se tvar razdvaja između dvaju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga, pokretna faza prelazi preko nepokretne u određenom smjeru. Pokretna faza može biti plin, kapljevina ili superkritični fluid, dok nepokretna faza može biti krutina, gel ili kapljevina. Danas se u upotrebi za analizu i razdvajanje komponenata koriste razne kromatografske tehnike [47]. No, za razliku od plinske kromatografije, GC<sup>23</sup> koja se ne koristi, tekućinska kromatografija, LC<sup>24</sup> može se upotrebljavati i za razdvajanje termički nestabilnih molekula. Također, u usporedbi s drugim separacijskim tehnikama koje se ne mogu direktno spregnuti (npr. izoelektrično fokusiranje, IEF) tekućinski kromatograf to može postići jednostavno sa spektrometrom masa. Tekućinska kromatografija uspješno se koristi prilikom razdvajanja kako malih tako i molekula velike molekulske mase, odnosno širokog raspona molekula. Odabir izvora iona, analizatora i detektora iona ovisi o uvjetima i vrsti analize (kvalitativne i kvantitativne) [48].



**Slika 2.8.** Shematski prikaz tekućinskog kromatografa (preuzeto i prilagođeno) [49]

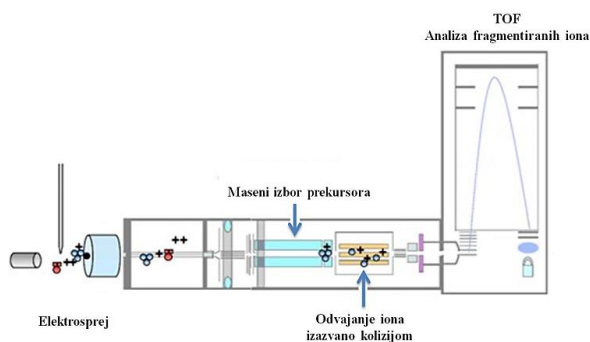
<sup>23</sup> eng. *Gas Chromatography*, GC

<sup>24</sup> eng. *Liquid Chromatography*, LC



### 2.5.2. Q-TOF

Dodatkom kvadripola i kolizijske ćelije na TOF tvori se Q-TOF koji omogućava izolaciju i fragmentaciju specifičnih iona, kao i mjerenje točne mase. U rutinskoj analizi u primjeni su sustavi tekućinske kromatografije vezani s TOF i Q-TOF spektrometrima masa, MS i MS/MS [50]. Kvadripol: sastoji se od četiri paralelne, metalne šipke te djeluje kao filter mase. Samo odabrani  $m/z$  ioni mogu proći kroz šipke. Hiperboličke šipke mogu optimizirati prijenos iona i spektralnu razlučivost. Završni dio kvadripola pri visokim naponima usmjerava ione u kolizijsku ćeliju. Kolizijska ćelija: heksapolni sklop u kojoj su odabrani fragmentirani ioni odvajaju i gdje je aksijalna akceleracija ubrzana kako bi se maksimizirala osjetljivost. Analizator vremena leta, TOF: gotovo paralelna zraka iona prolazi u ionski pulser TOF-a. Visoki napon se primjenjuje na ionski pulser za pokretanje leta iona na detektor. Ioni napuštaju pulser i putuju kroz cijev. Na kraju cijevi nalazi se ionsko ogledalo, nazvano reflektrom, koje povećava razlučivost instrumenta [51]. Spojevi su identificirani kombinacijom njihove mase, izmjerenog uzorka izotopa i vremena zadržavanja,  $t_R$  [46].



Slika 2.9. Q-TOF (preuzeto i prilagođeno) [52]

## 2.6. Programski paketi za procjenu toksičnosti spojeva

Američka Agencija za zaštitu okoliša, EPA<sup>25</sup> zadužena je da zaštiti izvore zemlje, zraka i vode. Pod državnim mandatom Zakona o zaštiti okoliša, ona teži osmišljavanju i implementaciji raznih akcija da bi se postigla potrebna ravnoteža između ljudske aktivnosti i prirode. Da bi postigla željeno, ulaže se u istraživački program pružanja baze podataka i tehničke podrške za rješavanje problema zaštite okoliša, kao i u predviđanje mudrog upravljanja ekološkim resursima, razumijevanju utjecaja zagađenja na zdravlje i sprječavanje ili smanjenje rizika za okoliš u budućnosti [53].

### 2.6.1. QSAR modeli

Matematički QSAR modeli pokazuju kvantitativni odnos aktivnosti i strukture te se koriste kako bi predvidjeli vrijednosti toksičnosti uzrokovanih fizikalno-kemijskim svojstvima i strukturom kemikalija (poznatih kao molekularni deskriptori). Ovi matematički modeli povezuju jedan ili više kvantitativnih parametara, izvedenih iz kemijske strukture s kvantitativnim mjerilom svojstava ili aktivnosti [54]. Akutna toksičnost (poput potrebne koncentracije koja uzrokuje polovičan ponor riba) jedan su od primjera mjera toksičnosti koje se mogu predvidjeti iz QSAR-a. Jednostavni QSAR modeli izračunavaju toksičnost kemikalija koristeći jednostavnu linearnu funkciju molekularnih deskriptora:

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

gdje su  $x_1$  i  $x_2$  nezavisne deskriptivne varijable, a  $a$ ,  $b$  i  $c$  su pripadajući parametri. Molarna masa i koeficijent raspodjele oktanol-voda,  $K_{ow}$  su primjeri molekularnih deskriptora. Predviđanja toksičnosti prema QSAR modelima mogu se koristiti za ispitivanje neprovjerenih spojeva kako bi se utvrdili prioriteta među skupim i dugotrajnim tradicionalnim biološkim ispitivanjima namijenjenih utvrđivanju razine toksičnosti. Oni su dobar alat kad uvjeti ne dopuštaju tradicionalna ispitivanja. Pored toga QSAR modeli su korisni za procjenu toksičnosti prilikom razvoja algoritama potrebnih za razvoj zelenog oblikovanja procesa, kao što je algoritam za smanjenje otpada<sup>26</sup> [53]. QSAR se odnosi na široko područje ispitivanja odnosa kemijskih struktura i bioloških aktivnosti kemikalija. Povezuje skup varijabli predviđanja (npr. broj ugljikovih atoma u molekuli) s posljedičnim varijablama (npr. bioakumulacija). Otkriveni odnos tada se može koristiti za predviđanje djelovanja novih

---

<sup>25</sup> eng. *U.S. Environmental Protection Agency*, EPA

<sup>26</sup> eng. *Waste Reduction Algorithm*

ili neprovjerenih kemikalija. Neki od QSAR alata razvijenih za predviđanje ekotoksičnosti kemikalija su ECOSAR<sup>27</sup>, KATE<sup>28</sup>, ADMET<sup>29</sup>, CADRE-AT<sup>30</sup> i TEST<sup>31</sup>. Prema izvoru iz 2016. godine alati su se usporedili prema eksperimentalnim pragovima akutne toksičnosti kemikalije za slatkovodne ribe, LC<sub>50</sub><sup>32</sup> u bilo kojem od 4 prihvaćena vremenska razdoblja (48 h, 72 h, 96 h, 120 h). Na temelju korijena srednje kvadratne pogreške<sup>33</sup> na vanjskom skupu podataka za provjeru valjanosti, alati su se poredali od boljih prema gorim u danom nizu: ECOSAR (1,29) < TEST (1,32) < KATE (1,35) < ADMET (1,60). Spomenuti alat CADRE-AT nije uvršten u ovaj niz jer nije upotrebljiv za navedeni kriterij te ne daje numeričke procjene LC<sub>50</sub>, već samo dodjeljuje regulatorne kategorije i trenutno nije dostupan javnosti. Procjena ekotoksičnosti kemikalija je težak zadatak, zbog složenih fizikalnih, kemijskih i bioloških promjena do kojih dolazi kada kemikalija dođe u doticaj s medijima iz okoliša [55].

### 2.6.2. TEST [56-57]

Svrha TEST programa je procijeniti vrijednosti toksičnosti i fizikalna svojstva kemikalija iz njihove molekulske strukture. Procijenjene vrijednosti toksičnosti i fizikalna svojstva putem raznih QSAR metoda mogu se koristiti za pružanje podataka potrebnih za poboljšanje održivosti dizajna kemijskih procesa (koristeći algoritme poput algoritma za smanjenje otpada) ili za odabir zelenijih otapala (na primjer softver *Paris III*). TEST omogućava procjenu toksičnosti bez potrebe za dodatnim programima. QSAR modeli ne mogu u potpunosti zamijeniti stvarna testiranja, ali se koriste u svrhu predviđanja rizika i prilikom registracije novih kemijskih tvari. Mnoge farmaceutske tvrtke i tvrtke za pesticide također koriste QSAR modele za provjeru toksičnosti (tj. provjeru akutne toksičnosti, mutagenosti, kancerogenosti) novih molekula i odlučuju kojoj molekuli će dati prioritet za komercijalizaciju. Za mnoge postojeće tvari na tržištu ne postoji potpun skup podataka o njihovoj opasnosti. Ovi modeli predstavljaju koristan alat za određivanje prioriteta među postojećim tvarima radi daljnje procjene rizika.

---

<sup>27</sup> eng. *Ecological Structure Activity Relationships*, ECOSAR

<sup>28</sup> eng. *Kashinhou Tool for Ecotoxicity*, KATE

<sup>29</sup> eng. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*, ADMET

<sup>30</sup> eng. *Computer-Aided Discovery and REdesign for Aquatic Toxicity*, CADRE-AT

<sup>31</sup> eng. *Toxicity Estimation Software Tool*, TEST

<sup>32</sup> eng. *Lethal Concentration 50*, LC<sub>50</sub>

<sup>33</sup> eng. *Root Mean Square Error*, RMSE

### 2.6.2.1. QSAR metode koje se mogu koristiti putem TEST programa [53]

TEST program omogućava procjenu toksičnosti tvari koristeći nekoliko različitih naprednih QSAR metoda:

- Metoda hijerarhijskog grupiranja<sup>34</sup>: koristi ponderirani prosjek predviđanja iz više modela koji se objedinjuju pomoću Wardove metode.
- FDA metoda<sup>35</sup>: za svaki ispitivani spoj koristi se novi model koji odgovara kemikalijama koje su slične ispitivanom spoju.
- Metoda jednog modela<sup>36</sup>: koristi više-linearni regresijski model koji se uklapa u skup primjenom pristupa temeljenog na genskom algoritmu.
- Metoda grupnog doprinosa<sup>37</sup>: predviđanje uz pomoć više-linearnog regresijskog modela koji se uklapa u skup (koristeći molekularni fragment kao nezavisnu varijablu).
- Metoda najbližeg susjeda<sup>38</sup>: predviđanje toksičnosti uzimanjem prosjeka od 3 kemikalije u skupu koje su najbližije testiranim kemikalijama.
- Konsenzus metoda<sup>39</sup>: uzima prosjek predviđene toksičnosti iz gornjih QSAR metoda (ako su rezultati u odgovarajućim domenama primjenjivosti).
- Metoda slučajnih šuma<sup>40</sup>: koristi stablo odlučivanja koje veže kemikalije određene ocjene toksičnosti (tj. pozitivne ili negativna razvojna toksičnost) koristeći skup molekularnih deskriptora kao varijable za odlučivanje.
- Metoda načina djelovanja<sup>41</sup>: dvostupanjski postupak gdje u prvom koraku način djelovanja određuje se iz linearnog modela, a u drugom koraku toksičnost se procjenjuje više-linearnim regresijskim modelom.

---

<sup>34</sup> eng. *Hierarchical Clustering*

<sup>35</sup> eng. *FDA Method*

<sup>36</sup> eng. *Single model*

<sup>37</sup> eng. *Group contribution*

<sup>38</sup> eng. *Nearest neighbor*

<sup>39</sup> eng. *Consensus method*

<sup>40</sup> eng. *Random forest model*

<sup>41</sup> eng. *Mode of action, MOA*

### 2.6.2.2. *Upotrebljivost QSAR metoda dostupnih u TEST programu [53]*

Sposobnost predviđanja svake od QSAR metoda ocijenjeno je statističkom vanjskom validacijom<sup>42</sup>. Podaci unutar programa podijeljeni su na trenirani i testirani skup. Za krajnju točku razvojne toksičnosti, trenirani i testirani skupovi preuzeti su iz skupova podataka koji su korišteni u CAESAR<sup>43</sup> bazi, kako bi se unutar TEST programa mogao koristiti i model slučajnih šuma. QSAR metoda je prihvatljive prediktivnosti, ako su zadovoljeni sljedeći uvjeti:

$$q^2 > 0,5$$

$$R^2 > 0,6$$

$$\frac{(R^2 - R_0^2)}{R^2} < 0,1 \text{ i } 0,85 \leq k \leq 1,15$$

gdje su:

- $q^2$ - koeficijent korelacije jednog izostavljenog iz treniranog skupa
- $R^2$ - koeficijent korelacije između promatrane i predviđene toksičnosti za testirani skup
- $R_0^2$ - koeficijent korelacije između promatrane i predviđene toksičnosti za testirani set s odsječkom postavljenim na nulu (gdje je regresijski pravac  $Y = kX$ )

Uz navedene jednadžbe točnost modela procjenjuje se i pomoću korijena srednje kvadratne pogreške te prosječne apsolutne pogreške<sup>44</sup> za testirani skup podataka. Statistički kriteriji točnosti modela su: usklađenost, osjetljivost i specifičnost. U priručniku za korištenje TEST programa dani su i rezultati ispitivanja točnosti i pouzdanosti predviđanja dostupnih QSAR metoda prema kojima je u većini slučajeva konsenzus metoda pokazala najbolje rezultate. Tako je navedena metoda najpouzdanija prilikom procijene akutne toksičnosti kemikalija koje uzrokuju smrtnost 50 % jedinki u određenom vremenu. Također, za predviđanje bioakumulacijskog faktora<sup>45</sup> konsenzusna metoda opet je statistički pokazala najbolje rezultate, ako se u obzir uzmu točnost i pokrivenost predviđanja. Uz najveću vrijednost  $R^2$  od 0,760 pokazala je i najveću pokrivenost predviđanja od 0,926, kao i najmanje RMSE= 0,661 te MAE= 0,513. Prilikom procijene razvojne toksičnosti<sup>46</sup> metoda konsenzusa

---

<sup>42</sup> eng. *Statistical external validation*

<sup>43</sup> eng. *Computer Assisted Evaluation of industrial chemical Substances According to Regulations*, CAESAR

<sup>44</sup> eng. *Mean Absolute Error*, MAE

<sup>45</sup> eng. *Bioaccumulation factor*, BCF

<sup>46</sup> eng. *Developmental toxicity*

postigla je najbolje rezultate za EPA razvijene QSAR metode (u smislu točnosti predviđanja i pokrivenosti) te je pokazala usklađenost od 0,793, osjetljivost 0,902, specifičnost 0,529 i pokrivenost 1,000, a CAESAR metoda slučajnih šuma postigla je slične rezultate kao EPA konsenzus model s usklađenošću od 0,852, osjetljivošću 0,949, specifičnošću 0,600 i pokrivenošću 0,931 (usklađenost je veća, ali pokrivenost niža). Za procjenu razvojne toksičnosti sve ispitane metode postigle su znatno veću osjetljivost predviđanja nego specifičnost, no to je prihvatljivo za upotrebu jer se želi lažno negativne rezultate razvojne toksičnosti svesti na minimum. Također, metoda konsenzusa postigla je najbolje predviđanje mutagenosti Ames testom<sup>47</sup> s vrijednostima usklađenosti od 0,790, osjetljivosti 0,789, specifičnosti 0,791 te pokrivenosti 0,995. S druge strane metode jednog modela i grupnog doprinosa nisu primjenjive u ovu svrhu, dok su ostale ispitane metode poput hijerarhijske, FDA i metode najbližeg susjeda postigle prihvatljivu ravnotežu osjetljivosti i specifičnosti za procjenu mutagenosti TEST programom.

---

<sup>47</sup> eng. *Ames mutagenicity*

**Tablica 2.2.** Upotrebljivost TEST programa [53]

	<b>GRANICE TOKSIČNOSTI:</b>	<b>FIZIKALNA SVOJSTVA:</b>
<b>TEST</b>	<p>1) 96 h <i>Pimephales promelas</i> LC<sub>50</sub> (koncentracija (mg/L) ispitivane kemikalije u vodi koja uvjetuje 50 % smrtnosti ukupnog broja ribe Mućnjak nakon 96 h)</p> <p>2) 48 h <i>Daphnia magna</i> LC<sub>50</sub> (koncentracija (mg/L) ispitivane kemikalije u vodi koja uvjetuje 50 % smrtnosti ukupnog broja Vodenbuhe nakon 48 h)</p> <p>3) 48 h <i>Tetrahymena pyriformis</i> IGC<sub>50</sub> (koncentracija (mg/L) ispitivane kemikalije u vodi koja uvjetuje 50 % inhibicije rasta trepetljikaša <i>Tetrahymena pyriformis</i>)</p> <p>4) Oralna primjena kod štakora LD<sub>50</sub> (količina ispitivane kemikalije (mg/kg) po tjelesnoj masi) koja uvjetuje smrtnost 50 % štakora nakon oralne primjene)</p> <p>5) Bioakumulacijski faktor (omjer koncentracije ispitivane kemikalije u ribama kao rezultat apsorpcije kroz respiratornu površinu i one u vodi)</p> <p>6) Razvojna toksičnost (ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost pri razvoju ljudi ili životinja)</p> <p>7) Amesov test mutagenosti (ispitivani spoj je pozitivan na mutagenost ako inicira povratni rast kolonije <i>Salmonella typhimurium</i>)</p>	<p>1) Temperatura vrelišta (izražena u °C, temperatura vrelišta tvari pri atmosferskom tlaku)</p> <p>2) Gustoća (izražena u g/cm<sup>3</sup>)</p> <p>3) Točka paljenja (izražena °C, najniža temperatura pri kojoj se isparljivi materijal može ispariti pod utjecajem izvora zapaljenja)</p> <p>4) Toplinska vodljivost (izražena u mW/mK)</p> <p>5) Viskoznost (mjera otpora fluida da teče, izražen u cP definiran kao konstanta proporcionalnosti između smičnog naprezanja i smične brzine)</p> <p>6) Površinska napetost (izražena u dyn/cm, svojstvo kapljevina da se odupre vanjskoj sili)</p> <p>7) Topljivost u vodi (izražena u mg/L, količina ispitivane kemikalije koja će se otopiti u vodi i formirati homogenu otopinu)</p> <p>8) Tlak pare (izražen u mmHg, para u termodinamičkoj ravnoteži sa svojom kondenziranom fazom u zatvorenom sustavu)</p> <p>9) Temperatura taljenja (izražena u °C, ispitivana kemikalija u krutom stanju prelazi u kapljevitu fazu)</p>

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



## 3.1. Materijali

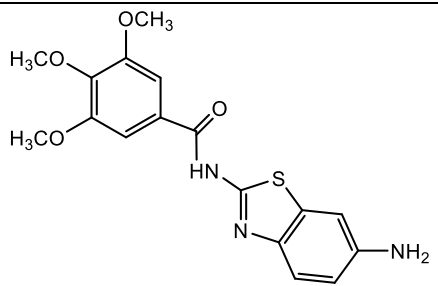
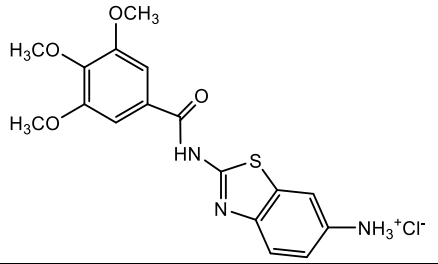
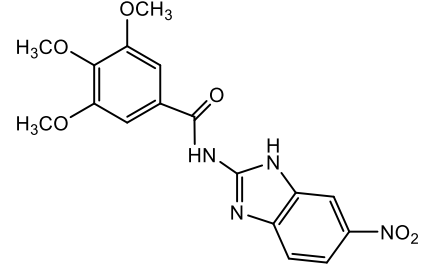
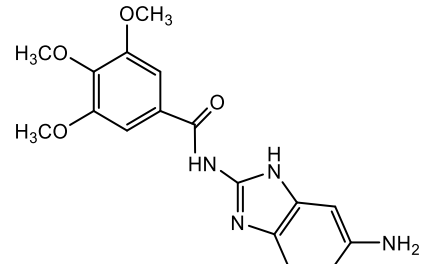
### 3.1.1. Kemikalije

Tablica 3.1. Korištene kemikalije

<i>Natrijev hidroksid, NaOH</i>	<i>Gram-Mol, Zagreb; p.a.</i>
<i>Klorovodična kiselina, HCl</i>	<i>VWR Chemicals, BDH Prolabo UK; Analar Normapur</i>
<i>Acetonitril, ACN</i>	<i>J. T. Baker, Nizozemska; HPLC čistoća</i>
<i>Ultračista voda, Milli-q</i>	<i>Millipore Simplicity UV</i>

### 3.1.2. Ispitivani derivati benzimidazola i benzotiazola

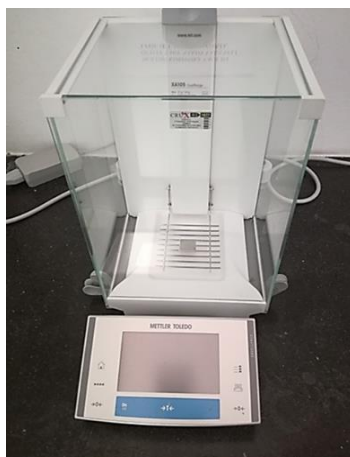
Tablica 3.2. Prikaz ispitivanih uzoraka derivata benzimidazola i benzotiazola

ID:	Struktura spoja:	Mr (g/mol):
DMP-1		359,4
DMP-2		395,9
DMP-3		372,34
DMP-4		342,4

## 3.2. Instrumenti

### 3.2.1. Analitička vaga

Vaganje derivata benzimidazola i benzotiazola provodilo se na analitičkoj vagi Mettler Toledo XA105DU koja posjeduje mogućnost očitavanja od 0,01 g.



**Slika 3.1.** Analitička vaga

### 3.2.2. Vodena kupelj i sušilica

Nakon vaganja potrebne mase uzoraka na analitičkoj vagi oni se otapaju u tikvicama od 5 mL, a zatim se njihova stabilnost dalje ispituje raznim stres-testovima. Termalna stabilnost uzoraka ispitivala se pri dvjema povišenim temperaturama. Uzorci u kapljevitom stanju zagrijavali su se u vodenoj kupelji pri 80 °C, a uzorci u krutom stanju u sušioniku pri temperaturi od 100 °C.



**Slika 3.2.** Vodena kupelj (lijevo) i sušionik (desno)

### **3.2.3. Suntest CPS+**

Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht, Njemačka) (Slika 3.3.) je uređaj koji služi za osvjetljavanje uzoraka umjetnim Sunčevim zračenjem u rasponu valnih duljina 300-800 nm. Izvor umjetnog Sunčeva zračenja je ksenonska lampa. Parametri koji se mogu podešavati su temperatura, intenzitet lampe i vrijeme izlaganja uzorka zračenju.

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



**Slika 3.3.** UV/VIS simulator sunčevog zračenja

### **3.2.4. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)**

Snimanje uzoraka nakon provedbe stres-testova 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 3.4.). Uređaj se još sastoji od vakuumske degazera, automatskog dodavača uzorka, termostata i binarne pumpe.



**Slika 3.4.** Tekućinski kromatograf ultra visoke 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. Računalni programi

#### 3.3.1. *ChemDraw Professional*

*ChemDraw Professional* je kompletni alat za crtanje kojega koriste kemičari i biolozi za izradu znanstveno inteligentnih crteža koji su spremni za publikaciju i upotrebu u ELN-ovima, bazama podataka te za ispitivanje kemijskih baza podataka, sada uključujući i *SciFinder*. Ono je jedinstveno rješenje za korištenje u znanstvene svrhe jer na pouzdan način precizno prikazuje organske, organometalne, polimerne i biopolimerne materijale (uključujući amino kiseline, peptide i DNK i RNK sekvencije) te napredne oblike stereokemije. Ovaj alat omogućava crtanje i slanje kemijskih spojeva te pretragu reakcija izravno na *SciFinder* u vrlo kratkom vremenu. Znanstvenici pomoću ovog programa mogu brzo, učinkovito i točno upotpuniti svoja znanstvena istraživanja pomoću opsežnog seta bioloških predložaka. Također, ovaj program uvelike smanjuje vrijeme potrebno za predviđanje svojstava, generiranje spektara, konstruiranja ispravnih *IUPAC* naziva i izjednačavanje reakcijske stehiometrije. Brže i preciznije pronalazi strukture spojeva neovisno o vrsti [58]. Nakon provedbe stres-testova i snimanjem uzoraka na instrumentu, 2D-UHPLC-QTOF dobiveni su kromatogrami. Iz dobivenih kromatograma očitani su osnovni, početni spojevi, a zatim i njihovi razgradni produkti. Za grafičko predočenje dobivenih razgradnih produkata koristio se program *ChemDraw Professional* koji je omogućio da se odredi njihova struktura, kao i razgradni put početnih spojeva nakon što su se podvrgnuli prisilnoj razgradnji.

### **3.3.2. TEST**

Kako je prethodno spomenuto u uvodnom poglavlju 2.6. TEST program koristi se u svrhu procijene vrijednosti toksičnosti i fizikalnih svojstva kemikalija na osnovu njihove molekulske strukture. Za procjenu vrijednosti toksičnosti i fizikalnih svojstava koriste se razni QSAR modeli. Detaljan opis QSAR metoda koje se mogu upotrijebiti ovim programom navedeni su u uvodnom djelu ovog rada, a pomoću TEST-a procijenila se vrijednost razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora i mutagenost ispitivanih spojeva te njihovih razgradnih produkata. Kao metoda za proračun većine spojeva koristila se konsenzus metoda koja je zbog svoje točnosti i pouzdanosti preporučena od strane autora programa, ali i raznih literaturnih radova. Predviđena toksičnost iz konsenzusne metode predstavlja prosjek predviđenih toksičnosti iz 5 različitih QSAR metoda ugrađenih u TEST program [59]. S obzirom na to da konsenzusna metoda ne može dati pouzdanu procjenu toksičnosti na treniranom skupu podataka čija se toksičnost može procijeniti samo jednom QSAR metodom, za neke spojeve koristile su se i druge metode procjene poput metode najbližeg susjeda i CAESAR metode slučajnih šuma.

## 3.4. Opis rada

### 3.4.1. Priprema uzoraka

U pet tikvica odvagao se po 1 mg svakog uzorka na analitičkoj vagi Mettler Toledo XA105DU. Nakon što se uzorci odvažu u tikvicama od 5 mL, oni se dalje otapaju u određenim otapalima. Od ispitivanih uzoraka DMP-1, DMP-3 te DMP-4 su se otopili u 2 mL 40 % acetonitrila (ACN), dok se uzorak DMP-2 otopio u 2 mL 40 % metanola (MeOH). Nakon što su se uzorci otopili te tretirali određenim reagensima ili izlagali posebnim stres uvjetima svjetlosti i temperature, tikvice su se nadopunile redestiliranom vodom do oznake.

### 3.4.2. Ispitivanje prisilne razgradnje

Nakon što su se uzorci pripremili u tikvicama, oni su se dalje izložili raznim uvjetima da bi im se ispitala stabilnost i odredili nastali razgradni produkti. Ispitivanja prisilne razgradnje provodila su se prema smjernicama pronađenim u raznim literaturnim izvorima. Da bi se ispitala podložnost uzoraka kiselinskoj hidrolizi koristila se klorovodična kiselina, HCl. U uzorke se dodavalo 500  $\mu$ L 0,5 M HCl te se nakon provedenih 6 h na sobnoj temperaturi otopina neutralizirala s 500  $\mu$ L 0,5 M natrijeva hidroksida, NaOH te se tikvica potom nadopunila redestiliranom vodom do oznake. Ispitivanje podložnosti uzoraka na bazičnu hidrolizu provodilo se dodavanjem 500  $\mu$ L 0,5 M NaOH te se nakon 6 h provedenih na sobnoj temperaturi u tikvicu dodalo 500  $\mu$ L 0,5 M HCl za neutralizaciju i redestilirana voda do oznake. Ispitivanja na oksidaciju provodilo se dodavanjem 1 mL 10 % vodikova peroksida, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tikvicu s otopljenim uzorkom. Nakon 6 h provedenih na sobnoj temperaturi tikvica se nadopunila s redestiliranom vodom do oznake. Podložnost uzoraka termalnoj razgradnji ispitala se na dvije povišene temperature. Ispitivanje pri 80 °C provodilo se u vodenoj kupelji. 1 mg uzorka otopljen u 2 mL otapala, odnosno 200  $\mu$ g/mL se stavio u vodenu kupelj pri temperaturi od 80 °C na 6 h te potom izvadio i nadopunio redestiliranom vodom do oznake. Ispitivanje na 100 °C se provodilo u sušioniku. 1 mg uzorka u krutom stanju se izlagao temperaturi pri 100 °C potom otopio u 2 mL otapala i nadopunio redestiliranom vodom do oznake. Fotolitička razgradnja uzoraka ispitala se izlaganjem njihove 200  $\mu$ g/mL otopine umjetnom sunčevom zračenju intenziteta 500 Wh/m<sup>2</sup>. Uzorci su se zračili 15 h, a potom se tikvica nadopunila redestiliranom vodom do oznake. Na kraju su se uzeli uzorci iz tikvica i prenijeli u vijalice za analizu na 2D-UHPLC-QTOF.

### 3.4.3. 2D-UHPLC-QTOF

Nakon ispitivanja stabilnosti uzoraka prisilnom razgradnjom te uzimanja uzoraka u vijalice, one se dalje stavljaju na analizu. Analiza se provodila na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti povezanim sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF). Metoda ionizacije uzorka bilo je elektroraspršenje u pozitivnom modu.

#### 3.4.3.1. Ispitivanje DMP-1:

Za analizu se koristila C-18 kolona, dimenzija 5 x 2,1 mm i unutarnjeg promjera 1,7  $\mu\text{m}$ . Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlja kiselina u vodi (A) i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje.

Gradijent pokretne faze za analizu DMP-1 prikazan je u Tablici 3.3.

**Tablica 3.3.** Sastav pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom

Vrijeme, min	Volumen otapala A, %
0,00	95
1,00	95
5,00	70
8,00	50
10,00	30
11,00	30
11,01	95

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Kolona je termostatirana na 60 °C. U kolonu je injektirano 1  $\mu\text{L}$  uzorka. Protok je tijekom analize iznosio 0,5 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti, za što je potrebna 1 minuta.

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

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

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

### 3.4.3.2. Ispitivanje DMP-2:

Za analizu se koristila C-18 kolona dimenzija 5 x 2,1 mm i unutarnjeg promjera 1,7  $\mu\text{m}$ . Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlja kiselina u vodi (A) i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje.

Gradijent pokretne faze za analizu DMP-2 prikazan je u Tablici 3.5.

**Tablica 3.5.** Sastav pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom

Vrijeme, min	Volumen otapala A, %
0,00	95
1,00	95
5,00	70
8,00	50
10,00	30
11,00	30
11,01	95

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Kolona je termostatorirana na 60 °C. U kolonu je injektirano 1  $\mu\text{L}$  uzorka. Protok je tijekom analize iznosio 0,5 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti, za što je potrebna 1 minuta.

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

**Tablica 3.6.** Uvjeti izvora iona spektrometra masa

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



### 3.4.3.3. Ispitivanje DMP-3:

Uzorci su snimani na spektrometru masa, a korištena je kolona BEH C-18, dimenzija 100 x 2,1 mm te unutarnjeg promjera 1,7  $\mu\text{m}$ . Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlja kiselina u vodi (A) i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje.

Gradijent pokretne faze za analizu DMP-3 prikazan je u Tablici 3.7.

**Tablica 3.7.** Sastav pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom

Vrijeme, min	Volumen otapala A, %
0,00	95
1,00	95
5,00	70
8,00	50
10,00	30
11,00	30
11,01	95

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Kolona je termostatorirana na 60 °C. U kolonu je injektirano 2  $\mu\text{L}$  uzorka. Protok je tijekom analize iznosio 0,5 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti, za što je potrebno 1 minuta.

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

**Tablica 3.8.** Uvjeti izvora iona spektrometra masa

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

#### 3.4.3.4. Ispitivanje DMP-4:

Za analizu se koristila C-18 kolona dimenzija 5 x 2,1 mm i unutarnjeg promjera 1,7  $\mu\text{m}$ . Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlja kiselina u vodi (A) i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje.

Gradijent pokretne faze za analizu DMP-4 prikazan je u Tablici 3.9.:

**Tablica 3.9.** Sastav pokretne faze korišten za separaciju tekućinskom kromatografijom

Vrijeme, min	Volumen otapala A, %
0,00	95
1,00	95
5,00	50
7,00	40
9,00	40
9,01	95

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana te termostatorirana na 40 °C. Nakon stabilizacije tlaka u koloni analiza je mogla početi. U kolonu je injektirano 2  $\mu\text{L}$  uzorka. Protok je tijekom analize iznosio 0,3 mL/min. S obzirom na to da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti, a za to je potrebna 1 minuta.

Analiza je provedena pri sljedećim uvjetima:

**Tablica 3.10.** Uvjeti izvora iona spektrometra masa

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

Osnovni spojevi su identificirani na temelju spektara masa i vremena zadržavanja, iako  $m/z$  omjer molekulskog iona vrlo često može biti dovoljan za identifikaciju. Udio razgradnih produkata po svakom eksperimentu određivao se usporedbom površina ispod odgovarajuće kromatografske krivulje svakog razgradnog produkta s površinom molekule osnovnog spoja.

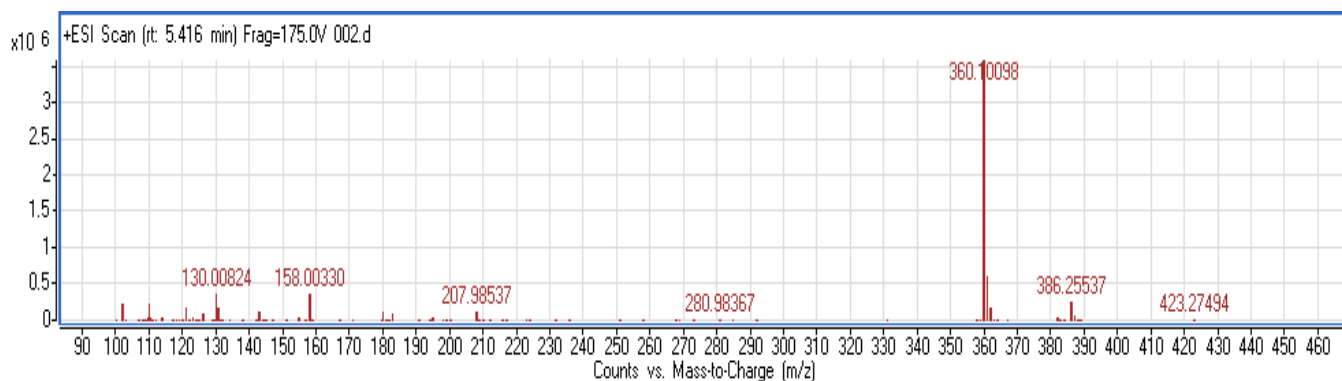
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Identifikacija produkata nastalih prisilnom razgradnjom

Analiza otopina uzoraka provodila se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti vezanom na spektrometar masa koji mjeri vrijeme preleta. U navedenoj metodi se ioni ubrzavaju u električnom polju poznate snage i putuju, te se omjer mase i naboja ( $m/z$ ) iona određuje mjerenjem vremena preleta do detektora [40]. Aktivni spojevi i razgradni produkti su se identificirali pomoću kvalitativnog parametra, vremena zadržavanja ( $t_R$ ). Dobiveni spektri masa dani su u nastavku.

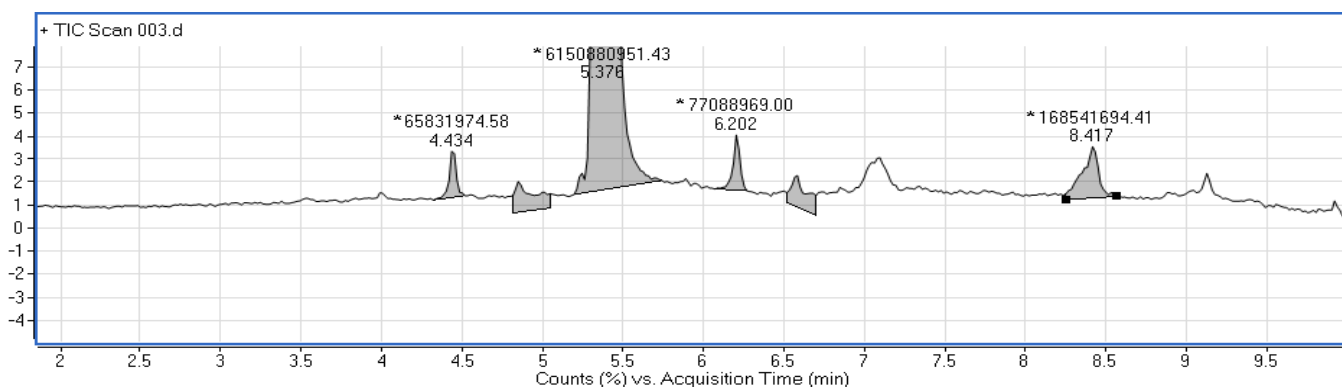
### 4.1.1. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-1

Najprije je snimljen kromatogram nerazgrađenog spoja DMP-1, prikazan na Slici 4.1. Na prikazanom kromatogramu glavni pik koji odgovara spoju DMP-1, ima vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) od 5,416 minute.

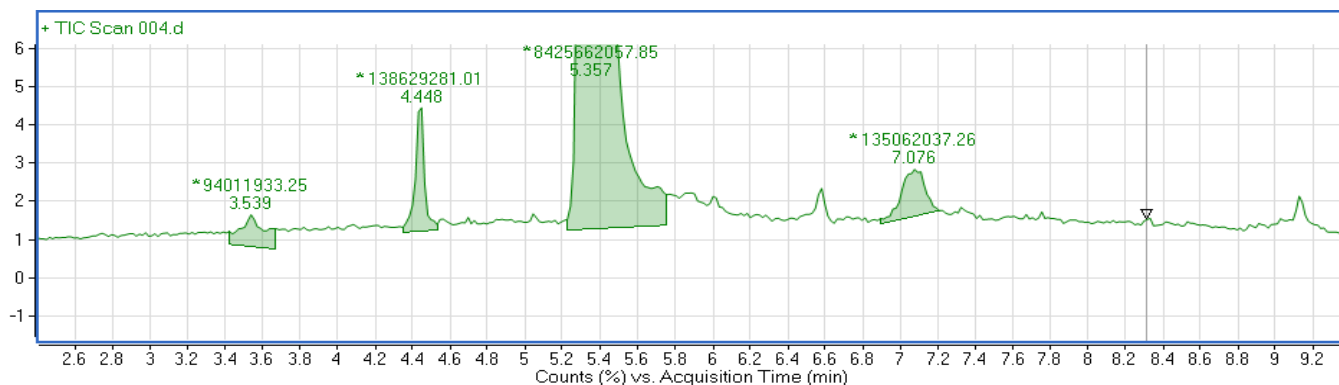


**Slika 4.1.** Kromatogram spoja DMP-1 s vremenom zadržavanja,  $t_R = 5,416$  min

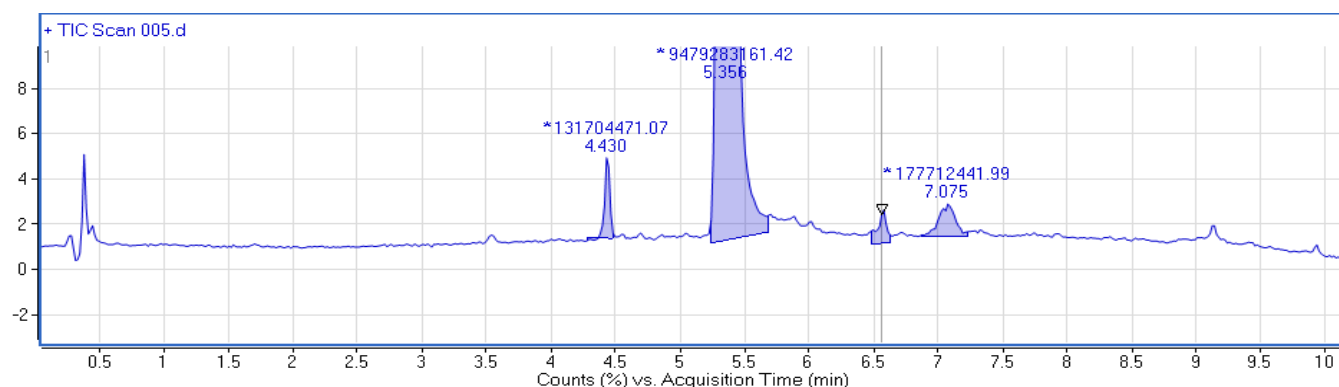
Zatim su snimljeni kromatogrami uzoraka DMP-1 koji su bili podvrgnuti razgradnji s  $H_2O_2$ , HCl, NaOH, umjetnoj sunčevoj svjetlosti te povišenoj temperaturi. Provedena ispitivanja pokazala su da je DMP-1 podložan razgradnji u svim ispitivanim eksperimentalnim uvjetima (Slike 4.1.1.-4.1.5.).



**Slika 4.1.1.** Kromatogram DMP-1 u uvjetima oksidacije peroksidom (uvećani kromatogram)

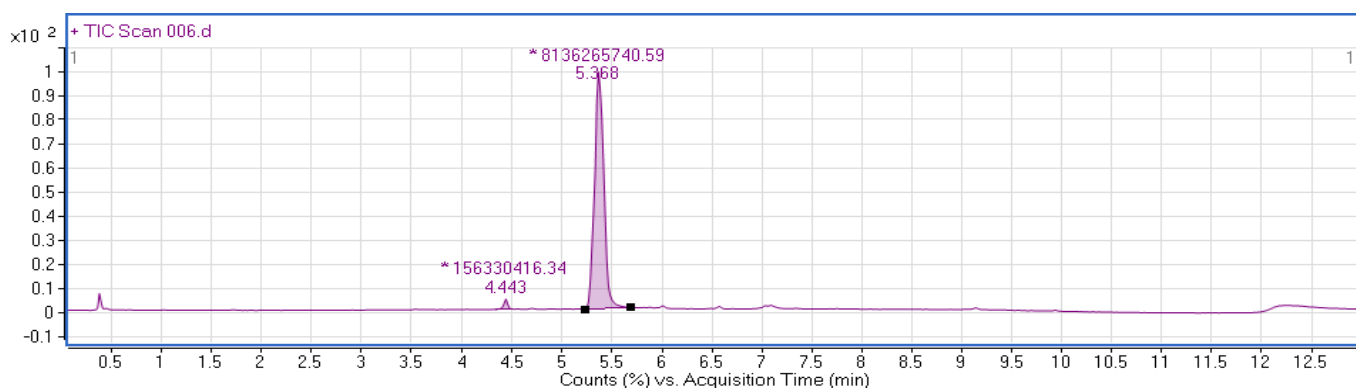


**Slika 4.1.2.** Kromatogram DMP-1 razgrađenog u 0,5 M HCl-a (kisela hidroliza)



**Slika 4.1.3.** Kromatogram DMP-1 razgrađenog u 0,5 M NaOH-a (lužnata hidroliza)

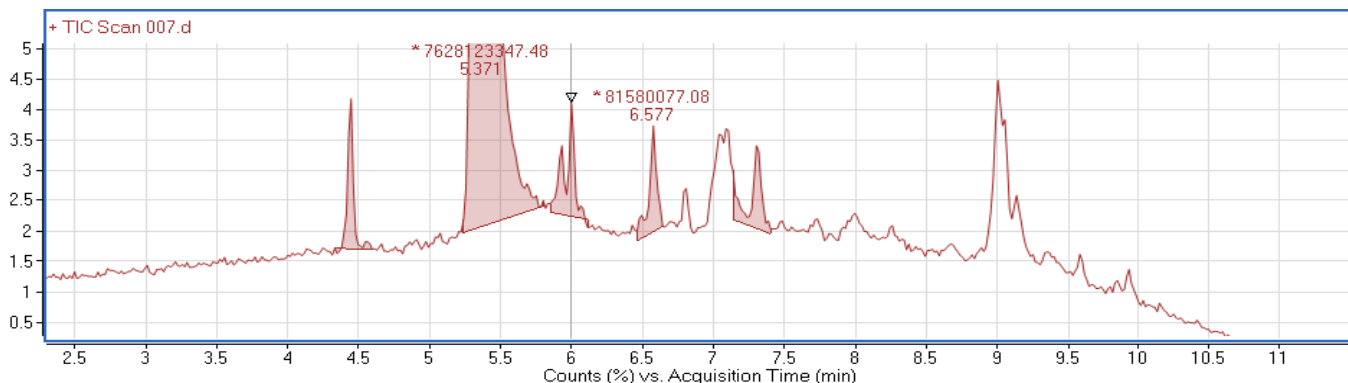
Usporedbom kromatograma u uvjetima kiseline i lužnate hidrolize vidljivo je da se razgradni produkti u oba slučaja pojavljuju na istim vremenima zadržavanja,  $t_R$ . Usporedbom tih kromatograma s kromatogramom u uvjetima oksidacije peroksidom vidljivo je da su neki razgradni produkti isti, iako u slučaju oksidacije peroksidom nastaje daleko više razgradnih produkata (njih čak 5).



**Slika 4.1.4.** Kromatogram DMP-1 izloženog temperaturi od 100 °C

Otopina soli DMP-1 izložena temperaturi od 80 °C u vodenoj kupelji je iskristalizirala, tako da je razgradni produkt vidljiv na kromatogramu kada je čvrsta sol bila podvrgnuta termalnim

uvjetima razgradnje pri temperaturi od 100 °C. Radi se o razgradnom produktu koji se pojavljuje u svim eksperimentima provedene prisilne razgradnje na vremenu 4,443 minute.

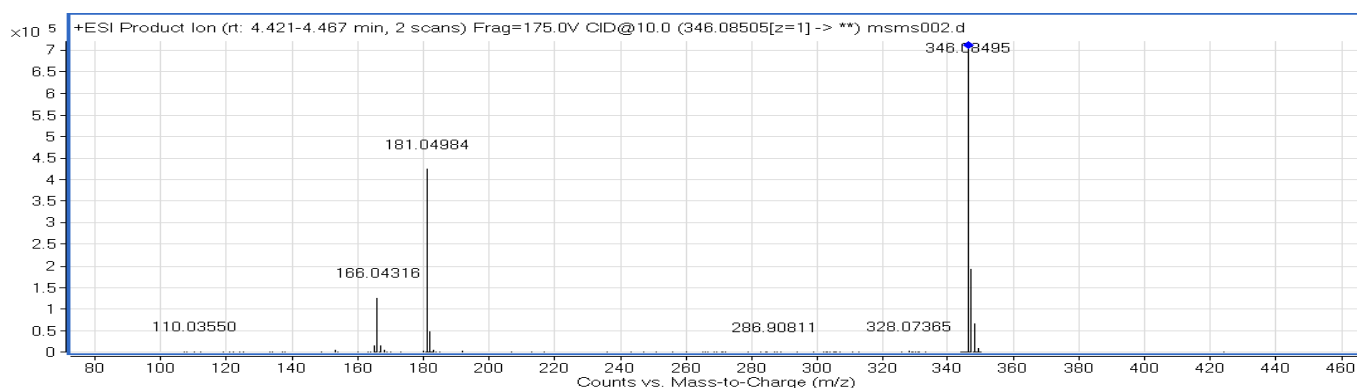


**Slika 4.1.5.** Kromatogram DMP-1 izloženog fotolizi UV/VIS (500 Wh/m<sup>2</sup>)

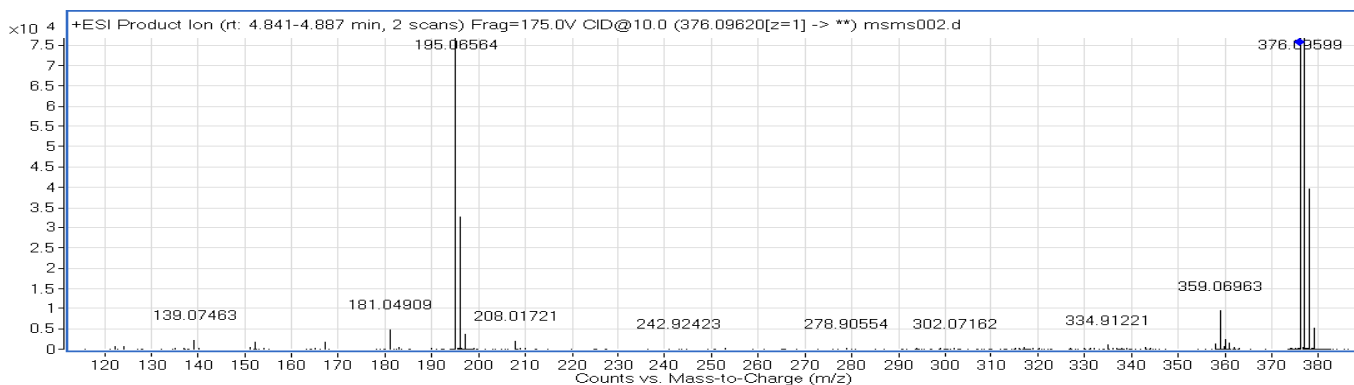
Nakon što su snimljeni spektri svih provedenih eksperimenata, utvrdilo se kako se u uvjetima prisilne razgradnje DMP-1 pojavljuje ukupno 6 razgradnih produkata, pri čemu se najviše njih, čak 5 pojavljuje tijekom oksidacije s 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Od spomenutih pet (*m/z* 346, *m/z* 376 (*t<sub>R</sub>*=4,8 min), *m/z* 376 (*t<sub>R</sub>*=6,2 min), *m/z* 410 i *m/z* 374) nastalih pri oksidaciji peroksidom, u uvjetima kisele i lužnate hidrolize pojavljuju se dva ista razgradna produkta *m/z* 346 i *m/z* 410. U uvjetima termalne razgradnje pojavljuje se samo jedan razgradni produkt *m/z* 346, a u uvjetima razgradnje pod utjecajem svjetlosti pojavljuje se ukupno 3 razgradna produkata od kojih je jedan potpuno novi razgradni produkt *m/z* 396.

Za tih 6 razgradnih produkata, napravljena je fragmentacija s ciljem identificiranja njihove strukture.

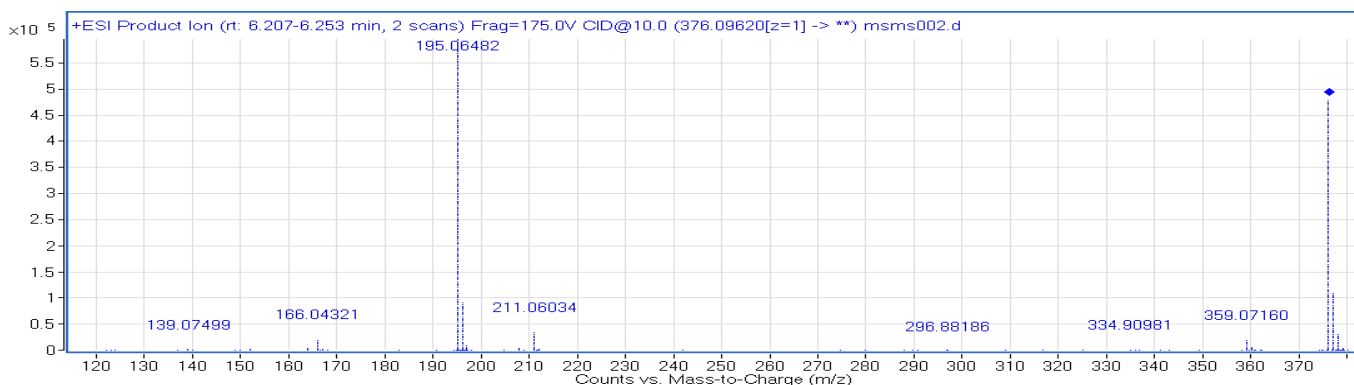
Na Slikama 4.1.a.-4.1.f. prikazani su kromatogrami fragmentiranih detektiranih razgradnih produkata.



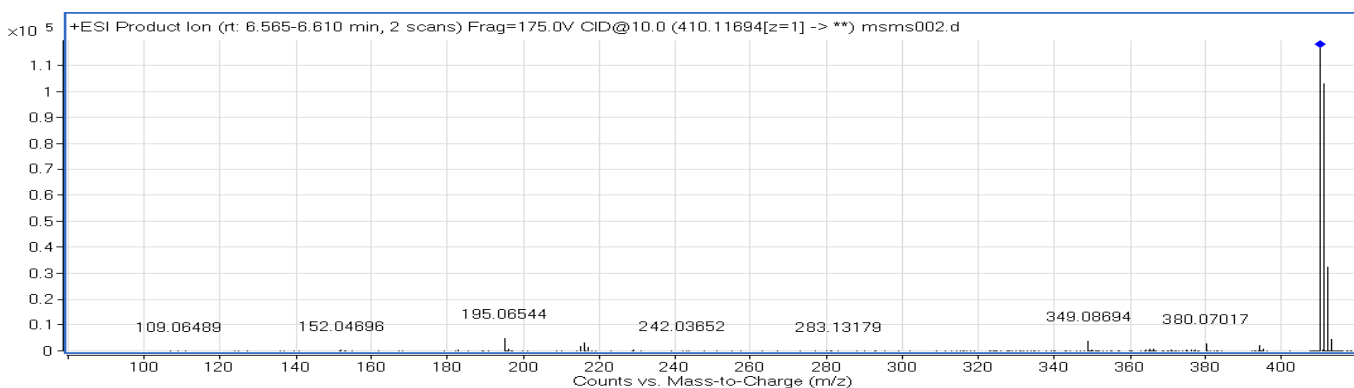
**Slika 4.1.a.** MS/MS spektra fragmenta *m/z* 346, vremena zadržavanja 4,421-4,467 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



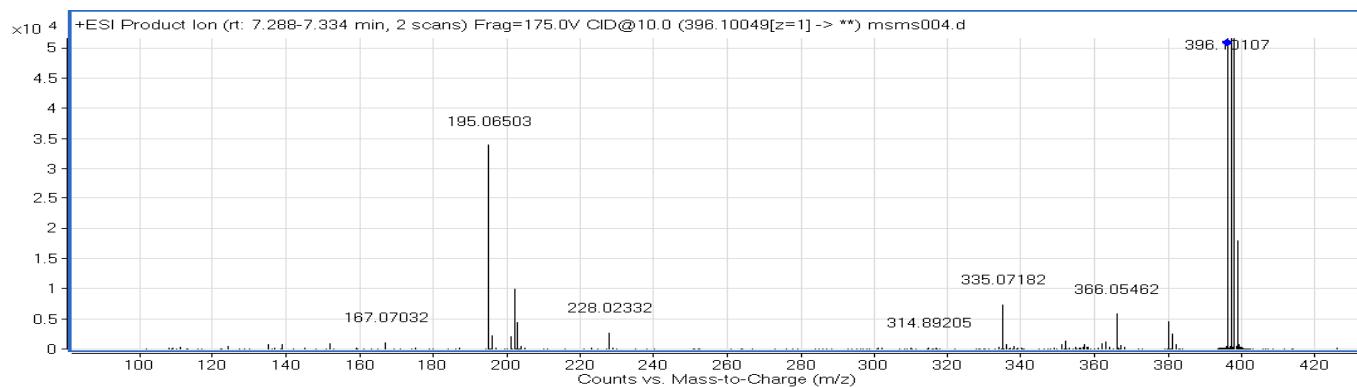
**Slika 4.1.b.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  376, vremena zadržavanja 4,841-4,887 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



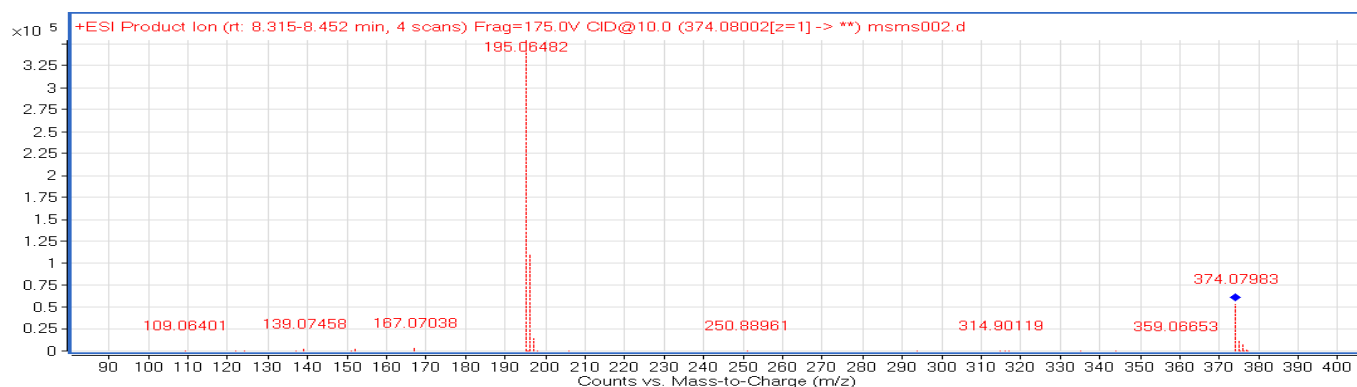
**Slika 4.1.c.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  376, vremena zadržavanja 6,207-6,253 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.1.d.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  410 vremena zadržavanja 6,565-6,610 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



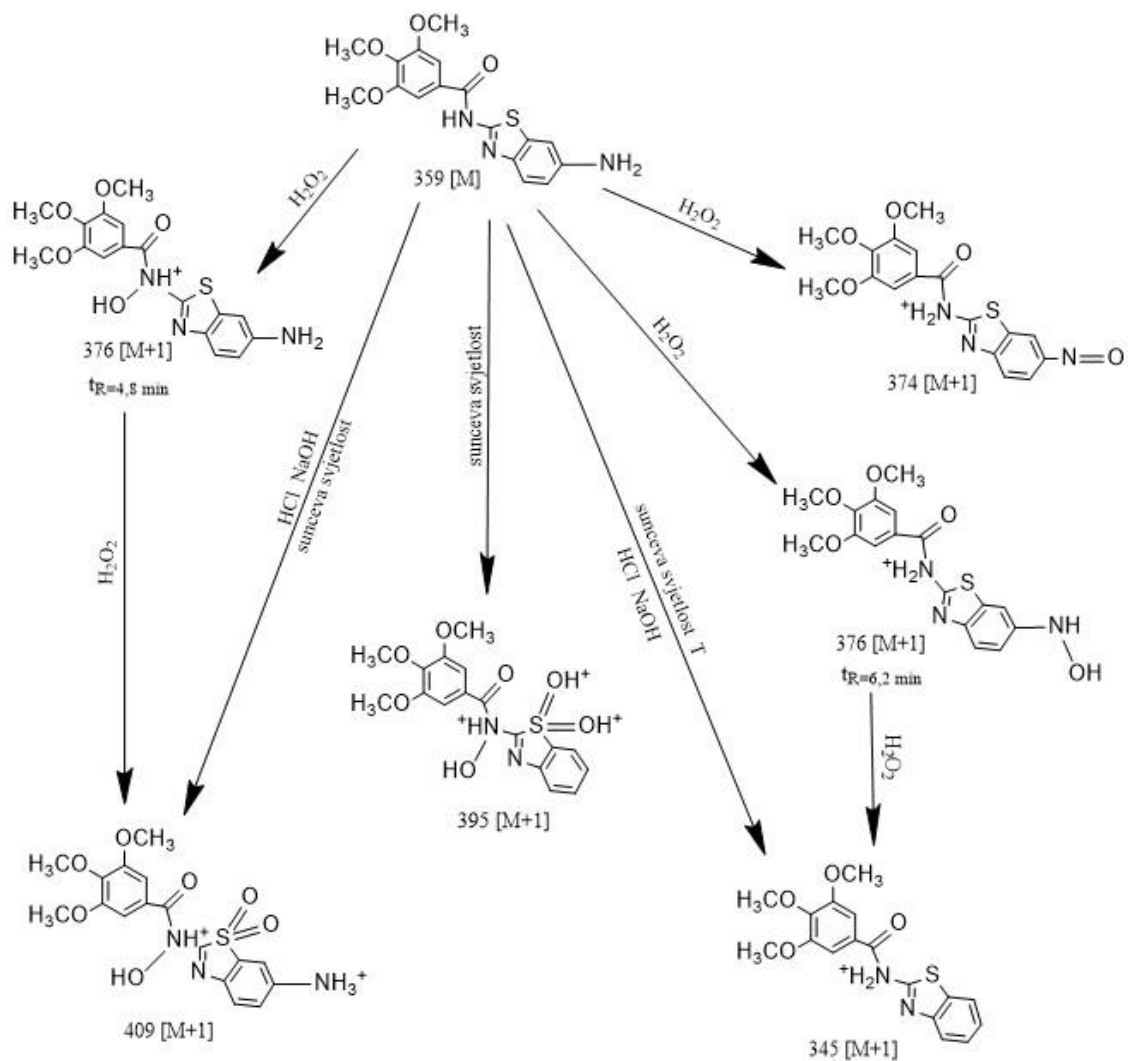
**Slika 4.1.e.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  396 vremena zadržavanja 7,288-7,334 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.1.f.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  374 vremena zadržavanja 8,315-8,452 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

Na osnovi fragmentacije 6 detektiranih razgradnih produkata DMP-1 odredila se njihova struktura i predložio razgradni put spoja DMP-1.





Slika 4.1.6. Predloženi razgradni put uzorka DMP-1

**Tablica 4.1.** Udio nastalih razgradnih produkata spoja DMP-1 po eksperimentima

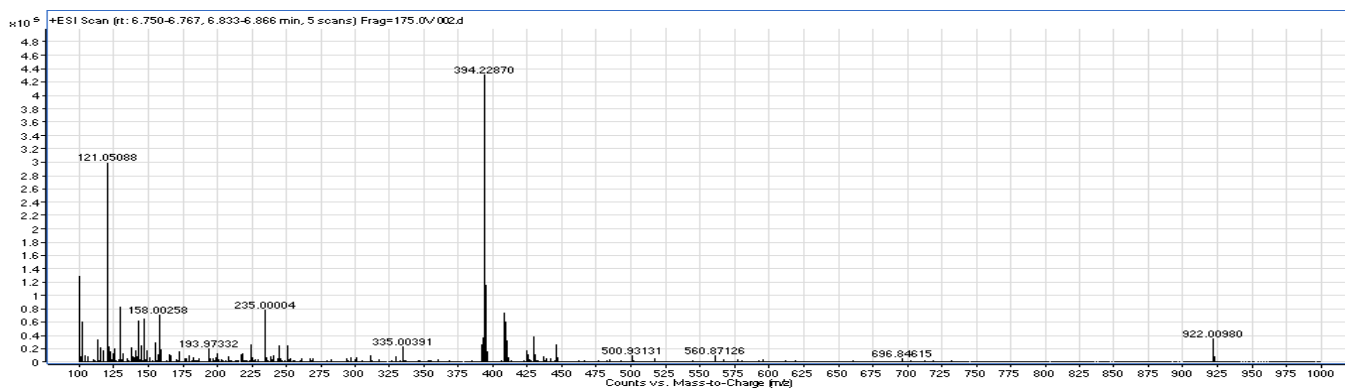
Razgradni produkti	Udio nastalih produkata u stres uvjetima, %				
	Oksidacija, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 %	Hidroliza, HCl	Hidroliza, NaOH	Fotoliza, UV/VIS	Termalna razgradnja
M:					
346	1,0	1,6	1,5	1,1	2,7
410	1,5	< 1,0	1,5	1,1	
376, <i>t<sub>R</sub></i> = 4,8 min	1,0				
376, <i>t<sub>R</sub></i> = 6,1 min	1,5				
396				1,1	
374	2,9				

Prilikom provedbe ispitivanja stabilnosti spoja DMP-1 nastalo je ukupno šest razgradnih produkata. Najviše njih, čak 5 (*m/z* 346, *m/z* 410, *m/z* 376 pri *t<sub>R</sub>*= 4,8 min, *m/z* 376 pri *t<sub>R</sub>*= 6,1 min i *m/z* 374) nastalo je prilikom izlaganja spoja oksidaciji 10 % vodikovim peroksidom. Prilikom oksidacije DMP-1 svaki od navedenih produkata nastao je u vrlo malom udjelu (do 1,5 %), uz izuzetak produkta *m/z* 374 koji je nastao u udjelu 2,9 %. Tijekom kisele i lužnate hidrolize nastala su dva ista razgradna produkta *m/z* 346 i *m/z* 410, prilikom čega je produkta *m/z* 346 više nastalo tijekom kisele hidrolize (1,6 %), a produkta *m/z* 410 tijekom lužnate hidrolize (1,5 %). Tijekom izlaganja spoja DMP-1 UV/VIS svjetlu nastala su tri razgradna produkta *m/z* 346, *m/z* 410 i *m/z* 396, sva u istom udjelu od 1,1 %, što pokazuje kako se prilikom izloženosti spoja DMP-1 svjetlu on ne razgrađuje intenzivno. Također, prilikom izlaganja DMP-1 termalnoj razgradnji pri 100 °C nastaje samo razgradni produkt *m/z* 346 u udjelu od 2,7 %, što je najveći udio razgradnog produkta u smjesi nastalog prilikom svih eksperimentalnih uvjeta kojima je spoj DMP-1 bio podvrgnut. Naposljetku, može se i primijetiti kako upravo razgradni produkt *m/z* 346 nastaje u gotovo svim provedenim eksperimentima, stoga je on glavni razgradni produkt spoja DMP-1.

Izlaganjem prisilnoj razgradnji spoja DMP-1 u svim ispitivanim uvjetima došlo je do pojave razgradnih produkata. Najveću osjetljivost spoj je pokazao na oksidaciju peroksidom, gdje se detektiralo 5 razgradnih produkata, s ukupnim udjelom u smjesi od 7,9 %. Iako oksidacijski produkti nastaju u najvećem udjelu, vidimo da se ni tad DMP-1 intenzivno ne razgrađuje jer se prilikom ovakvih ispitivanja prihvatljivim smatra od 5-20 % razgradnje.

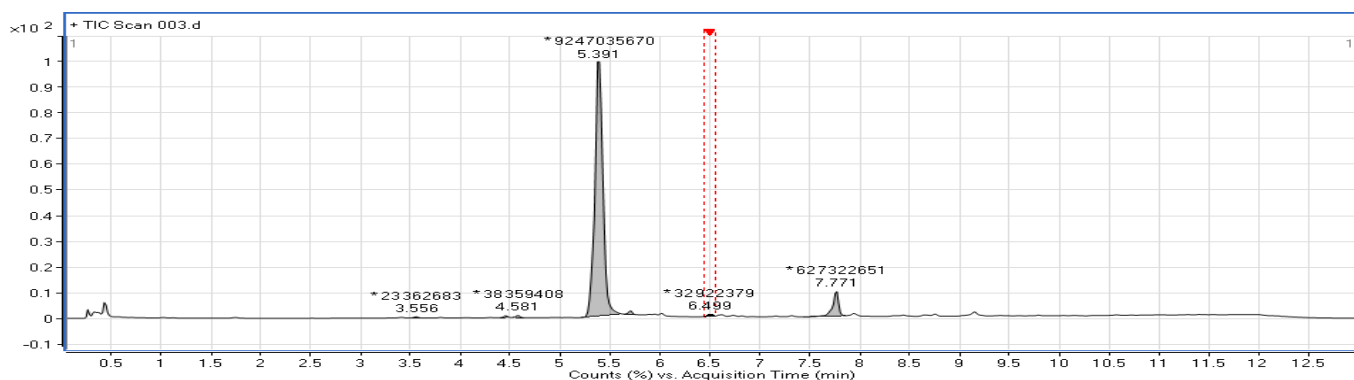
#### 4.1.2. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-2

Najprije je snimljen kromatogram nerazgrađenog spoja DMP-2, prikazan na Slici 4.2. Odabrani aktivni spoj DMP-2 na kromatogramu se pojavljuje na vremenu zadržavanja,  $t_R = 6,750-6,767$  min, dok se na vremenu zadržavanja  $t_R = 5,378-5,395$  min pojavljuje spoj DMP-1 koji je njegov primarni oblik, s obzirom na to da je DMP-2 njegova kloridna sol.

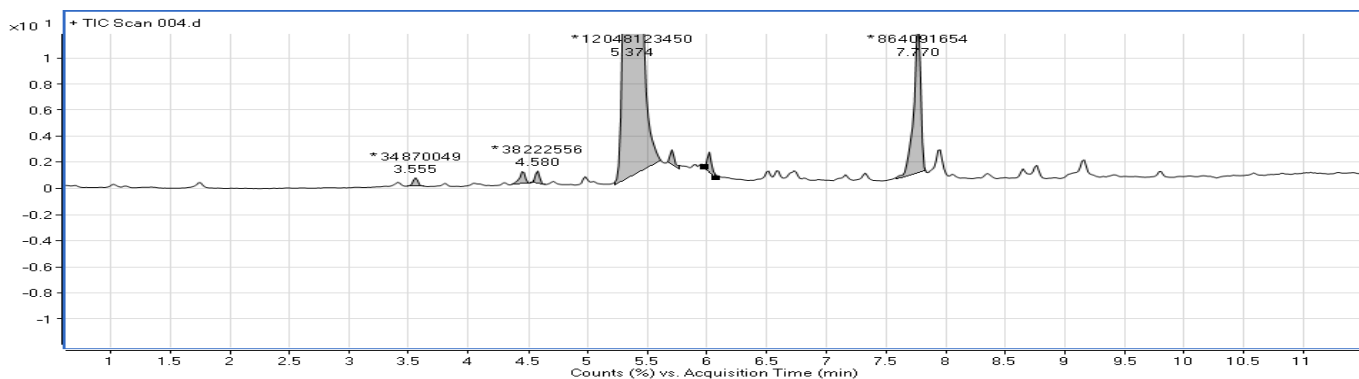


Slika 4.2. Kromatogram spoja DMP-2 s vremenom zadržavanja,  $t_R = 6,750-6,767$  min

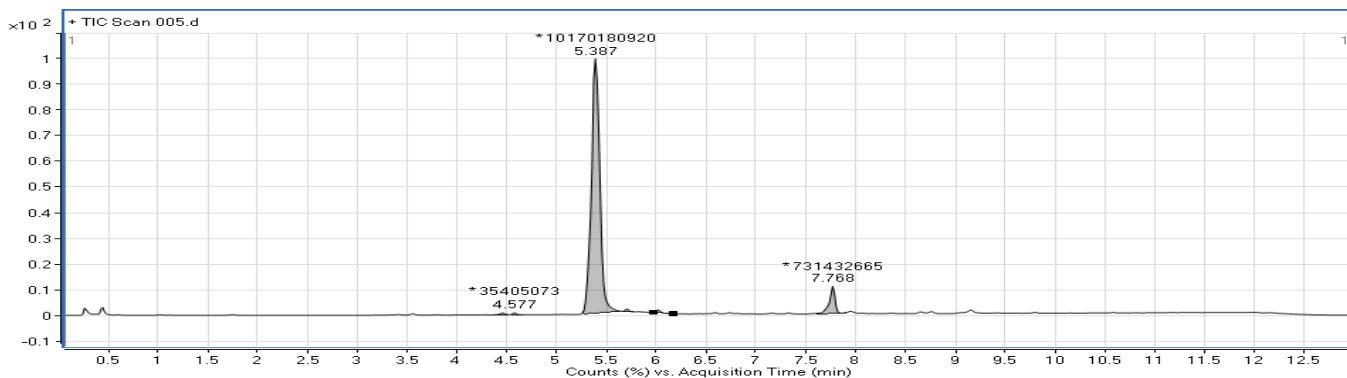
Zatim su snimljeni kromatogrami (Slika 4.2.1.-4.2.4.) uzoraka DMP-2 koji su bili podvrgnuti razgradnji u stres uvjetima ( $H_2O_2$ , HCl, NaOH, povišena temperatura i UV/VIS svjetlo).



Slika 4.2.1. Kromatogram DMP-2 u uvjetima oksidacije peroksidom (uvećani kromatogram)

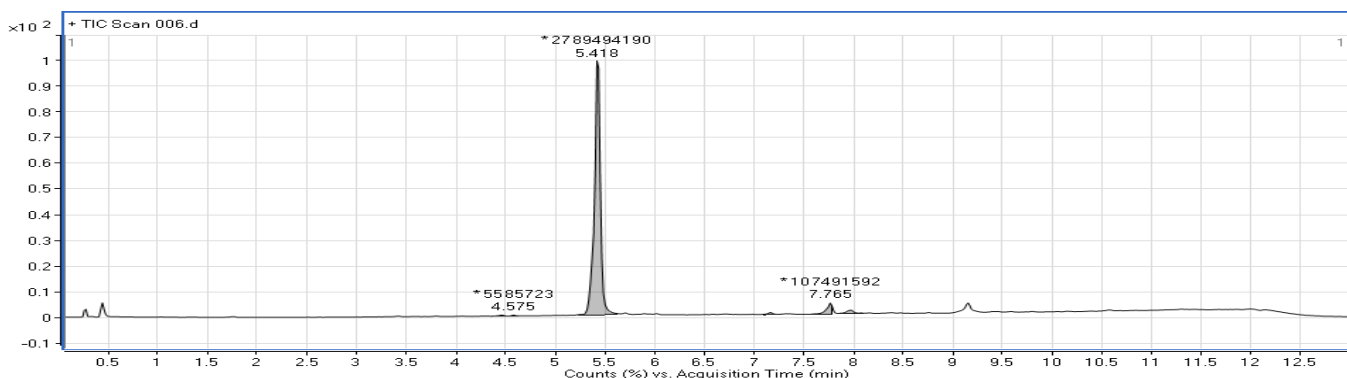


Slika 4.2.2. Kromatogram DMP-2 razgrađenog u 0,5 M HCl-a (kisela hidroliza)



**Slika 4.2.3.** Kromatogram DMP-2 razgrađenog u 0,5 M NaOH-a (lužnata hidroliza)

Usporedbom kromatograma u uvjetima kisele i lužnate hidrolize vidljivo je da se razgradni produkti pojavljuju u oba slučaja na istim vremenima zadržavanja. Također, u usporedbi s kromatogramom u uvjetima oksidacije peroksidom vidljivo je kako je prilikom hidrolize nastalo manje razgradnih produkata.

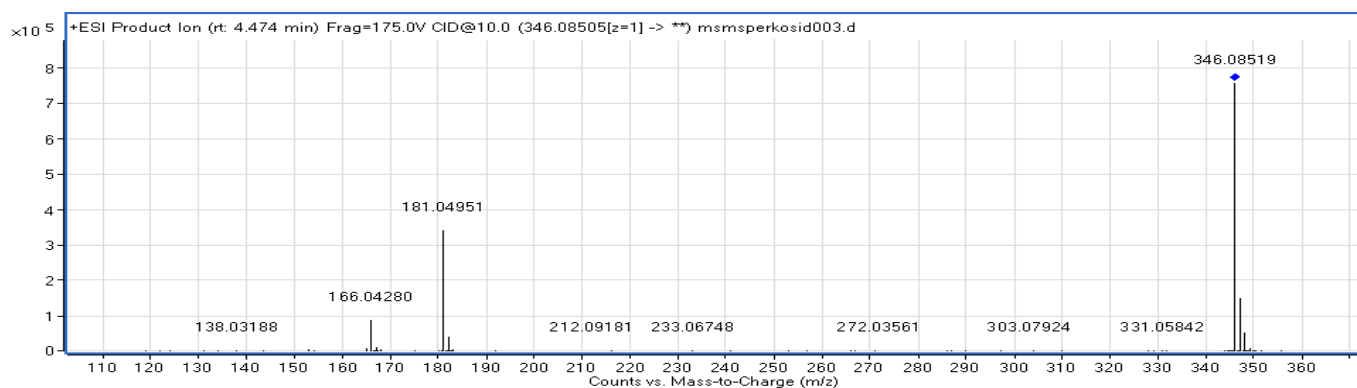


**Slika 4.2.4.** Kromatogram DMP-2 izloženog temperaturi od 100 °C

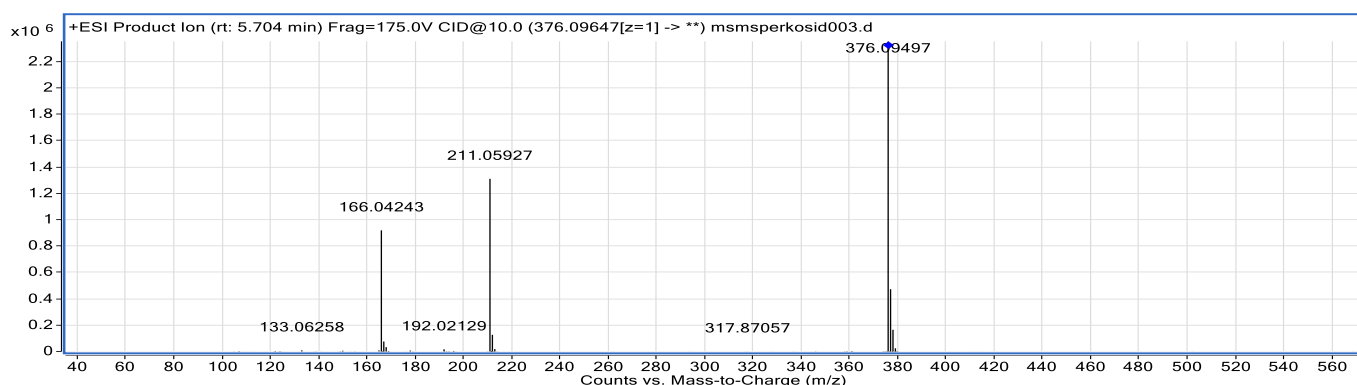
Na Slici 4.2.4. prikazan je kromatogram krutine spoja DMP-2 koja se izložila temperaturi u sušioniku pri temperaturi od 100 °C te potom otapala i slala dalje na analizu. Pri toj termalnoj razgradnji identificirao se jedan razgradni produkt. S druge strane otopina soli DMP-2 izložena temperaturi od 80 °C u vodenoj kupelji je iskristalizirala, kao i u slučaju ispitivanog spoja DMP-1. To odgovara, budući da je DMP-2 kloridna sol spoja DMP-1 koja se u konačnici u ovom eksperimentu ponaša identično uz nekakve minimalne razlike.

Nakon provedenih eksperimenata i snimanja kromatograma, utvrdilo se da se u uvjetima prisilne razgradnje spoja DMP-2 pojavljuje ukupno 6 razgradnih produkata. Prilikom oksidacije s 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detektiralo njih troje  $m/z$  346,  $m/z$  376 i  $m/z$  429 te prilikom izlaganja uzorka UV/VIS fotolizi također je došlo do nastanka tri  $m/z$  346,  $m/z$  410 i  $m/z$  396 razgradna produkta. Prilikom termalne razgradnje kao i prilikom hidrolize u lužnatim uvjetima pojavio se samo jedan razgradni produkti  $m/z$  346 koji je ujedno jednak onom kod oksidacije i UV/VIS razgradnje, a u kiselim uvjetima uz već detektirani  $m/z$  346, došlo je do pojave još jednog novog razgradnog produkta  $m/z$  374. U uvjetima razgradnje pod utjecajem svjetlosti pojavili su se potpuno identični razgradni produkti onima dobivenim za spoj DMP-1 prethodno prikazanim na kromatogramu (Slika 4.1.5.).

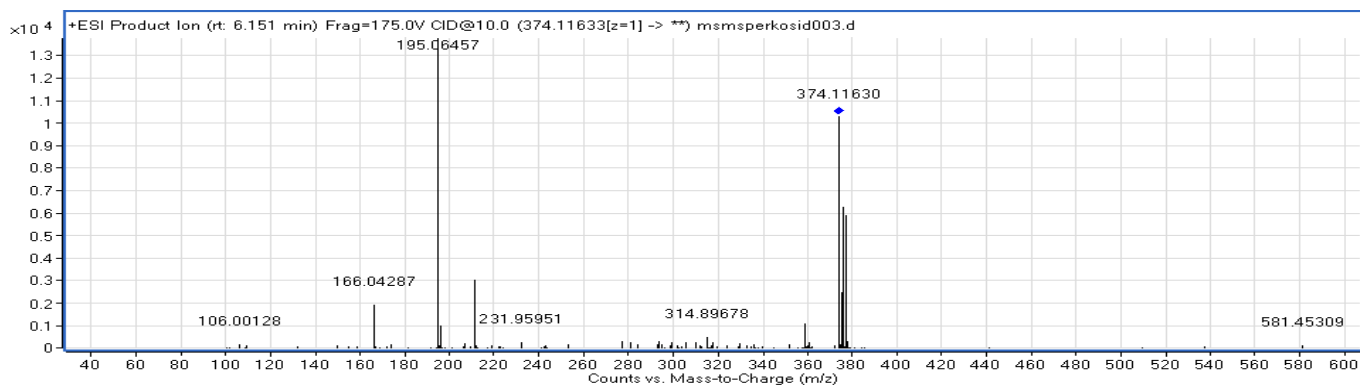
U narednim Slikama 4.2.a.-4.2.e. prikazani su kromatogrami fragmentiranih detektiranih razgradnih produkata.



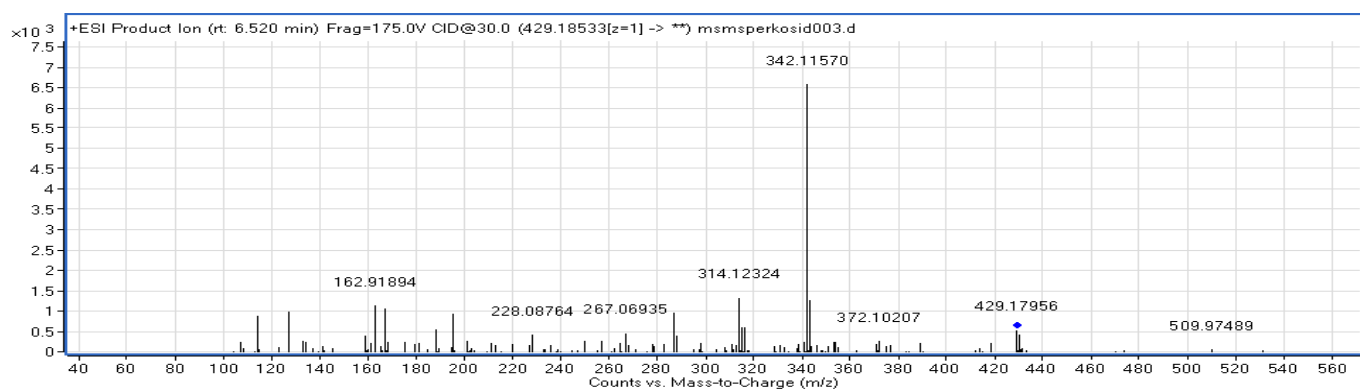
**Slika 4.2.a.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  346, vremena zadržavanja 4,474 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



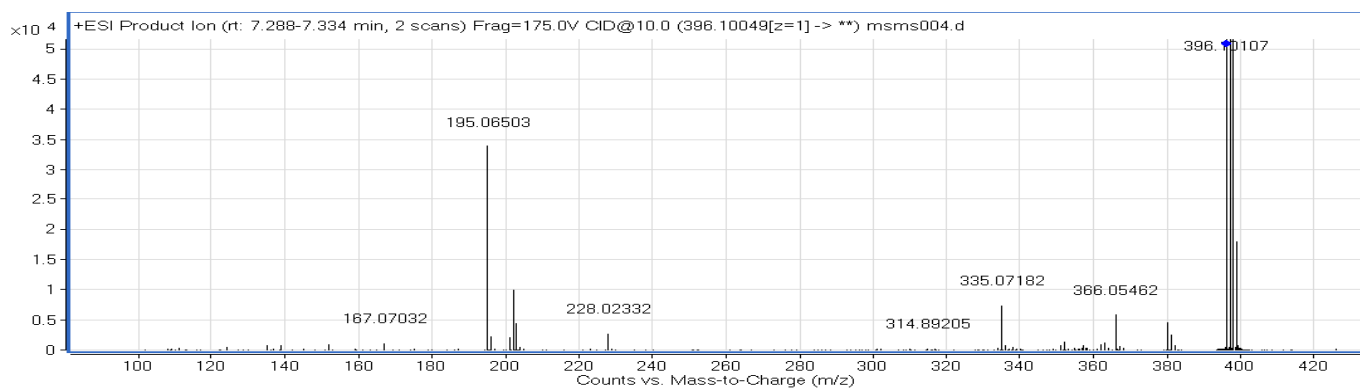
**Slika 4.2.b.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  376, vremena zadržavanja 5,704 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.2.c.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  374, vremena zadržavanja 6,151 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

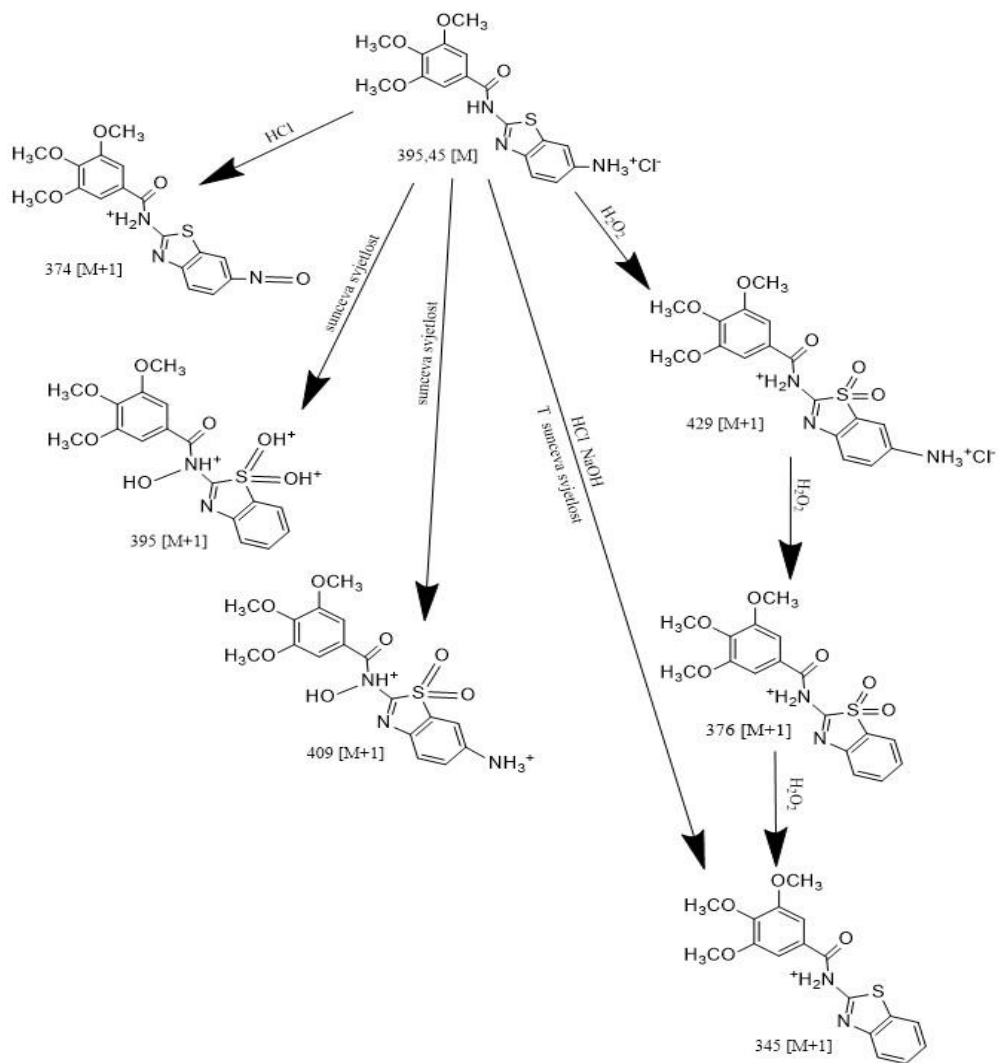


**Slika 4.2.d.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  429, vremena zadržavanja 6,520 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.2.e.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  396, vremena zadržavanja 7,340 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

Na osnovi fragmentacije 6 detektiranih razgradnih produkata DMP-2 odredila se njihova struktura i predložio razgradni put spoja DMP-2.



Slika 4.2.5. Predloženi razgradni put uzorka DMP-2

**Tablica 4.2.** Udio nastalih razgradnih produkata spoja DMP-2 po eksperimentima

Razgradni produkti	Udio nastalih produkata u stres uvjetima, %				
	M:	Oksidacija, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 %	Hidroliza, HCl	Hidroliza, NaOH	Fotoliza, UV/VIS
346	1,0	1,6	1,3	1,1	2,7
410				1,1	
374		1,4			
376	1,0				
396				1,1	
429	1,0				

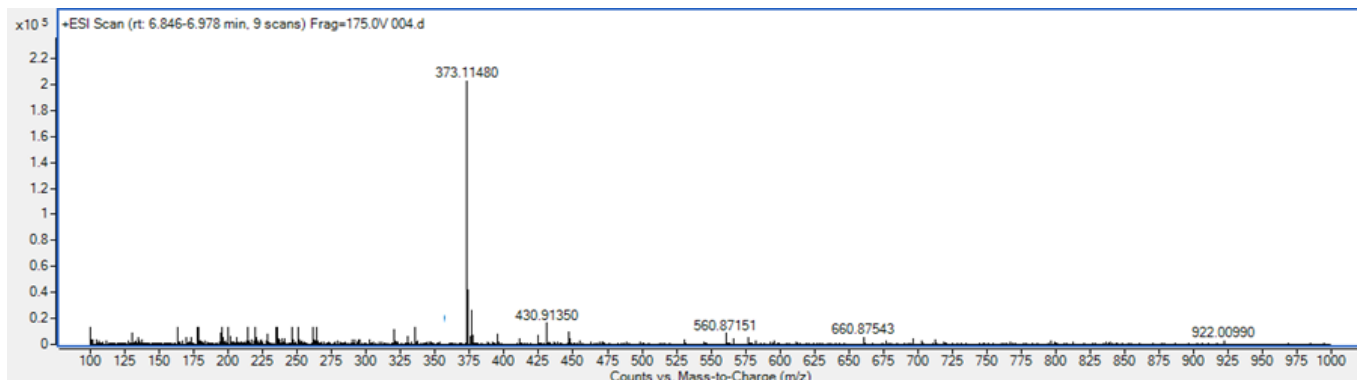
Eksperimentom je utvrđeno da prisilnom razgradnjom spoja DMP-2 ukupno nastaje 6 razgradnih produkata. Najviše njih, čak po tri nastaje prilikom oksidacije peroksidom i izlaganjem spoja UV/VIS svjetlu. Na osnovu detektiranih razgradnih produkata te uspoređivanjem njihovih intenziteta s intenzitetom ispitivanog spoja DMP-2 pri različitim eksperimentalnim uvjetima utvrđeno je da niti jedan razgradni produkt ne nastaje u nekom velikom udjelu u smjesi. U najvećem udjelu (2,7 %) pojavljuje se razgradni produkt  $m/z$  346 i to prilikom izlaganja DMP-2 spoja termalnoj razgradnji. Takvi rezultati idu u prilog stabilnosti ispitivanog spoja DMP-2.

Vidimo da se u svim eksperimentalnim uvjetima kojima su se podvrgnuli spojevi DMP-1 i DMP-2 pojavio isti razgradni produkt  $m/z$  346, koji je u oba slučaja glavni razgradni produkt. On se u svim smjesama pojavio u gotovo istom udjelu, osim kod lužnate hidrolize, gdje se u udjelu za 0,2 % manjem pojavio kod razgradnje spoja DMP-2. Također, uz već spomenuti  $m/z$  346 tijekom izlaganja spojeva DMP-1 i DMP-2 UV/VIS svjetlu nastala su još dva ista razgradna produkta  $m/z$  396 i  $m/z$  410. Iz navedenog se može vidjeti kako razgradi put amidnih derivata benzotiazola, odnosno spojeva DMP-1 i DMP-2, ima sličnosti. Međutim, uočene su i neke manje, ali važne razlike kod izlaganja spojeva oksidaciji peroksidom, gdje kod spoja DMP-2 nastaje produkt  $m/z$  376, različit od razgradnih produkata detektiranih kod spoja DMP-1 i uz koji nastaje još jedan novi razgradni produkt  $m/z$  429. Spomenuta razlika izravna je posljedica molekulske strukture, zato što je DMP-2 kloridna sol spoja DMP-1.



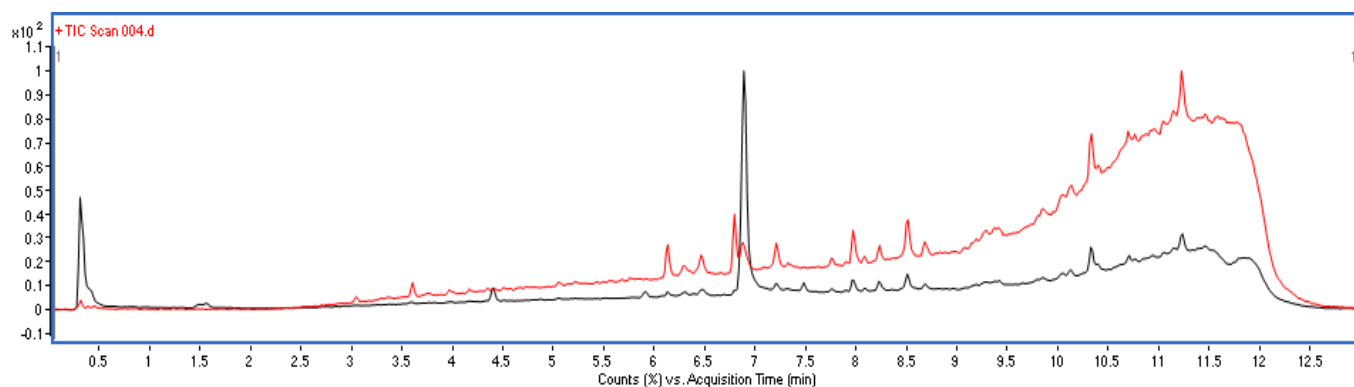
### 4.1.3. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-3

Odabrani aktivni spoj DMP-3 na kromatogramu se pojavljuje na vremenu zadržavanja,  $t_R = 4,326$  min. Kromatogram je prikazan na Slici 4.3.

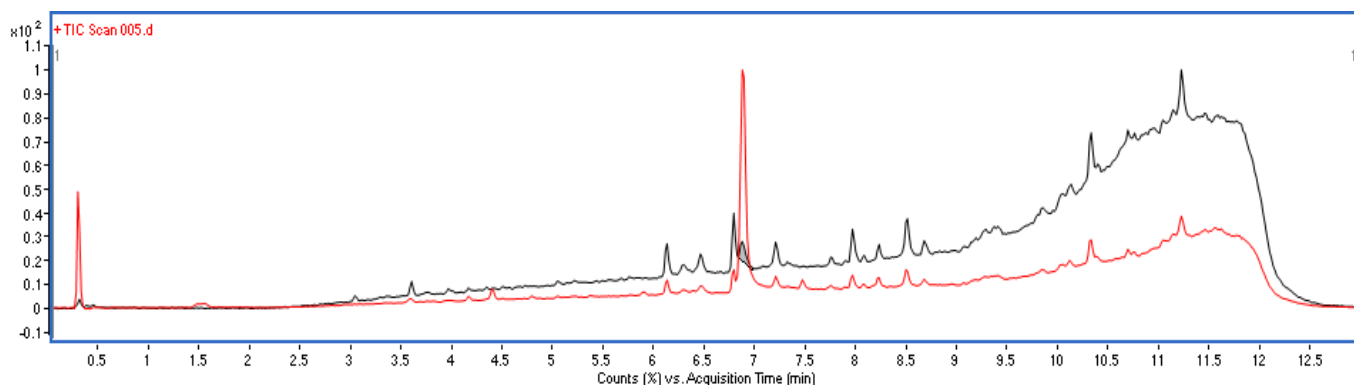


**Slika 4.3.** Kromatogram spoja DMP-3 s vremenom zadržavanja,  $t_R = 4,326$  min

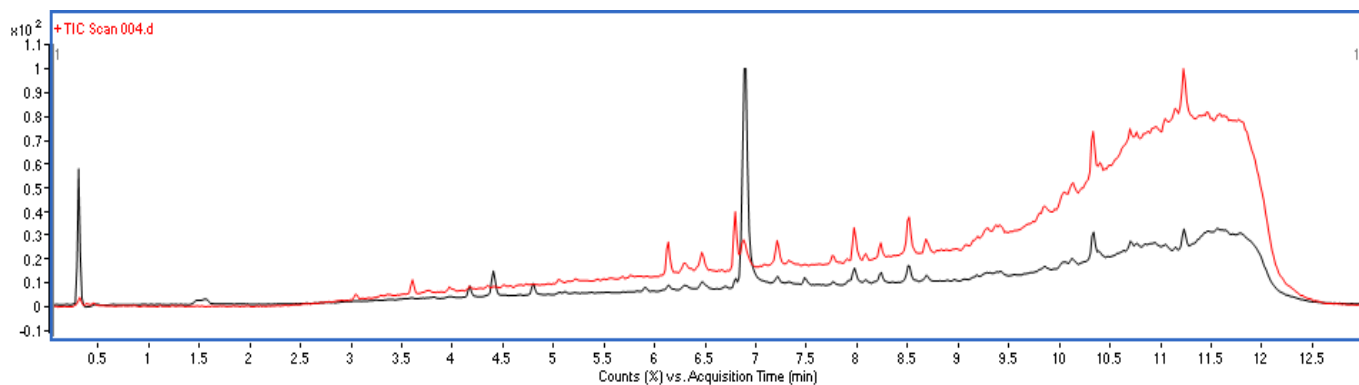
Zatim su snimljeni kromatogrami uzoraka koji su bili podvrgnuti stres uvjetima, gdje je uočeno da prilikom oksidacije peroksidom nastaju razgradni produkti kao i tijekom kisele i lužnate hidrolize, iako u manjem broju.



**Slika 4.3.1.** Kromatogram DMP-3 u uvjetima oksidacije peroksidom (uvećani kromatogram)

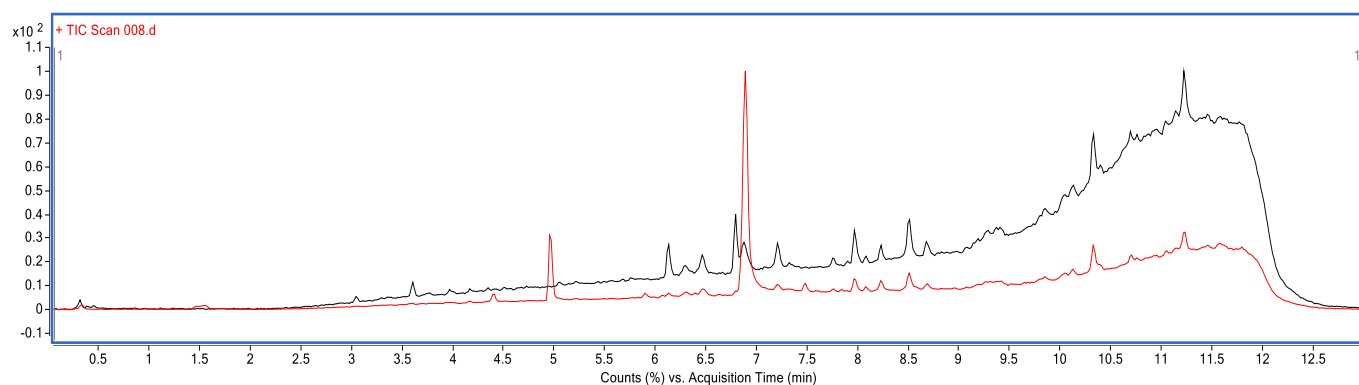


**Slika 4.3.2.** Kromatogram DMP-3 razgrađenog u 0,5 M HCl-a (kisele hidroliza)



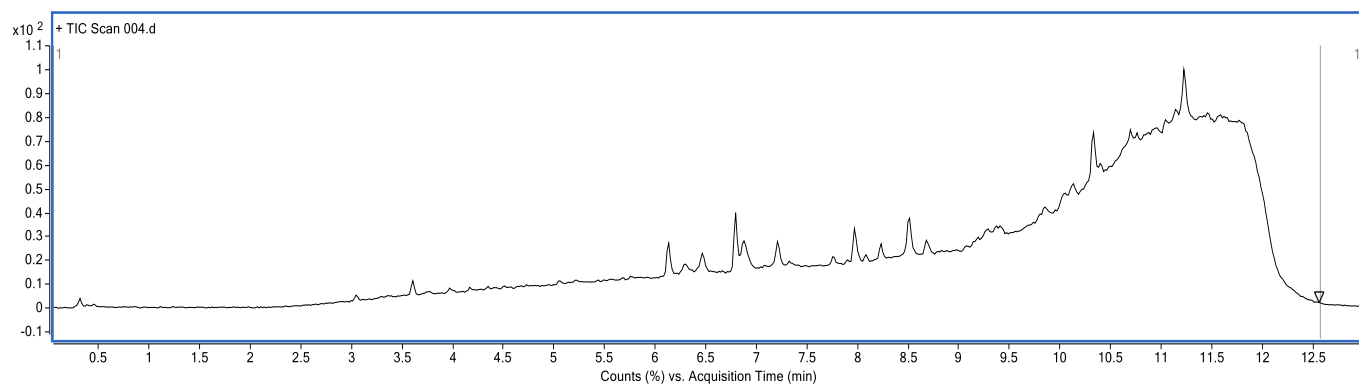
**Slika 4.3.3.** Kromatogram DMP-3 razgrađenog u 0,5 M NaOH-a (lužnata hidroliza)

Usporedbom kromatograma u uvjetima kisele i lužnate hidrolize vidljivo je da se u oba slučaja na istim vremenima zadržavanja pojavljuju razgradni produkti. Najveći pik pojavljuje se na 4,5 min, a masa mu je jednaka i pri kiseljoj hidrolizi.



**Slika 4.3.4.** Kromatogram DMP-3 izloženog temperaturi od 100 °C

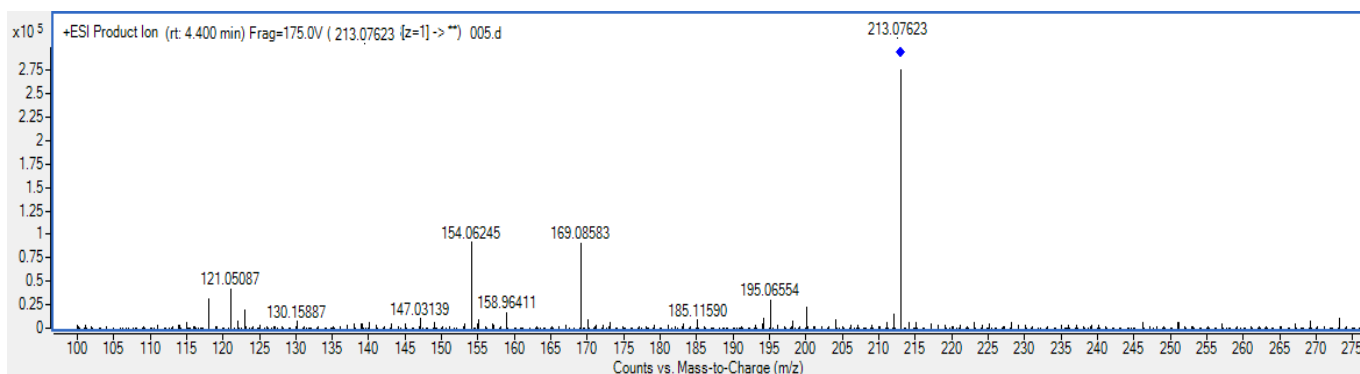
Slika 4.3.4. prikazuje uzorak spoja DMP-3 koji se u krutom stanju izložio u sušioniku temperaturi od 100 °C, prilikom čega je došlo do njegove termalne razgradnje i identifikacije jednog razgradnog produkta. Međutim, prilikom izlaganja otopine spoja DMP-3 temperaturi od 80 °C u vodenoj kupelji, kao i u slučaju drugih ispitivanih spojeva, ona je iskristalizirala.



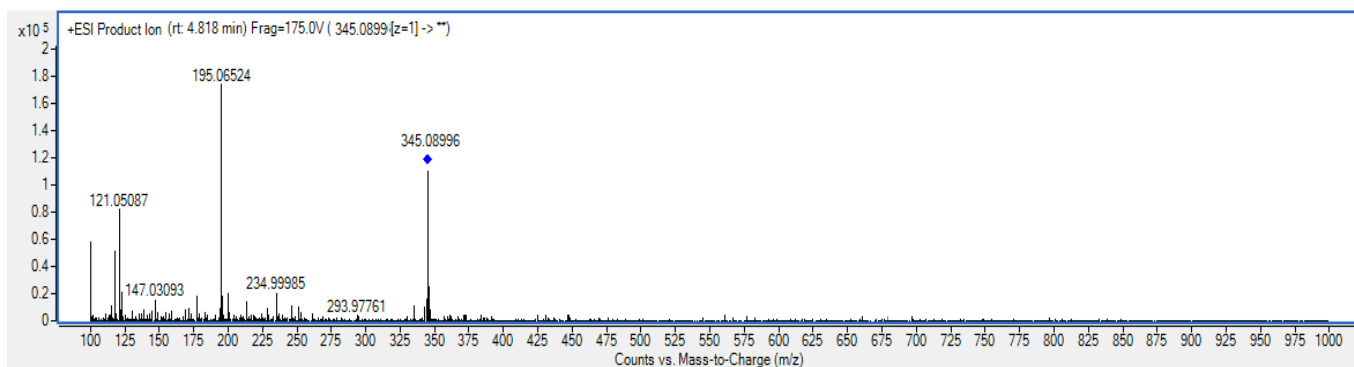
**Slika 4.3.5.** Kromatogram DMP-3 izloženog fotolizi UV/VIS (500 Wh/m<sup>2</sup>)

Nakon snimanja svih provedenih eksperimenata, utvrđeno je da se u uvjetima forsirane razgradnje DMP-3 pojavljuje ukupno 4 razgradna produkta. Po 2 razgradna produkta, iako različita pojavljuju se tijekom hidrolize u kiselim ( $m/z$  213 i  $m/z$  387) i lužnatim uvjetima ( $m/z$  213 i  $m/z$  345). U uvjetima termalne razgradnje ( $m/z$  360) i tijekom oksidacije s 10 %  $H_2O_2$  ( $m/z$  213) pojavljuje se samo jedan razgradni produkt. Prilikom izlaganja uzorka DMP-3 fotolizi pod UV/VIS ( $500 Wh/m^2$ ) lampom nije došlo do nastanka razgradnih produkata.

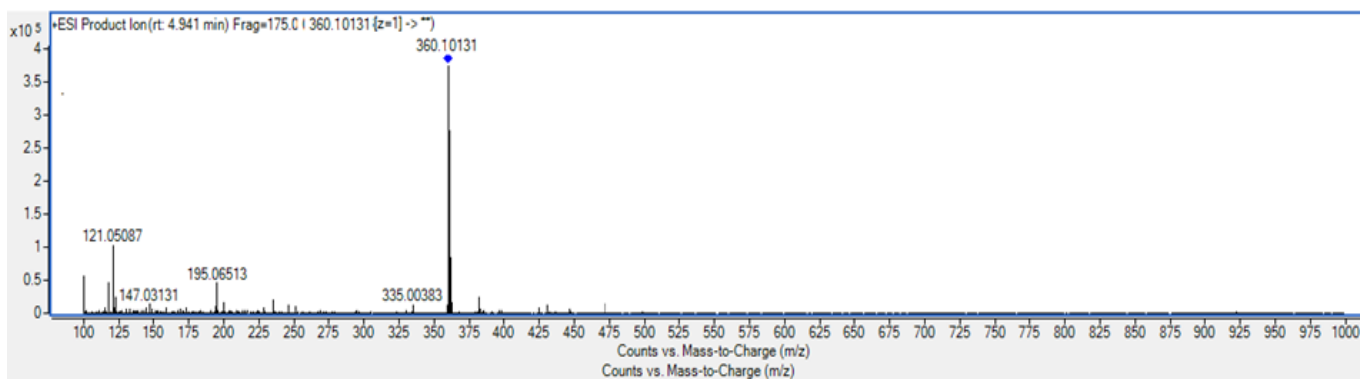
Na Slikama 4.3.a.-4.3.d. prikazani su kromatogrami fragmentiranih detektiranih razgradnih produkata.



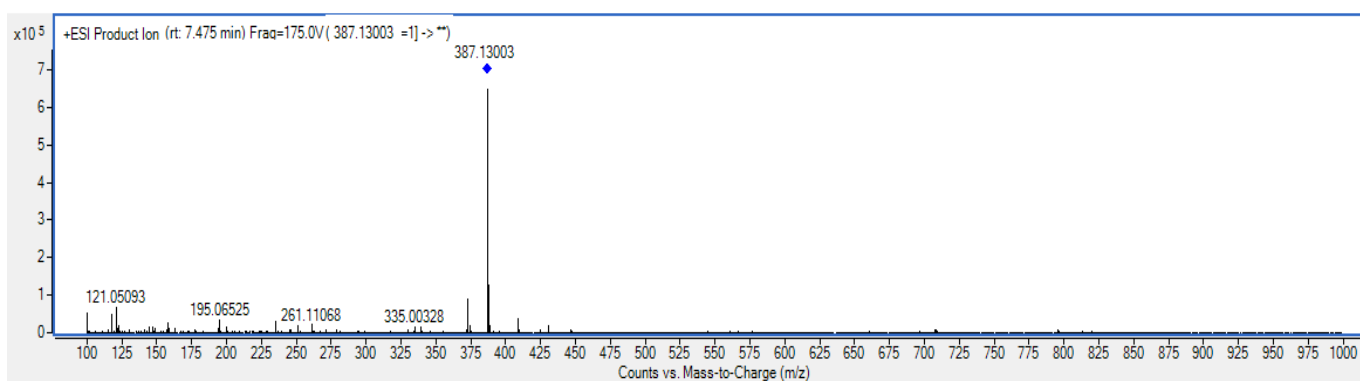
**Slika 4.3.a.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  213, vremena zadržavanja 4,400 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.3.b.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  345, vremena zadržavanja 4,818 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

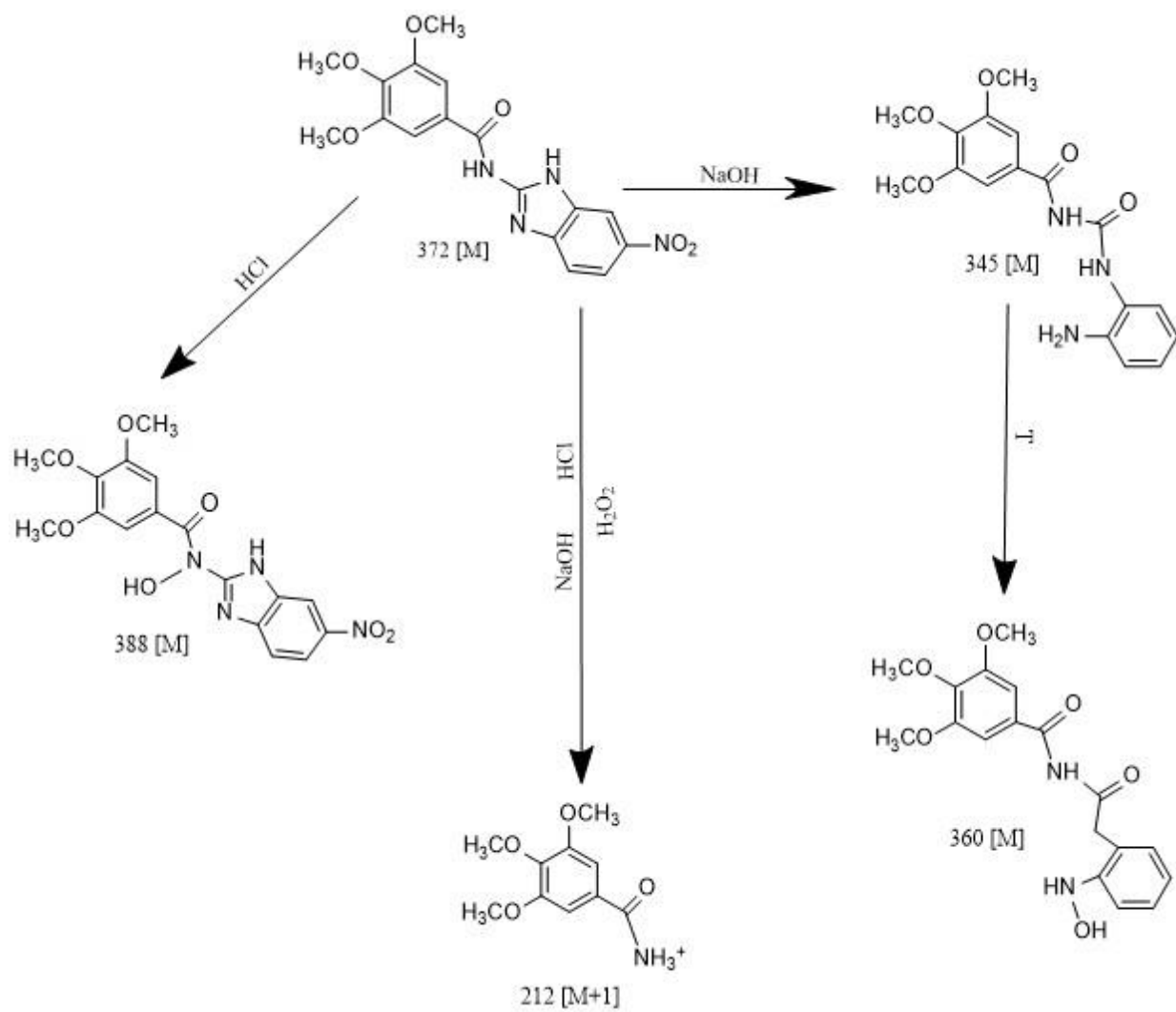


**Slika 4.3.c.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  360, vremena zadržavanja 4,974 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.3.d.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  387, vremena zadržavanja 7,475 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

Na osnovi fragmentacije 4 razgradna produkta DMP-3 odredila se struktura svakoga od njih te se predložio razgradni put DMP-3 spoja.



Slika 4.3.6. Predloženi razgradni put uzorka DMP-3

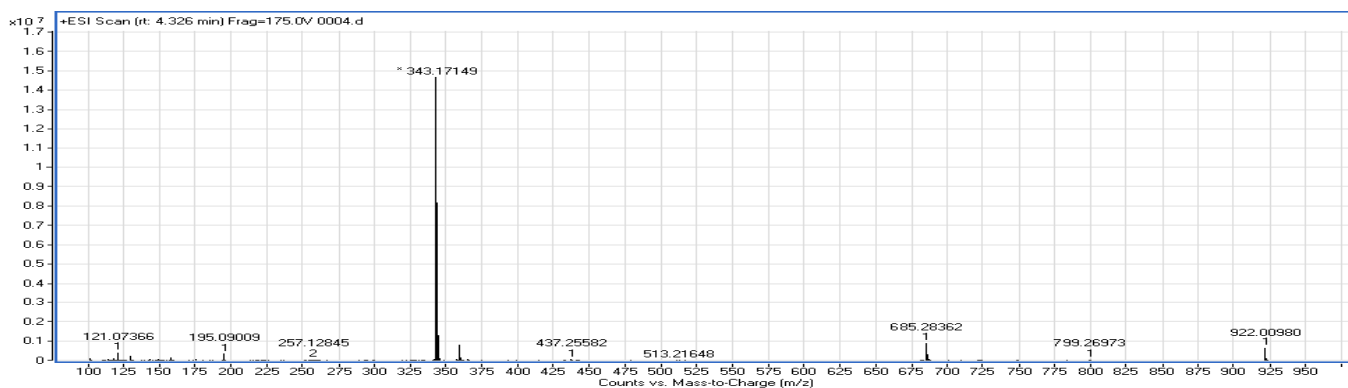
**Tablica 4.3.** Udio nastalih razgradnih produkata spoja DMP-3 po eksperimentima

Razgradni produkti	Udio nastalih produkata u stres uvjetima, %				
	Oksidacija, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 %	Hidroliza, HCl	Hidroliza, NaOH	Fotoliza, UV/VIS	Termalna razgradnja
M:					
213	5,9	3,1	7,4		
387		3,1			
345			3,1		
360					33,0

Analizom je prikazano kako izlaganjem spoja DMP-3 stres uvjetima dolazi do pojave ukupno četiri razgradna produkta. Vidimo kako prilikom oksidacije vodikovim peroksidom nije došlo do značajnije razgradnje spoja DMP-3 te je nastao samo jedan razgradni produkt,  $m/z$  213 u udjelu od 5,9 %. Tijekom izloženosti kiseloj i lužnatoj hidrolizi došlo je do nastanka po dva razgradna produkta. U kiselim uvjetima nastali su produkti  $m/z$  213 i  $m/z$  387, istih udjela u smjesi od 3,1 %. S druge strane, u lužnatim uvjetima DMP-3 više se razgradio te je nastalo 7,4 % produkta  $m/z$  213 i 3,1 % produkta  $m/z$  345, ali i dalje tek oko 10 % ukupne razgradnje koja je dozvoljena prilikom izlaganja male farmaceutske molekule ovakvim uvjetima stres ispitivanja. Produkt  $m/z$  360 nastao je pri izloženosti DMP-3 temperaturi od 100 °C u udjelu od 33,0 %, što ukazuje na intenzivniju razgradnju ispitivanog spoja pri povišenoj temperaturi, dok s druge strane prilikom izlaganja spoja UV/VIS (500 Wh/m<sup>2</sup>) svjetlu nije došlo do njegove razgradnje, što ukazuje na veliku stabilnost DMP-3 pri tim uvjetima. Izuzev termalne razgradnje, ispitivani spoj je pokazao veliku stabilnost pri ostalim eksperimentalnim uvjetima.

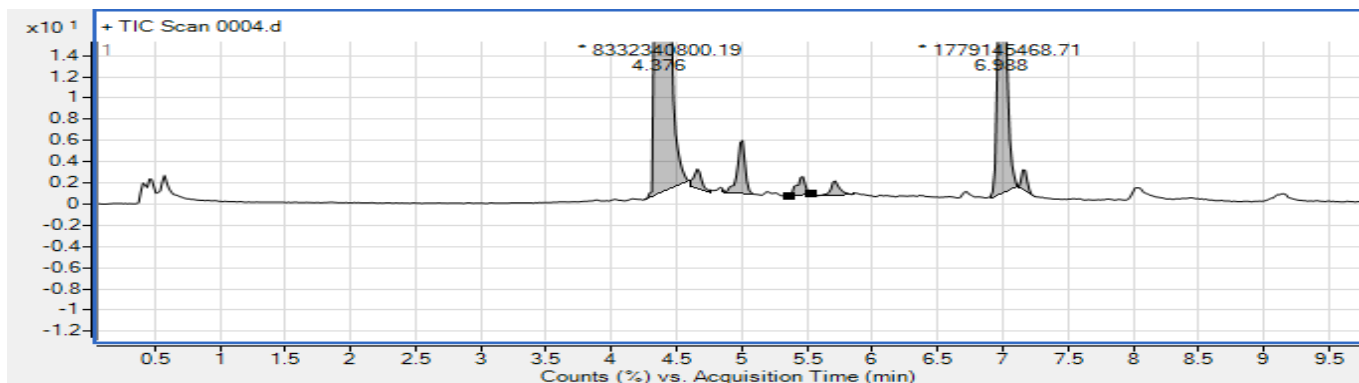
#### 4.1.4. Identifikacija razgradnih produkata spoja DMP-4

Najprije je snimljen kromatogram nerazgrađenog spoja DMP-4, prikazan na Slici 4.4. Na prikazanom kromatogramu glavni pik koji odgovara spoju DMP-4, ima vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) od 4,326 minute.

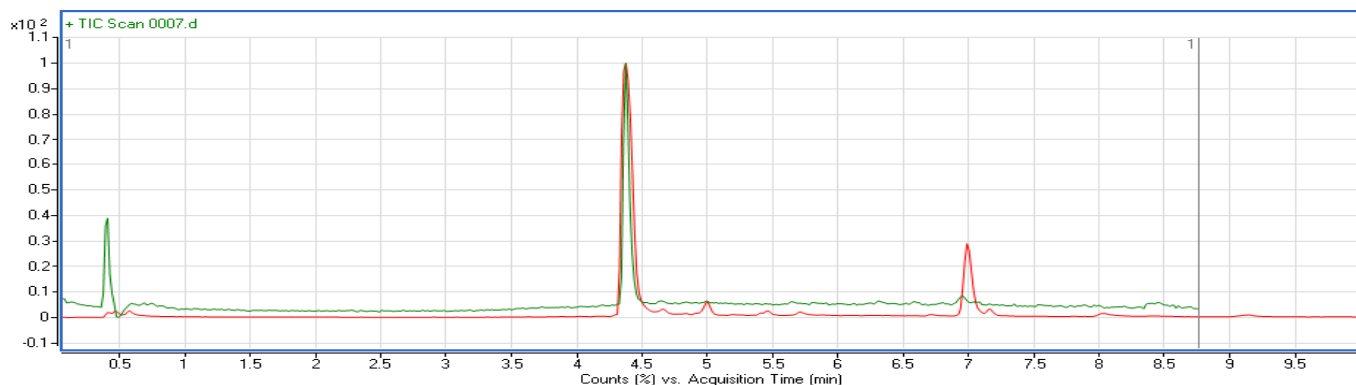


Slika 4.4. Kromatogram spoja DMP-4 s vremenom zadržavanja,  $t_R = 4,326$  min

Zatim su snimljeni kromatogrami uzoraka DMP-4 koji su bili podvrgnuti razgradnji  $H_2O_2$ , HCl i NaOH.

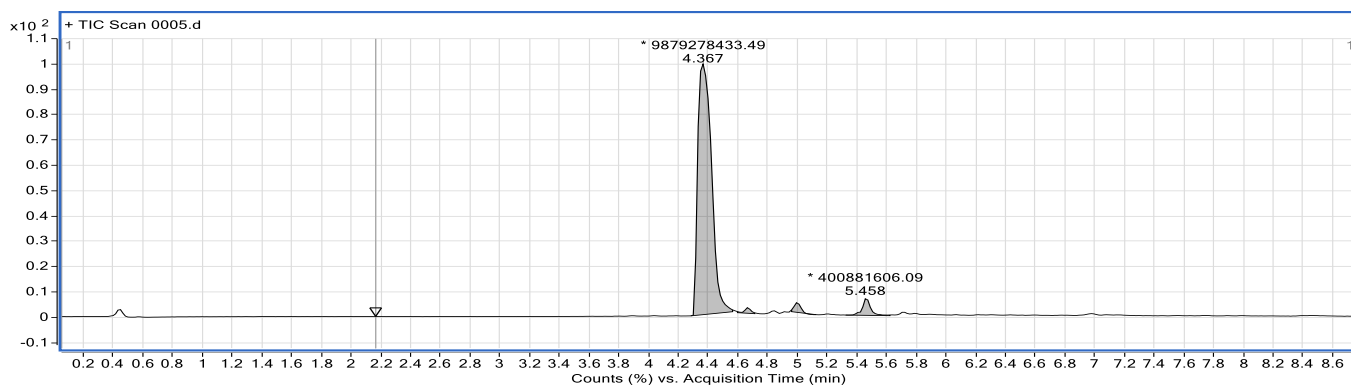


Slika 4.4.1.a. Kromatogram DMP-4 u uvjetima oksidacije peroksidom (uvećani kromatogram)

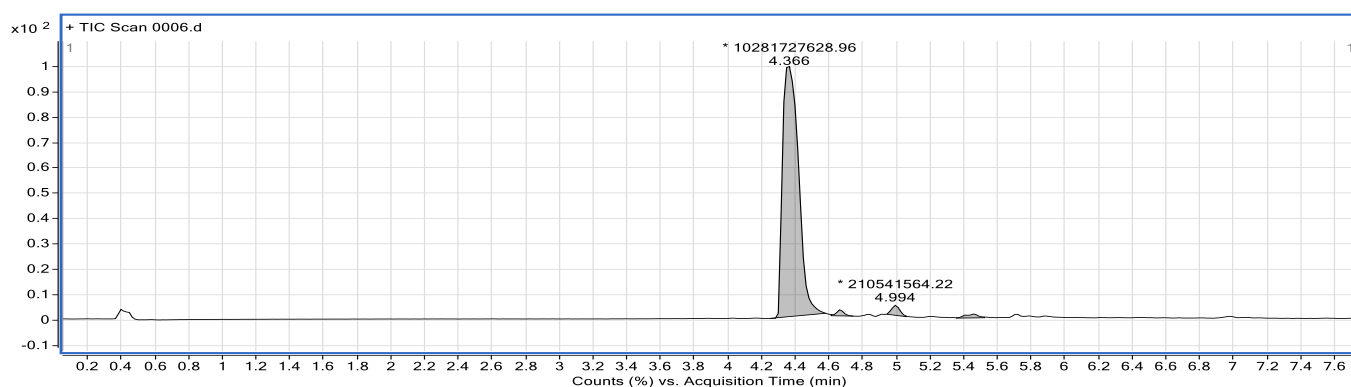


Slika 4.4.1.b. Kromatogram–preklapanje standardne otopine DMP-4 koncentracije 1 mg/L s kromatogramom DMP-4 nakon provedene oksidacije peroksidom

Zeleno označeno je kromatogram standardne otopine DMP-4 ne tretiranim nikakvim reagensima, dok crveni kromatogram predstavlja standardnu otopinu DMP-4 nakon njene oksidacije s otopinom 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ovako preklopljeni kromatogrami potvrđuju da su nakon oksidacije otopine DMP-4 nastali razgradni produkti.



**Slika 4.4.2.** Kromatogram DMP-4 razgrađenog u 0,5 M HCl-a (kisela hidroliza)



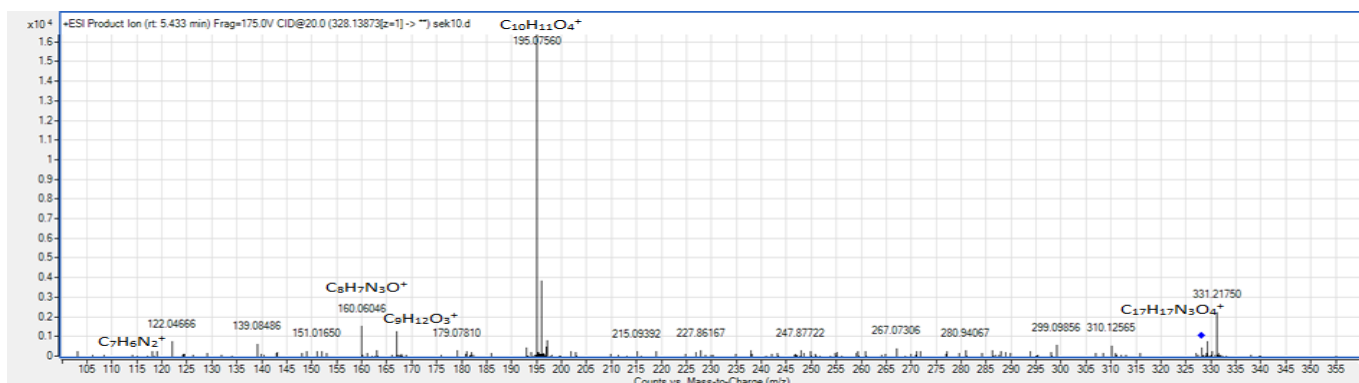
**Slika 4.4.3.** Kromatogram DMP-4 razgrađenog u 0,5 M NaOH-a (lužnata hidroliza)

Nakon provedbe eksperimenata i snimanja kromatograma, utvrđeno je da se u uvjetima forsirane razgradnje DMP-4 pojavljuje 5 razgradnih produkata ( $m/z$  359,  $m/z$  372,  $m/z$  328,  $m/z$  377 i  $m/z$  357) prilikom oksidacije s 10 %-tnim vodikovim peroksidom. Od tih 5 produkata, 3 ista se pojavljuju kod hidrolize u kiselim i lužnatim uvjetima ( $m/z$  359,  $m/z$  372 i  $m/z$  328). Prilikom izlaganja uzorka fotolizi kao i termalnoj razgradnji nije se zamijetila razgradnja ispitivanog DMP-4 i nije došlo do pojave razgradnih produkata.

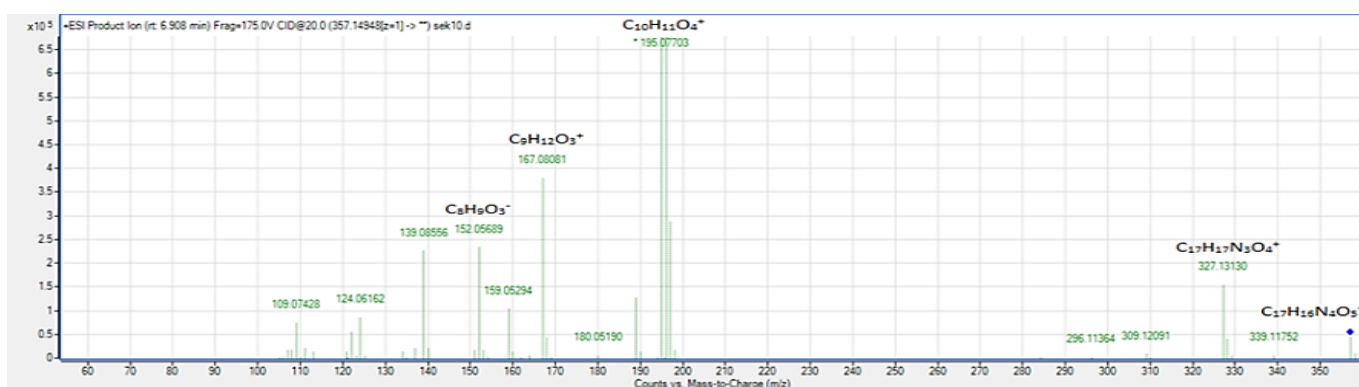
Za tih 5 razgradnih produkata, napravljena je fragmentacija s ciljem identificiranja njihove strukture.



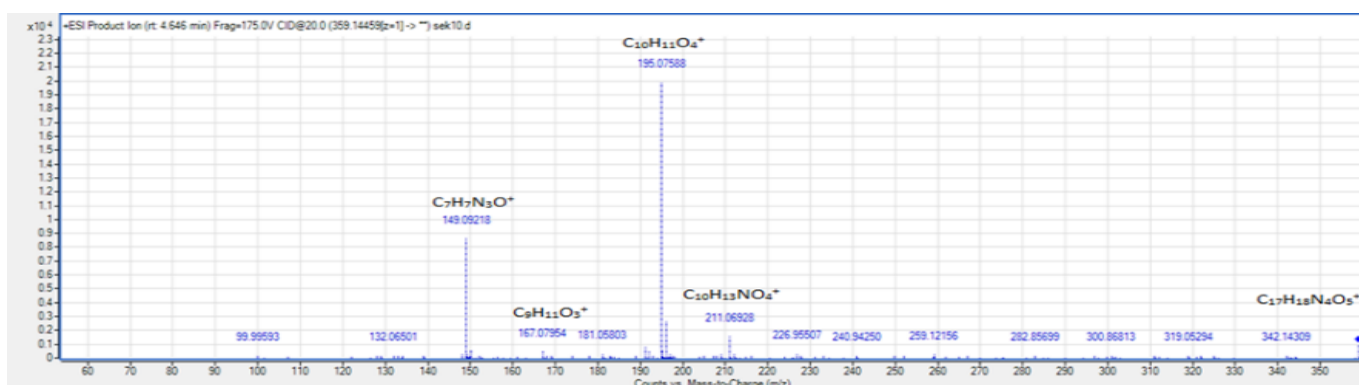
U narednim Slikama 4.4.a.-4.4.e. prikazani su kromatogrami fragmentiranih detektiranih razgradnih produkata.



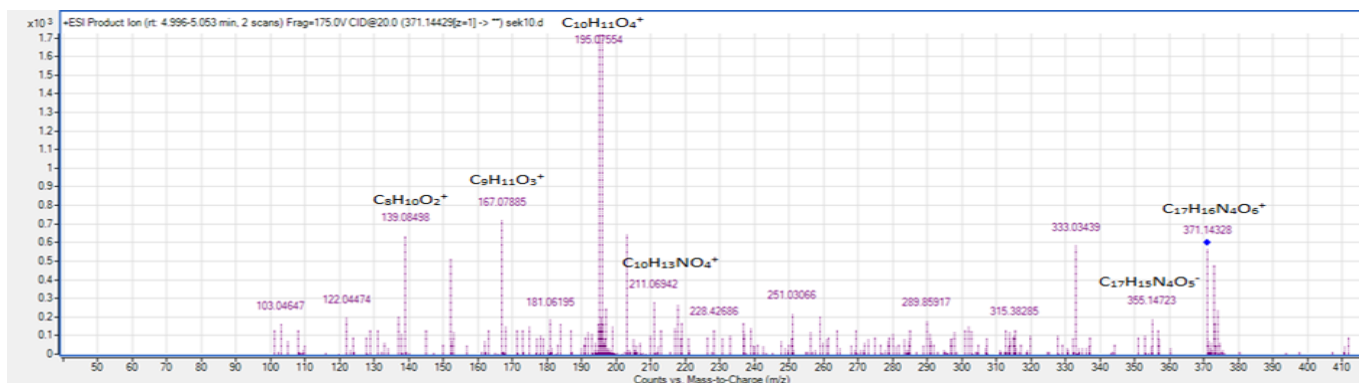
**Slika 4.4.a.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  328, vremena zadržavanja 5,433 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



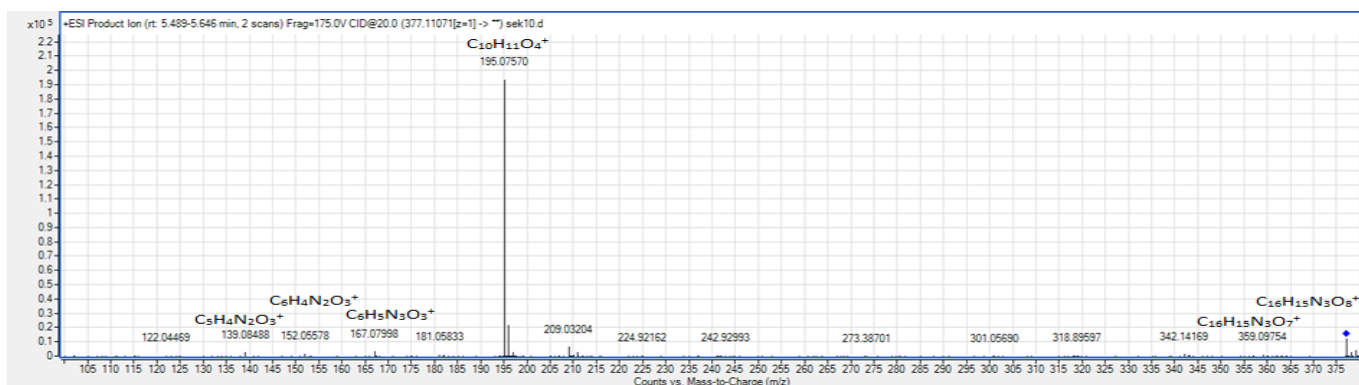
**Slika 4.4.b.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  357, vremena zadržavanja 6,908 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



**Slika 4.4.c.** MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  359, vremena zadržavanja 4,646 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

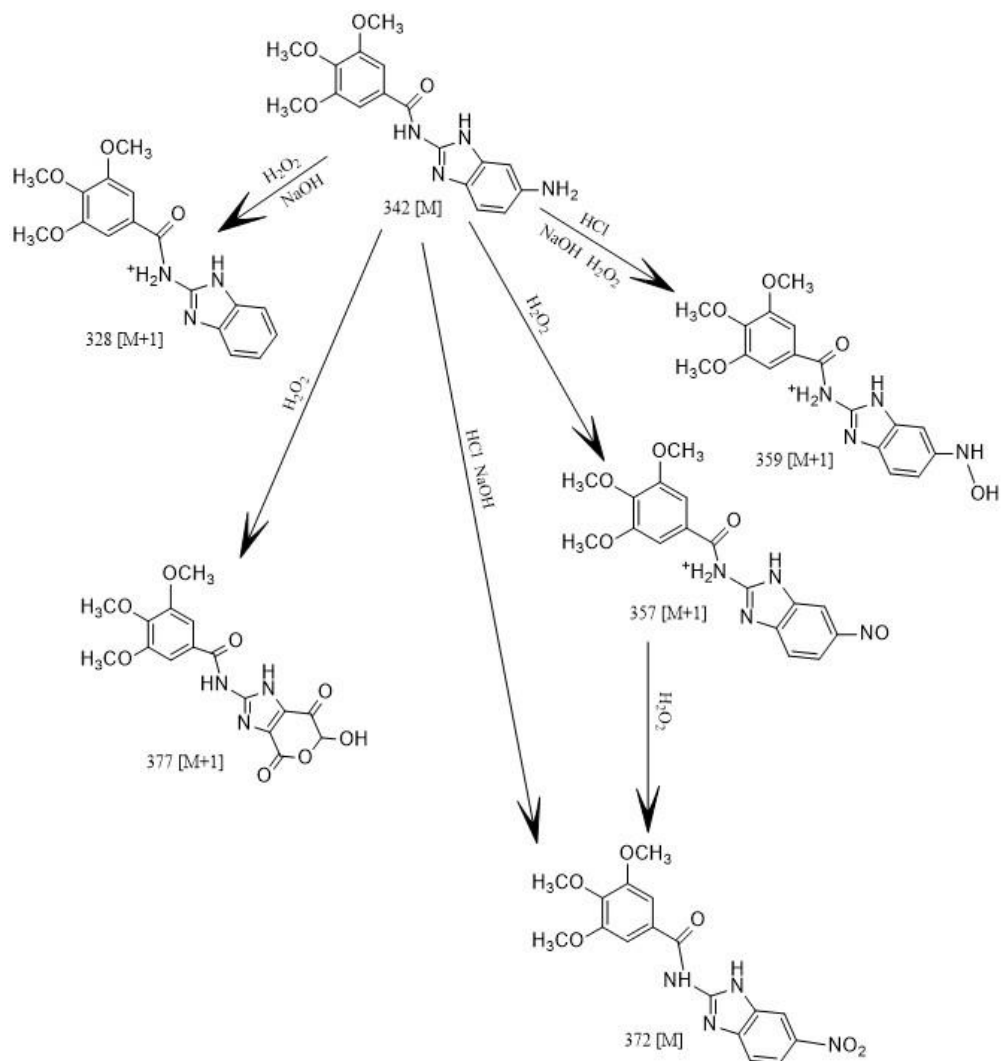


Slika 4.4.d. MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  371, vremena zadržavanja 4,996-5,053 min prema kojem je određena njegova strukturna formula



Slika 4.4.e. MS/MS spektra fragmenta  $m/z$  377, vremena zadržavanja 5,489-5,646 min prema kojem je određena njegova strukturna formula

Na osnovi fragmentacije 5 detektiranih razgradnih produkata DMP-4 odredila se njihova struktura i predložio razgradni put spoja DMP-4.



Slika 4.4.4. Predloženi razgradni put uzorka DMP-4

**Tablica 4.4.** Udio nastalih razgradnih produkata spoja DMP-4 po eksperimentima

Razgradni produkti	Udio nastalih produkata u stres uvjetima, %				
	Oksidacija, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 %	Hidroliza, HCl	Hidroliza, NaOH	Fotoliza, UV/VIS	Termalna razgradnja
M:					
359	1,0	0,9	0,9		
372	2,8	1,6	1,6		
328	1,1	3,8	3,8		
377	0,9				
357	16,5				

Ispitivani spoj DMP-4 razgradio se prilikom izloženosti oksidaciji i hidrolizi. Prilikom izlaganja kiseloj i lužnatoj hidrolizi nastala su tri ista razgradna produkta ( $m/z$  359,  $m/z$  372,  $m/z$  328), među kojima je najznačajniji produkt  $m/z$  328 s ukupnim udjelom od 3,8 %. Vidimo kako prilikom izlaganja UV/VIS svjetlosti, kao i povišenim temperaturama od 80 °C i 100 °C nije nastao ni jedan razgradni produkt, što ukazuje na stabilnost DMP-4 pri takvim uvjetima. Kada se DMP-4 podvrgnuo oksidaciji peroksidom pojavilo se svih 5 detektiranih razgradnih produkata, prilikom čega razgradni produkti  $m/z$  359,  $m/z$  372,  $m/z$  328 i  $m/z$  377 nastaju u manjim udjelima, dok se s druge strane produkt  $m/z$  357 u smjesi pojavljuje u velikom udjelu od 16,5 %. Prilikom oksidacije spoj DMP-4 se razgradio 21,8 %, što upućuje na nestabilnost spoja pri ovim uvjetima, no s obzirom na to da se u eksperimentu koristio jaki reagens 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dobiveni postotak može se smatrati prihvatljivim. Velika stabilnosti spoja DMP-4 prilikom njegova izlaganja visokoj temperaturi i svjetlu ide u prilog njegovoj jednostavnoj proizvodnji, skladištenju i transportu.

Kod testiranja otpornosti na stres generički je predložen pristup svrhovite razgradnje koja je prediktivna za dugoročne i kratkoročne uvjete skladištenja. Općenita preporučena razgradnja varira između 5-20 % degradacije. Ovaj raspon pokriva dopuštenih 10 % razgradnje male molekule farmaceutskog lijeka. Postoje reference u literaturi koje spominju širi preporučeni raspon (npr. 10-30 %), karakterističan za ekstremnije stres-uvjete koji često daju podatke sa sekundarnim produktima razgradnje [60].

Usporedbom kromatograma i njihovih intenziteta prije i nakon prisilne razgradnje kod amidnih derivata benzotiazola (DMP-1 i DMP-2) detektiran je ukupno veći broj razgradnih produkata, točnije njih 6, nego kod amidnih derivata benzimidazola (DMP-3 i DMP-4) kod kojih je nastalo ukupno njih 4, odnosno 5.

Kako bi se približno mogla predvidjeti stabilnost spojeva u ljudskom/životinjskom metabolizmu, oni su se izložili HCl kiselini, koja u ovom slučaju oponaša želučanu kiselinu, te lužini NaOH, koja daje indicaciju stabilnosti spojeva pod fiziološkim neenzimatskim relevantnim uvjetima [35]. Glavne odrednice stabilnosti lijeka sklonog hidrolizi su temperatura i pH-vrijednost. Hidroliza većine lijekova ovisi o koncentraciji hidronijevih i hidroksilnih iona, zato svaki lijek ima optimalnu pH-vrijednost pri kojoj je stabilan [60]. Uspoređujući stabilnost svih ispitivanih spojeva po eksperimentima može se primijetiti kako su amidni derivati benzotiazola stabilniji u uvjetima kisele i lužnate hidrolize, gdje u smjesi nastaje svega do 3,0 % produkata, dok kod amidnih derivata benzimidazola udio prelazi više od 6,0 %.

Ispitivanja stabilnosti na svjetlost važna su kod analitičkog i formulacijskog razvoja novih lijekova, a zatim izvedbe samog proizvodnog pogona [35]. Fotolitička razgradnja može se dogoditi neoksidativnim ili oksidativnim fotolitičkim reakcijama. Neoksidativne fotolitičke reakcije uključuje npr. izomerizaciju, dimerizaciju, ciklizaciju, preuređenja, dekarboksilaciju i cijepanja X-C hetero veza, kao i N-alkil veza (dealkilacija i deaminacija), itd. Oksidativna fotolitička reakcija uključuje ili kisik koji reagira s nezasićenom vezom ili mehanizam s trostrukim kisikom i slobodnim radikalom lijeka što rezultira nastankom peroksida. Svjetlost također može djelovati kao katalizator oksidacijskih reakcija [60]. Prilikom izlaganja UV/VIS ( $500 \text{ Wh/m}^2$ ) svjetlu kod amidnih derivata benzotiazola, DMP-1 i DMP-2 dolazi do nastanka istih razgradnih produkata u malom udjelu od 3,3 %. Prema navodu u referenci [60] prilikom nastanka razgradnih produkata  $m/z$  345 i  $m/z$  395 došlo je do deaminacije, a prilikom nastanka produkata  $m/z$  395 i  $m/z$  409 do oksidacije sumpora tiazolnog prstena. S

druge strane prilikom izlaganja amidnih derivata benzimidazola, DMP-3 i DMP-4 UV/VIS ( $500 \text{ Wh/m}^2$ ) svjetlu nije došlo do njihove razgradnje, što inicira na veliku stabilnost amidnih derivata benzimidazola pri ovim uvjetima. Provedeno ispitivanje je pokazalo, da ako se bilo koji od ispitivanih spojeva izloži UV/VIS svjetlu tijekom proizvodnje, transporta ili skladištenja, neće doći do njihove veće razgradnje.

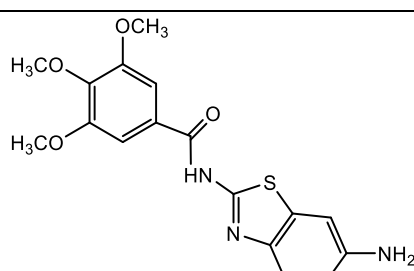
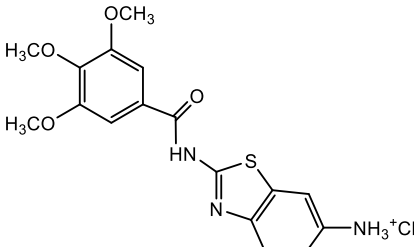
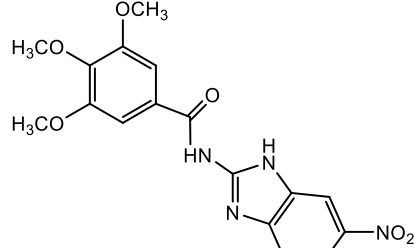
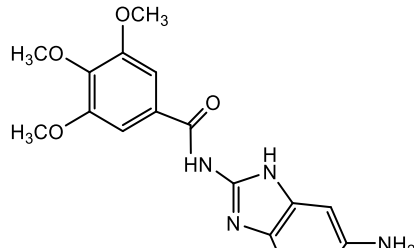
Ispitivanja termalne stabilnosti spojeva uglavnom se provode između  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  jer ispitivanja pri jako visokim temperaturama ( $> 80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mogu dati nepouzdana puteva razgradnje [60]. U uvodnom djelu rada spomenuto je kako ICH smjernice navode da bi se ispitivanja trebala provoditi u koracima od  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , kako bi se ispitala Arrheniusova kinetika. Međutim ovdje treba napomenuti da se reakcije u čvrstom stanju često odvijaju "autokatalitički" (slično kinetici oksidacijske razgradnje) koje uključuju razdoblje indukcije (zastoja), a zatim slijede razdoblje brzog porasta razgradnje i razdoblje usporavanja. Ova vrsta reakcijske kinetike je češća u formuliranim čvrstim oralnim dozirnim oblicima. Arrheniusova kinetika obično se primjećuje kod razgradnje krutih farmaceutskih proizvoda uglavnom prilikom skromne količine razgradnje ( $\sim 5 \%$ ), no ako se provode ispitivanja prisilne razgradnje čvrstog stanja na višim razinama (npr.  $> 10\text{-}30 \%$ ) razgradnje, vjerojatno je da predviđanja brzine razgradnje putem Arrheniusove kinetike ne bi bila točna. Za krute i kapljevite uzorke putevi razgradnje obično će biti isti do  $\sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$ , pod pretpostavkom da nema značajnih faznih promjena u temperaturnom rasponu (npr. taljenje), dok se novi razgradni produkti mogu pojaviti prilikom ispitivanja na temperaturi od  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  [35]. Međutim, prilikom izlaganja kapljevityh uzoraka temperaturi od  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  u vodenoj kupelji došlo je upravo do fazne promjene, odnosno njihove kristalizacije. Kao posljedica toga, nakon ponovnog otapanja uzoraka i njihove analize, dobiveni su nepouzdana i nereprezentativni kromatogrami. Prilikom izlaganja spojeva u krutom stanju povišenoj temperaturi od  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo je do razgradnje DMP-1, DMP-2 i DMP-3, dok se spoj DMP-4 nije termalno razgradio. Amidni derivati benzotiazola, DMP-1 i DMP-2 su se pri povišenoj temperaturi razgradili u vrlo malom postotku od svega  $2,7 \%$ , što ukazuje na njihovu stabilnost u ovakvim uvjetima. Od svih ispitivanih uzoraka najveću nestabilnost na povišenu temperaturu pokazao je spoj DMP-3. Tijekom njegove termalne razgradnje nastao je samo jedan razgradni produkt  $m/z$  360 u velikom udjelu od  $33,0 \%$ , stoga je svakako potrebno ispitivati spoj DMP-3 podvrgnuti dodatnim ispitivanjima pri različitim temperaturama i udjelima relativne vlažnosti, kako bi se pronašli optimalni uvjeti njegova skladištenja i transporta.

Mehanizam oksidativne razgradnje lijekovitih tvari uključuje prijenos elektrona za tvorbu reaktivnih aniona i kationa. Na oksidacijski mehanizam osjetljivi su amini, sulfidi i fenoli za dobivanje *N*-oksida, hidroksilamina, sulfona i sulfoksida [60]. Pod utjecajem 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> došlo je do razgradnje svih ispitivanih spojeva. Više oksidacijskih produkata, čak njih 5, nastalo je prilikom razgradnje spojeva DMP-1 i DMP-4, odnosno derivata s vezanom amino skupinom (NH<sub>2</sub>) na benzenskom prstenu, u odnosu na DMP-2 koji je kloridna sol spoja DMP-1, te spoja DMP-3 koji je nitro (NO<sub>2</sub>) analog spoja DMP-4. Oksidacijski se najviše razgradio spoj DMP-4 (21,8 %), a najmanje spoj DMP-2 (3,0 %). Prema izvorima [35, 61] spojevi s manje od 5,0 % razgradnje pod utjecajem vodikova peroksida smatraju se neosjetljivim na oksidaciju, a u ovom slučaju je to jedino spoj DMP-2, dok su osjetljivi spojevi uz pojave abnormalnosti oni koji se razgrađuju preko 20,0 % i ovdje je to jedino spoj DMP-4.

## 4.2. Procjena toksičnosti razgradnih produkata pomoću računalnog programa TEST

Računalnim programom TEST procijenila se toksičnost ispitivanih spojeva DMP-1, DMP-2, DMP-3 i DMP-4, a zatim i njihovih razgradnih produkata. Izračunala se razvojna toksičnost, bioakumulacijski faktor (BAF) te mutagenost. Rezultati su prikazani u tablicama u nastavku.

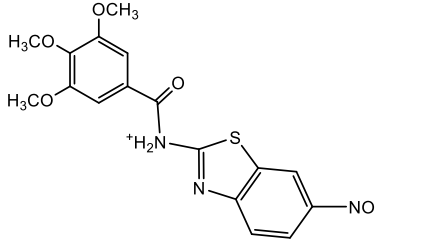
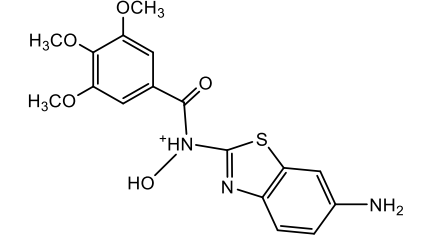
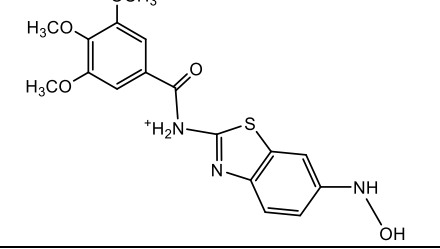
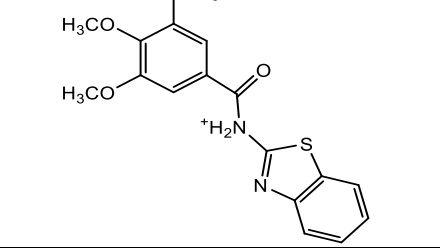
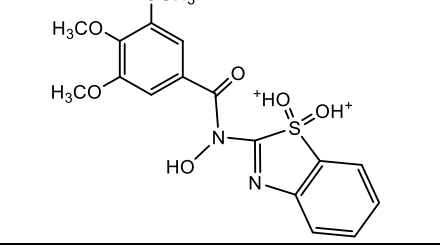
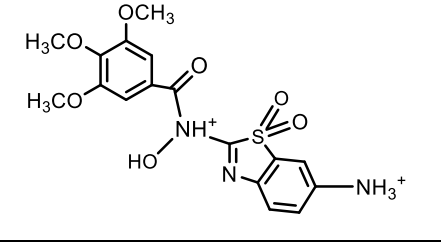
**Tablica 4.2.a.** Procjena toksičnosti ispitivanih spojeva prije prisilne razgradnje

ID:	Struktura spoja:	Razvojna toksičnost:	BAF:	Mutagenost:
DMP-1		+(0,79)	7,14	-(0,46)
DMP-2		+(0,90)	6,62	+(0,63)
DMP-3		+(0,97)	5,64	+(0,65)
DMP-4		+(0,86)	4,98	+(0,50)



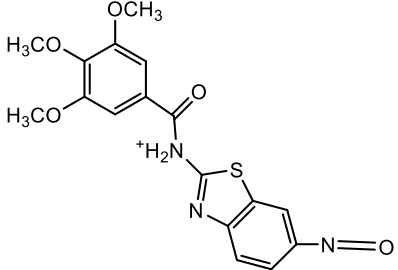
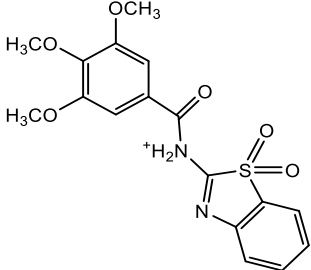
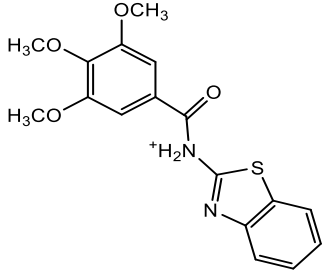
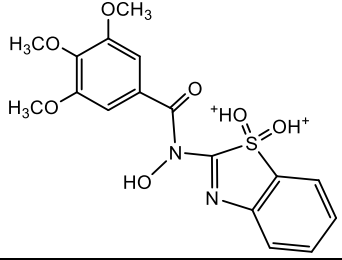
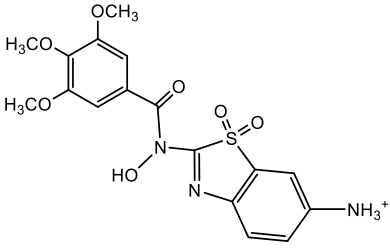
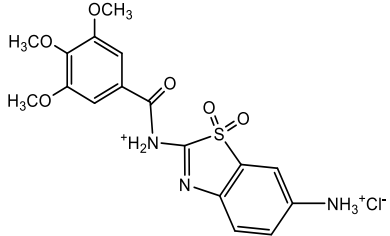
#### 4.2.1. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-1 TEST-om

Tablica 4.2.1. Vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora i mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-1

M:	Struktura spoja:	Razvojna toksičnost:	BAF:	Mutagenost:
374		+(0,65)	6,62	+(0,56)
376 $t_R = 4,8$ min		+(0,86)	9,06	-(0,41)
376 $t_R = 6,2$ min		+(0,89)	7,44	+(0,52)
346		+(0,91)	11,47	+(0,63)
396		+(1,00)	1,18	N/A
410		+(0,86)	2,67	-(0,39)

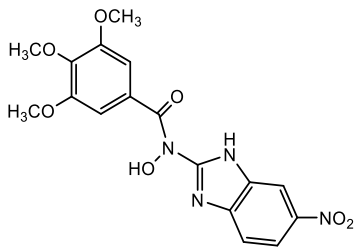
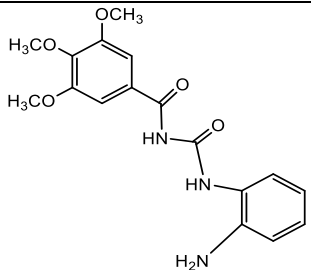
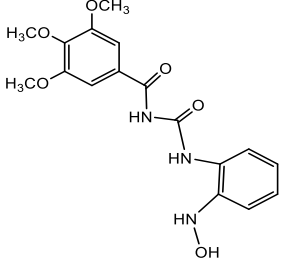
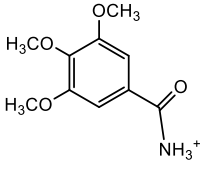
#### 4.2.2. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-2 TEST-om

Tablica 4.2.2. Vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora i mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-2

M:	Struktura spoja:	Razvojna toksičnost:	BAF:	Mutagenost:
374		+(0,65)	6,62	+(0,56)
376		+(0,75)	10,16	-(0,30)
346		+(0,91)	11,47	+(0,63)
396		+(1,00)	1,18	N/A
410		+(0,86)	2,67	-(0,39)
429		+(0,91)	4,27	-(0,09)

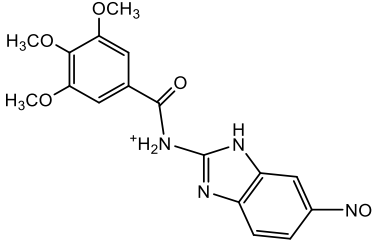
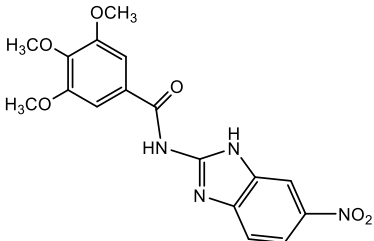
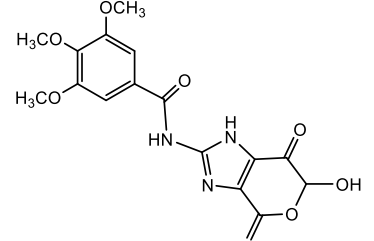
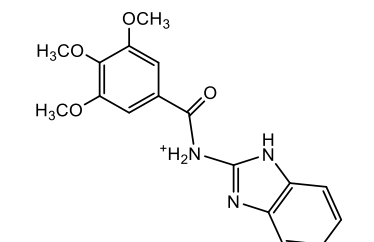
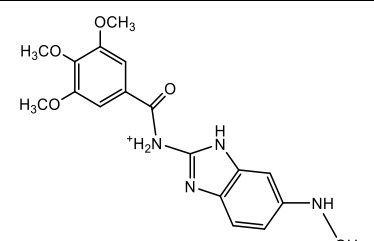
### 4.2.3. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-3 TEST-om

Tablica 4.2.3. Vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora i mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-3

M:	Struktura spoja:	Razvojna toksičnost:	BAF:	Mutagenost:
387		+(0,99)	4,05	-(0,39)
345		+(0,58)	3,31	-(-0,01)
360		+(0,73)	8,63	-(0,34)
213		+(1,03)	2,58	-(0,35)

#### 4.2.4. Procjena toksičnosti razgradnih produkata spoja DMP-4 TEST-om

Tablica 4.2.4. Vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora i mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-4

M:	Struktura spoja:	Razvojna toksičnost:	BAF:	Mutagenost:
357		+(0,96)	17,52	+(0,68)
372		+(0,97)	5,64	+(0,65)
377		+(0,92)	4,99	-(0,22)
328		+(0,80)	7,79	+(0,62)
359		+(0,91)	3,55	+(0,57)

Kako bi se sintetizirane spojeve DMP-1, DMP-2, DMP-3 i DMP-4 moglo uzeti u razmatranje za daljnja ispitivanja te potencijalnu implementaciju u novim farmaceutskim proizvodima, uz provjeru njihove stabilnosti testovima prisilne razgradnje, potrebno je provjeriti i njihova svojstva koja mogu utjecati kako na životinje i ljude, tako i na okoliš. S obzirom na to da toksičnost ispitivanih uzoraka kao i njihovih razgradnih produkata nije poznata, ona se procijenila računalnim TEST programom. Programom se procijenio faktor bioakumulacije te vrijednosti razvojne toksičnosti i mutagenosti, kako bi se odredila njihova sveobuhvatna toksičnost. Procjena bioakumulacijskog faktora kao i ostalih parametara primjenom ovakvih programa je dosta riskantna jer navedeni parametri ovise o mnogo faktora.

Bioakumulacija se odnosi na ulazak zagađivala (najčešće metala) u prehrambeni lanac koji tako uzrokuje akumulaciju zagađenja u biološkim tkivima vodenih organizama, vodi, hrani kao i suspendiranju u sedimentima [62]. Na bioakumulaciju u velikoj mjeri utječu fizikalni i kemijski faktori poput vremena poluraspada spoja, njegova kinetika, stabilnost nastalih razgradnih produkata, difuzija kroz stanične membrane, načini njegove konzumacije (dišni putevi, ishrana ili koža) koncentracija tvari u vodi i vrsti organizama [63-64]. Sklonost 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 [65].

Ispitivanja razvojne i reproduktivne toksičnosti<sup>48</sup> sastavni su dio pretkliničkih ispitivanja. Regulatorne agencije širom svijeta, uključujući Agenciju za hranu i lijekove (FDA), zahtijevaju testiranje razvoja i reproduktivne toksičnosti koja može utjecati na fetus kod trudnica ili na reproduktivni sustav kod muškaraca [66]. Ispitivanja razvojne i reproduktivne toksičnosti obično se provode na glodavcima (miševa ili štakora) i zečevima. Za biofarmaceutike s izrazito ciljanim djelovanjem, farmakološki značaj dan je smjernicom ICH S6(R1). Ispitivanja razvojne i reproduktivne toksičnosti općenito koriste standardizirane eksperimentalne postupke, detaljno opisane u ICH S5(R2) smjernici, a sastoje se od tri vrste ispitivanja: plodnost i rani embrionalni razvoj, prenatalni i postnatalni razvoj te embrio-fetalni razvoj [67].

Kemijske tvari, mješavine tvari i fizikalnih agensa (npr. zračenja) mogu izazvati promjene u genomu somatskih ili germinalnih stanica. Dokaz da mutagena tvar inducira nasljedne

---

<sup>48</sup> eng. *Developmental and reproductive toxicity testing*, DART

mutacije na ljudima može se izvući iz epidemioloških podataka koji ukazuju na jaku povezanost između izloženosti kemikalijama i nasljednih učinaka. Ispitivanja mutagenosti obvezna su za sve tonažne proizvode. Za razliku od većine drugih krajnjih točaka, rezultat negativne mutagenosti *in vitro* može se smatrati dovoljnim dokazom za nemutageni potencijal, ali pozitivni rezultati moraju se potvrditi *in vivo*. Na razini od 1-10 tona potrebno je ispitivanje mutacije gena *in vitro* na bakterijama tzv. Amesov test. Na razini 10-100 tona potrebna su dva dodatna *in vitro* ispitivanja: ispitivanje citogenosti i ispitivanje mutacije gena u stanicama sisavaca. Ako u sklopu ovih *in vitro* testova postoji bilo kakav pozitivan rezultat, potrebna su ispitivanja mutagenosti *in vivo* [68]. Spomenuti Amesov test široko je korištena metoda koja koristi bakterije za provjeru je li određena kemikalija pokazuje mutagenost, a time i potencijalnu kancerogenost [69].

Shodno navodima u referencama [62-69] u nastavku se pokušalo pobliže razjasniti dobivene rezultate navedene prethodno u tablicama.

U Tablici 4.2.a. prikazane su redom vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti za ispitivane spojeve DMP-1, DMP-2, DMP-3 i DMP-4. Iz podataka se može vidjeti kako su kod razvojne toksičnosti sve vrijednosti pozitivne, što može upućivati na to da u doticaju sa živim organizmima, ovi spojevi mogu izazvati abnormalnosti u reproduktivnom sustavu. Dobivene vrijednosti kod derivata benzotiazola koji sadrži amino skupinu ( $\text{NH}_2$ ) vezanu na benzenski dio prstena, DMP-1 nešto su niže u odnosu na njegovu kloridnu sol, DMP-2. Također, kod derivata benzimidazola niže se vrijednosti pojavljuju kod derivata s amino skupinom ( $\text{NH}_2$ ) vezanom na benzenski dio prstena, DMP-4, nego kod njegova nitro ( $\text{NO}_2$ ) analoga, DMP-3.

Svi spojevi imaju niske vrijednosti bioakumulacijskog faktora,  $< 30$  koje upućuju na to da se ovi spojevi neće zadržavati u biološkim tkivima i tako ih onečistiti.

Također, može se primijetiti kako spoj DMP-3 uz najveću vrijednost razvojne toksičnosti od  $+(0,97)$  pokazuje i najveću potencijalnu mutagenost,  $+(0,65)$ , te je najviše riskantan u kontaktu sa životinjama i ljudima. S druge strane spoj DMP-1 među svim ispitivanim spojevima pokazuje najveću sklonost bioakumulaciji s vrijednošću od 7,14, ali ima najniže vrijednosti razvojne toksičnosti i mutagenosti, odnosno on jedini među osnovnim spojevima ima negativnu vrijednost mutagenosti u iznosu od  $-(0,46)$ , te neće izazivati promjene na stanicama. Iz svega navedenog može se zaključiti kako DMP-1 pokazuje najmanju, a spoj DMP-3 najveću sveobuhvatnu toksičnost.

U Tablici 4.2.1. prikaze su vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-1. Uspoređujući dobivene vrijednosti za spoj DMP-1 s vrijednostima njegovih razgradnih produkata možemo zamijetiti kako jedino produkt  $m/z$  374 nastao oksidacijom peroksidom pokazuje nižu vrijednost razvojne toksičnosti, +(0,65). Vrijednosti ostalih razgradnih produkata su više od vrijednosti osnovnog spoja, s tim da najveću vrijednost od +(1,00) pokazuje produkt  $m/z$  395, međutim ona je dobivena izračunom pomoću CAESAR metode, koja je prihvatljiva za izračun razvojne toksičnosti, ali nema istu pouzdanost kao konsenzusna metoda (prikazano u podnaslovu 2.6.2.2.) koja se koristila za procjenu razvojne toksičnosti ostalih produkata. Stoga bi se moglo pretpostaviti da ipak najvišu vrijednost razvojne toksičnosti od +(0,91) u dobivenom setu podataka ima produkt  $m/z$  346. Pogledom na vrijednosti bioakumulacijskog faktora možemo vidjeti kako su sve vrijednosti niže od 30, odnosno da svi produkti pokazuju nisku sklonost bioakumulaciji. Među dobivenim vrijednostima jedino razgradni produkti  $m/z$  374 i  $m/z$  395 imaju niže vrijednosti bioakumulacijskog faktora od spoja DMP-1, međutim dobivene vrijednosti su izračunate metodom najbližeg susjeda koja se temelji na uzimanju prosječne vrijednosti triju kemikalija koje su strukturom slične ispitivanoj molekuli, stoga je manje pouzdana od konsenzusne metode korištene za izračun bioakumulacijskog faktora ostalih spojeva. Vidimo da su kod procijenjenih vrijednosti mutagenosti razgradnih produkata sve vrijednosti pozitivnije od vrijednosti osnovnog spoja DMP-1. Međutim za produkte  $m/z$  376 ( $t_R= 4,8$  min) i  $m/z$  409 vrijednosti su i dalje negativne, dok je za produkte  $m/z$  374,  $m/z$  376 ( $t_R= 6,2$  min) i  $m/z$  346 mutagenost poprimila pozitivnu vrijednost. Kod produkta  $m/z$  395 možemo primijetiti oznaku N/A koja označava da se vrijednost TEST programom ne može procijeniti jer u bazi podataka nema molekula strukturom sličnih ispitivanom spoju. Također, među 6 detektiranih razgradnih produkata spoja DMP-1, produkt  $m/z$  346 je glavni razgradni produkt koji se identificirao, u većem ili manjem postotku, kod gotovo svih provedenih stres testova spoja DMP-1. Kako vidimo u Tablici 4.2.1. produkt  $m/z$  346 ima sve procijenjene vrijednosti veće od osnovnog spoja DMP-1, stoga možemo zaključiti kako razgradnja DMP-1 može biti opasna za žive organizme i okoliš.

U Tablici 4.2.2. prikaze su procijenjene vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-2. Usporedbom vrijednosti razgradnih produkata i osnovnog spoja može se primijetiti kako veću razvojnu toksičnost od DMP-2 pokazuju produkti  $m/z$  346 i  $m/z$  429 u iznosu od +(0,91). Također, veću vrijednost u iznosu od +(1,00) pokazuje i produkt  $m/z$  395, međutim ona se izračunala pomoću

CAESAR metode jer je vrijednost koeficijenta sličnosti ispitivanog produkta sa setom podataka iz baze iznosila manje od 0,5. Nadalje, vrijednosti svih bioakumulacijskih faktora su < 30 te spadaju u skupinu kemikalija s niskom vjerojatnošću bioakumulacije, a najveće vrijednosti imaju produkti  $m/z$  376 s 10,16 te  $m/z$  346 s 11,47 koji nastaju oksidacijom spoja DMP-2 peroksidom u udjelima od svega 1,0 %. Izračunate vrijednosti izazivanja potencijalne mutagenosti u stanicama pokazuju da su svi razgradni produkti manje mutageni od osnovnog spoja DMP-2, osim produkta  $m/z$  395 čija se vrijednost programom nije mogla izračunati pomoću konsenzus i metode najbližeg susjeda, s obzirom na to da u setu podataka nema molekula strukturom sličnih ispitivanoj, a uz to se molekula ne može u potpunosti fragmentirati što onemogućava korištenje hijerarhijske metode. Također, vidimo kako su vrijednosti za dva od tri razgradna produkta dobivena oksidacijom negativne, što ukazuje na manju mutagenost produkata  $m/z$  376 i  $m/z$  429 u usporedbi s početnom molekulom DMP-2. Kako je već prethodno u radu spomenuto spoj DMP-2 je kloridna sol spoja DMP-1, stoga se u oba slučaja kao glavni razgradni produkt pojavljuje  $m/z$  346. On je prisutan u svim smjesama nastalim prisilnom razgradnjom ova dva spoja, te se pojavljuje u gotovo jednakim udjelima, osim kod lužnate hidrolize gdje ga kod razgradnje DMP-1 nastaje u malo većem udjelu od svega 0,2 %. Iako spomenuti produkt nastaje u vrlo malim udjelima prilikom svih eksperimenata forsirane razgradnje, s maksimalnim udjelom od 2,7 % prilikom termalne razgradnje spojeva, možemo zaključiti kako njegov nastanak može biti od većeg značaja i dovesti do opasnosti za žive organizme i okoliš, s obzirom na to da je procijenjena veća sveobuhvatna toksičnost u odnosu na osnovne spojeve DMP-1 i DMP-2.

U Tablici 4.2.3. prikaze su vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-3. Razgradnjom su nastala ukupno 4 razgradna produkta. U prvoj Tablici 4.2.a. procijenjeno je da upravo spoj DMP-3 od svih ispitivanih spojeva pokazuje najveću opasnost za žive organizme i okoliš, zbog najvećih dobivenih vrijednosti za razvojnu toksičnost od +(0,97) te +(0,65) za mutagenost. Također, prema Tablici 4.3. spoj DMP-3 se u svim eksperimentima prisilne razgradnje, izuzev fotolize UV/VIS lampom, razgradio više od ostalih ispitivanih spojeva. Prilikom kisele hidrolize s 0,5 M HCl nastala su dva razgradna produkta  $m/z$  213 i  $m/z$  387 s udjelima od 3,1 %, koji kako vidimo u Tablici 4.2.3. pokazuju veće vrijednosti razvojne toksičnosti od ispitivanog DMP-3 u iznosima od +(0,99) i +(1,03). To upućuje na to da kiselu hidrolizu spoja DMP-3 svakako nije poželjna jer može negativno utjecati na zdravlje ljudi i životinja. Uz to tijekom lužnate hidrolize s 0,5 M NaOH nastala su također dva razgradna produkta, od kojih je jedan



već spomenuti  $m/z$  213, a drugi  $m/z$  345. Iako razgradni produkt  $m/z$  345 pokazuje manji utjecaj na reproduktivnu toksičnost od DMP-3, s vrijednošću od  $+(0,58)$ , lužnata hidroliza spoja ipak nije poželjna s obzirom na to da u smjesi u većinskom udjelu od 7,4 % nastaje toksičnijeg razgradnog produkta  $m/z$  213. Uz to razgradni produkt  $m/z$  213 nastaje oksidacijom DMP-3 s 10 %  $H_2O_2$  u udjelu od 5,9 %, što svakako nije poželjno i povećava opasnost u potencijalnoj primjeni kod ljudi i životinja. S druge strane jedini razgradni produkt koji nastaje u velikom udjelu od 33,0 % prilikom izlaganja DMP-3 visokoj temperaturi je  $m/z$  360. Nastali produkt pokazuje manju vrijednost razvojne toksičnosti od  $+(0,73)$  i manju vrijednost mutagenosti od  $-(0,34)$ , stoga iz svega navedenog možemo zaključiti kako pokazuje manju opasnost za ljude, životinje i okoliš od osnovnog spoja DMP-3. Nadalje, procijenjene vrijednosti bioakumulacijskih faktora za sve produkte su manje od 30, zato se može pretpostaviti da se spojevi neće zadržavati u tkivima i okolišu. Naposljetku, možemo primijetiti da su sve vrijednosti dane u trećemu stupcu Tablice 4.2.3. negativnog predznaka, odnosno da nastali razgradni produkti neće izazivati mutaciju gena. Iz svega navedenom može se zaključiti kako DMP-3 svakako ne bi trebalo podvrgavati hidrolizi te oksidaciji jer nastaju razgradni produkti koji pokazuju veću razvojnu toksičnost od početne molekule, s druge strane termalnom razgradnjom spoj se intenzivno razgrađuje pri čemu nastaje razgradni produkt  $m/z$  360 koji pokazuje manju sveobuhvatnu toksičnost od osnovnog spoja.

U Tablici 4.2.4. prikaze su vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti za razgradne produkte spoja DMP-4. Nakon prisilne razgradnje detektirano je ukupno 5 razgradnih produkata, od kojih se svi u smjesi pojavljuju prilikom oksidacije s 10 %  $H_2O_2$ . Pogledom na prvu Tablicu 4.2.a. može se primijetiti kako su sve vrijednosti spoja DMP-4 pozitivne i između vrijednosti ostalih ispitivanih spojeva u setu. Nakon što se spoj DMP-4 podvrgnuo kiseloj i lužnatoj hidrolizi u smjesi su se identificirala tri ista razgradna produkta  $m/z$  328,  $m/z$  359 i  $m/z$  372 u udjelima od 3,8 %, 0,9 % te 1,6 %. Sva tri navedena produkta imaju pozitivne vrijednosti razvojne toksičnosti, a jedino  $m/z$  328 nižu od početnog spoja DMP-4 s  $+(0,80)$ . Uz to, svaki od već navedenih razgradnih produkata pokazuje i veću sklonost izazivanja mutagenosti i abnormalnosti DNA od početnog spoja, s tim da je razgradni produkt  $m/z$  372 najopasniji jer ima najveće vrijednosti za oba svojstva. Prilikom oksidacije DMP-4 s  $H_2O_2$  uz već navedena tri, identificirala su se još dva razgradna produkta  $m/z$  377 i  $m/z$  357. Među svim razgradnim produktima spoja DMP-4 jedino produkt  $m/z$  377 ima jednu negativnu vrijednost od  $-(0,22)$  te ne izaziva mutagenost, međutim njega u smjesi najmanje nastaje u udjelu od svega 0,9 %. S druge strane dva produkta koja pokazuju

najtoksičnija svojstva, odnosno  $m/z$  357 s razvojnom toksičnošću od +(0,96) i mutagenosti od +(0,68) te razgradni produkt  $m/z$  372 s vrijednošću razvojne toksičnošću od +(0,97) i mutagenosti od +(0,65) se u smjesi nalaze u najvećim udjelima od 15,6 % i 2,8 %, što ukazuje na to da oksidacija spoja DMP-4 treba biti izbjegnuta jer nastaje smjesa produkata u kojoj se u većinskom udjelu nalaze razgradni produkti veće sveobuhvatne toksičnošću od osnovnog spoja. Uz sve navedeno može se i primijetiti kako svi razgradni produkti spoja DMP-4 imaju niske vrijednosti bioakumulacijskih faktora, među kojima oksidacijski produkt  $m/z$  357 ima najveću vrijednost od 17,52.

Usporedbom procijenjenih rezultata navedenih u poglavljima 4.1. i 4.2. može se pretpostaviti koji će uvjeti biti najpogodniji za skladištenje, transport i upotrebu ispitivanih spojeva. Ovakve procijene mogu dati korisne informacije o dovoljno neistraženim spojevima te mogu biti od velike pomoći za daljnji razvoj i potencijalnu implementaciju u novim farmaceutskim proizvodima, međutim mora se imati na umu da one nisu u potpunosti pouzdane i da se svakako u daljnjem istraživanju moraju provesti i razna druga ispitivanja stabilnosti, kao i procjena toksičnošću.

Među svim ispitivanim spojevima DMP-3 je pokazao najveću nestabilnost i pojavu razgradnje pri gotovo svim provedenim eksperimentima. Uz to je pokazao i najveću podložnost razgradnji pri uvjetima lužnate hidrolize (10,5 %) i termalne razgradnje (33,0 %). U Tablici 4.2.a. prikazano je kako je ovom spoju na osnovi njegove kemijske strukture TEST programom procijenjena najveća razvojna toksičnošću +(0,97) i mutagenost +(0,65). Iako je programom procijenjeno da njegovi razgradni produkti ne izazivaju mutagenost stanica jer su sve dobivene vrijednosti negativna predznaka, ipak se kod  $m/z$  345 i  $m/z$  213 procijenila najveća razvojna toksičnošću među svim identificiranim razgradnim produktima navedenim u ovom radu. Oba produkta se pojavljuju kod kisele hidrolize, a sami  $m/z$  213 i kod oksidacije peroksidom, stoga ako se ispitivana supstanca bude koristila u daljnjem istraživanju i potencijalno jednom željela primijeniti u životinjskom/ljudskom organizmu, mora se svakako podvrgnuti mnogim drugim ispitivanjima toksičnošću, od kojih su neka navedena u nastavku ovog teksta. Između ostalog treba biti oprezan da se prilikom skladištenja i transporta DMP-3 ne izloži visokim temperaturama jer se intenzivno razgrađuje pod tim uvjetima, mada tako može nastati razgradni produkt  $m/z$  360 koji pokazuje manju sveobuhvatnu toksičnošću od osnovnog spoja, te se i njega može razmotriti u daljnjim istraživanjima.

S druge strane, spoju DMP-1 se među svim ispitivanim spojevima na osnovi molekulske strukture procijenila najniža vrijednost razvojne toksičnosti i mutagenosti. Spoj se razgradio pri svim provedenim eksperimentima i ukupno je detektirano njegovih 6 razgradnih produkata, iako u jako malom postotku. Najveću nestabilnost DMP-1 je pokazao prilikom izlaganja oksidaciji peroksidom, stoga je potreban veliki oprez i dodatna ispitivanja, ako se ispitivana supstanca želi ubuduće izložiti ovakvim uvjetima. Uz spomenuti DMP-1 među ispitivanim spojevima računalnim programom TEST manja sveobuhvatna toksičnost procijenila se i za spoj DMP-4. Navedeni spoj pokazao je veliku stabilnost pri izloženosti UV/VIS svjetlu i povišenoj temperaturi te se nije niti fotolitički niti termalno razgradio. To ukazuje na njegovu veliku stabilnost pri ovim uvjetima, koja omogućava lakšu kontrolu pri proizvodnji, skladištenju i transportu. Međutim, prilikom ispitivanja na oksidaciju i hidrolizu došlo je do identifikacije razgradnih produkata među kojima je većina njih pokazala veće vrijednosti razvojne toksičnosti i mutagenosti od osnovnog spoja, stoga se svakako trebaju provesti i dodatna preliminarna ispitivanja.

Primjena programskih paketa, poput u radu korištenog TEST programa može biti korisna za brzu i jednostavnu procjenu toksičnosti nepoznatih i dovoljno neistraženih kemikalija. No, ovakve procjene moraju se uzeti s velikim oprezom jer se sve potrebne informacije ne mogu dobiti samo iz strukture molekule. Kada se koristi bilo koji od ovakvih računalnih alata, korisnici moraju razmotriti domenu njihove primjenjivosti koja nije uvijek poznata. Također, učinkovitost modela može se poboljšati njihovim razvojem uz unos novih procjena kao što su to koeficijenti raspodjele i razmatranja topljivosti [70].

Stoga, kako bi se s većom sigurnošću moglo predvidjeti koji je od ispitanih spojeva u ovom radu potencijalno najviše toksičan, a koji daje dobru podlogu za daljnji razvoj i farmakološku upotrebu trebaju se provesti naknadna ispitivanja. U sljedećim fazama istraživanja obećavajućim odabranim supstancama (DMP-1 i DMP-4), treba se ispitati toksični učinak nekim drugim metodama kako bi se dobile relevantne informacije koje mogu poslužiti u daljnjemu razvoju. Jedna od prvih *in vitro* predikcija toksičnosti je u radu već spomenuti Amesov test na bakterijama, koji je i poslužio kao osnova za izradu matematičkog modela procijene genotoksičnosti TEST programom. Prema izvoru [71] Amesov test se provodi na bakterijama i pokazuje hoće li ispitivana tvar uzrokovati mutaciju, koja se prati preko sintetiziranja amino kiseline (histidin).

Prvo ispitivanje toksičnosti nove tvari *in vivo* obično je ispitivanje raspona doze kod glodavaca. Takva ispitivanja daju informacije koje mogu poslužiti za daljnji razvoj odabrane tvari kao i njene primjene na drugim vrstama, odnosno podaci iz početnog ispitivanja na glodavcima mogu se upotrijebiti za postavljanje početne doze tvari.

Važan dio toksikoloških ispitivanja je identificiranje doze pri kojoj bi se vjerojatna toksičnost za ciljne organe trebala primijetiti, ali tamo gdje doza nije tako visoka da bi ispitivanje bilo ugroženo zbog morbiditeta ili smrtnosti. Ova doza se naziva maksimalna dopuštena (tolerirana) doza<sup>49</sup> jer životinja primanjem ispitivane supstance neće podnositi štetne učinke koji se mogu javiti pri većim dozama. Da bi se odredila maksimalna tolerirana doza tvari kod koje će se primijetiti pojava toksičnosti na ciljnim organima<sup>50</sup> životinje, mora se provesti MTD test u trajanju od 30 dana. MTD je definirana kao najveća tolerirana doza u toksikološkim ispitivanjima. Metodologija se obično određuje parametrima poput kliničkih

---

<sup>49</sup> eng. *Maximum tolerated dose*, MTD

<sup>50</sup> eng. *Target organs*

signala, promjena tjelesne težine, potrošnje hrane, morbiditeta i smrtnosti. Pored toga, nekoliko protokola za odabir doze također preporučuju provođenje hematološke i biokemijske analize, kao i histopatološku analizu organa kako bi se bolje utvrdila toksičnost između ispitivanih doza. Uz ispitivanja maksimalne tolerirane doze, važno je provesti i ispitivanja ponovljivosti doze<sup>51</sup>. Ova ispitivanja slijede određene protokole te objedinjuju histopatologiju organa, kompleksnije kliničke analize, kompletnu biokemijsku i hematološku analizu. Nakon preliminarnih, prema dobroj laboratorijskoj praksi<sup>52</sup> toksikološka ispitivanja trebala bi se nastaviti na dvjema životinjskim vrstama. Odnos između ispitivanja na životinjama i ljudima vrlo je važna prekretnica u razvoju lijeka, nakon što provođenje i izbor nekliničkih ispitivanja trebaju opravdati trajanje predloženo za kliničko liječenje. Plan ovakvih ispitivanja trebao bi se osnivati na istraživanju djelotvornosti i toksičnosti odabranih supstanci. Ona bi pomogla u određivanju doza tvari u kojima bi se ona primjenjivala, vremenu njene djelotvornosti i detektiranju pojave nuspojava. Iako ne postoji jedinstveni i standardizirani plan razvoja novih lijekova, preporučuje se provedba ispitivanja genotoksičnosti (*in vitro* i *in vivo*), kao i određivanje uporabne i toksične ponovljive doze tvari, prije nego se ona prvi put dovede u doticaj s ljudima [72-73, 74]. Međutim, rasprostranjeno javno i znanstveno zanimanje za promicanje skrbi i dobrobiti životinja koje se koriste za testiranje na toksičnost s vremenom su dovele do bolje prakse, kao i do zakona i propisa koji podržavaju smanjenje, pročišćavanje i zamjenu<sup>53</sup> upotrebe životinja u određenim ispitivanjima toksičnosti. Jedan od načina na koji ovi propisi ostvaruju svoj cilj jest promicanje istraživanja, razvoja i primjene alternativnih pristupa testiranju za karakterizaciju potencijalnih toksičnosti bez životinja ili s minimalnom uporabom. Važan alternativni pristup je uporaba računalnih modela koji uključuju ekonomičnost, brzu dostupnost rezultata, ponovljivost i potpunu dostupnost standardiziranih postupaka [75], a jednostavnost i praktičnost njihove primjene prikazana je upravo i u ovom radu.

---

<sup>51</sup> eng. *Repeat-dose toxicity studies*

<sup>52</sup> eng. *Good Laboratory Practice, GLP*

<sup>53</sup> eng. *Reduction, Refinement and Replacement, 3Rs*

## **5. ZAKLJUČAK**

Ispitivanja prisilne razgradnje omogućava razvijanje metoda koje se mogu primijeniti za analizu uzoraka/novih spojeva nastalih iz ubrzanih i dugotrajnih ispitivanja stabilnosti. Ova metoda ukazuje na stabilnost ljekovite tvari, kao karakteristike koja utječe na njenu čistoću, djelotvornost i sigurnost, te pruža uvid u načine same razgradnje i omogućava da se okarakteriziraju nastali razgradni produkti. Eksperimentalni uvjeti za testiranje otpornosti na stres nisu eksplicitno zadani i ovisit će o pojedinoj ljekovitoj tvari i vrsti lijeka u kojem je uključena, no prema preporukama danim ICH smjernicama ispitivanja trebaju uključivati učinak temperature, svjetlosti, kao i procjenu osjetljivosti ljekovite tvari na hidrolizu u širokom rasponu pH-vrijednosti (kisela i lužnata) te na oksidaciju. Produkti nastali prisilnim ispitivanjima razgradnje su potencijalni produkti razgradnje koji se mogu ili ne moraju formirati pod relevantnim uvjetima, ali pomažu u razvoju metoda indikacije stabilnosti. Ovakva ispitivanja bolje je provesti u ranijim procesima razvoja lijekova kako bi se osiguralo dovoljno vremena i steći više informacija o stabilnosti molekule, da se poboljšaju postupci izrade formulacije i odrede uvjeti transporta i skladištenja gotovih proizvoda.

- Ispitala se stabilnost dva derivata benzotiazola (DMP-1 i DMP-2) i dva derivata benzimidazola (DMP-3 i DMP-4) prilikom čega su se DMP-1, DMP-3 i DMP-4 otopili u otopini acetonitrila (ACN), a kloridna sol DMP-2 netopljiva u ACN-u se otopila u metanolu (MeOH).
- Za svaki ispitivani spoj okarakterizirali su se razgradni produkti te predložio put razgradnje.
- Sveobuhvatna toksičnost ispitivanih spojeva procijenila se računalnim programom TEST čija je svrha procijeniti vrijednosti toksičnosti i fizikalna svojstva kemikalija iz njihove molekulske strukture putem raznih QSAR metoda koje se mogu koristiti za pružanje podataka potrebnih za poboljšanje razvoja novih lijekova. Jedna od velikih prednosti ovog alata uz vrlo brzu i jednostavnu procjenu toksičnosti je i laka dostupnost. Iako TEST omogućava procjenu toksičnosti bez potrebe za dodatnim programima i koristi se u svrhu predviđanja rizika, kao i prilikom registracije novih kemijskih tvari, sami QSAR modeli ne mogu u potpunosti zamijeniti stvarna testiranja.
- Procjenom sveobuhvatne toksičnosti spojeva računalnim programom TEST utvrdilo se da razvojna toksičnost poprima pozitivnu vrijednost za sve ispitane spojeve kao i njihove

produkte dobivene prisilnom razgradnjom. Pozitivna vrijednost razvojne toksičnosti znači da su za određeni produkt dobiveni pozitivni rezultati toksičnosti bilo istraživanjem na životinjama, bilo na ljudima, te da su u doticaju sa životinjama/ljudima izazvali abnormalnosti ili da postoje dokazi fetalnog rizika na temelju ljudskog iskustva.

- Bioakumulacijski faktor svih ispitanih spojeva kao i njihovih razgradnih produkata je  $< 30$  što ukazuje da ni jedan od ispitivanih spojeva nije sklon akumuliranju u tkivu organizama u koji se unosi, kao i okolišu u kojem se ispušta.
- Među ispitivanim spojevima jedino DMP-1 poprima negativnu vrijednost za mutagenost, odnosno ne izaziva abnormalnosti na stanicama.
- Prilikom identifikacije utvrđeno je kako prisilnom razgradnjom DMP-1 nastaje ukupno 6 razgradnih produkata. Ispitivani spoj se razgradio pri svim eksperimentalnim uvjetima, a najviše produkata nastaje prilikom oksidacije s 10 %  $H_2O_2$ , što ukazuje na nestabilnost ovog spoja u navedenim uvjetima.
- Prilikom identifikacije utvrđeno je kako prisilnom razgradnjom DMP-2 nastaje ukupno 6 razgradnih produkata.
- Prisilnom razgradnje DMP-1 i DMP-2 kao glavni razgradni produkt nastaje  $m/z$  346 koji se pojavljuje pri svim eksperimentalnim uvjetima.
- Razgradni produkt  $m/z$  346 ima vrijednosti razvojne toksičnosti, bioakumulacijskog faktora te mutagenosti veće od osnovnih spojeva DMP-1 i DMP-2, stoga možemo zaključiti kako razgradnja DMP-1 i DMP-2 može biti opasna za žive organizme prilikom primjene kao i za sam okoliš u koji mogu dospjeti ispitivani spojevi.
- Prilikom izlaganja spojeva DMP-1 i DMP-2 UV/VIS svjetlu nastaju isti razgradni produkti  $m/z$  346,  $m/z$  396 i  $m/z$  410. Oba spoja su se razgradila u malom postotku od 3,3 %, dok se s druge strane spojevi DMP-3 i DMP-4 pod utjecajem svjetlosti uopće nisu razgradili. S obzirom na sve navedeno može se zaključiti kako nijedan ispitani spoj nije



osjetljiv na svjetlost, te da se neće jako razgraditi prilikom proizvodnje, skladištenja ili transporta, ako se izlože ovim uvjetima.

- Iako razgradni put spojeva DMP-1 i DMP-2 ima neke sličnosti prilikom hidrolize i fotolize, on ima i neke manje razlika koje se očituju prilikom izlaganja spoja DMP-2 oksidaciji peroksidom gdje nastaje razgradni produkt  $m/z$  376, različit od onih okarakteriziranih prilikom oksidacije spoja DMP-1, te nastaje i još jedan potpuno novi razgradni produkt  $m/z$  429. Ova razlika proizlazi izravno kao posljedica molekulske strukture jer je DMP-2 kloridna sol spoja DMP-1.
- Prisilnom razgradnjom DMP-3 utvrđeno je kako se isti ne razgrađuje prilikom kratkotrajnog izlaganja UV/VIS svjetlu. Identifikacijom je pokazan nastanak ukupno 4 razgradna produkata od čega se produkt  $m/z$  213 pojavljuje pri svim ispitivanjima, osim kod termalne razgradnje, gdje jedino nastaje produkt  $m/z$  360 u udjelu od 33 %. Taj veliki udio razgradnje pri povišenoj temperaturi ukazuje na nestabilnost spoja DMP-3 u tim uvjetima.
- Prilikom kisele i lužnate hidrolize te oksidacije peroksidom spoja DMP-3 nastaje razgradni produkt  $m/z$  213 koji pokazuje veću sveobuhvatnu toksičnost od osnovnog spoja, stoga zbog sigurnosti za zdravlje ljudi/životinja i okoliša potrebno je reducirati njegov nastanak.
- Prisilnom razgradnjom DMP-4 ukupno je nastalo 5 razgradnih produkata. Svih 5 razgradnih produkata se pojavljuju prilikom oksidacije peroksidom, što inicira na osjetljivost spoja na navedene uvjete.
- Od 5 razgradnih produkata nastalih prisilnom razgradnjom spoja DMP-4 ista 3 ( $m/z$  328,  $m/z$  359 i  $m/z$  372 u udjelima od 3,8 %, 0,9 % i 1,6 %) se pojavljuju tijekom hidrolize u kiselim i lužnatim uvjetima. Sva tri navedena produkta imaju pozitivne vrijednosti razvojne toksičnosti i veću sklonost izazivanja mutagenosti i abnormalnosti DNA od početnog spoja, s tim da je razgradni produkt  $m/z$  372 najopasniji jer ima najveće vrijednosti za oba svojstva. Stoga je potreban oprez prilikom izlaganja DMP-4 ovim uvjetima.

- Oksidacijski produkt spoja DMP-4  $m/z$  377 ima negativnu vrijednost od  $-(0,22)$  te ne izaziva mutagenost, međutim njega u smjesi najmanje nastaje u udjelu od svega 0,9 %. Povrh toga, oksidacijski produkti  $m/z$  357 i  $m/z$  372 spoja DMP-4 s najvećim vrijednostima razvojne toksičnosti od  $+(0,96)$  i  $+(0,97)$  te mutagenosti od  $+(0,68)$  i  $+(0,65)$  se u smjesi nalaze u najvećim udjelima od 15,6 % i 2,8 %, što ukazuje na to da je DMP-4 pod tim uvjetima nestabilan i da njegova razgradnja može biti opasna kako za životinje/ljude tako i za okoliš.
- Među svim ispitanim spojevima TEST programom se za DMP-1 i DMP-4 procijenila najmanja sveobuhvatna toksičnost. Međutim, spoj DMP-1 se razgradio pri svim eksperimentalnim uvjetima, dok je DMP-4 pokazao veliku stabilnost na izloženost UV/VIS svjetlu i povišenoj temperaturi. Stoga bi proizvodnja, skladištenje i transport mogli biti jednostavniji i sigurniji za spoj DMP-4, nego za DMP-1. Međutim, spoj DMP-4 pokazuje veću osjetljivost na oksidaciju peroksidom, kiselu te lužnatu hidrolizu, stoga bi njegova primjena u živim organizmima mogla biti opasnija za žive organizme i sami okoliš.
- Spoj DMP-3 je pokazao nestabilnost pri svim provedenim eksperimentima, a najviše prilikom izlaganja povišenoj temperaturi gdje se razgradio u udjelu od 33 %. Ovom spoju TEST programom se procijenila najveća vrijednosti razvojne toksičnosti i mutagenosti, odnosno sveobuhvatna toksičnost. Ipak, njegov razgradni produkt  $m/z$  360 nastao termalnom razgradnjom pokazuje manju sveobuhvatnu toksičnost od osnovnog spoja, te bi se mogao uzeti u obzir tijekom daljnjih ispitivanja.
- Razgradni produkti spoja DMP-3,  $m/z$  388 i  $m/z$  213 među svim ispitivanim molekulama pokazuju najveće procijenjene vrijednosti razvojne toksičnosti, te bi se svakako njihov nastanak trebao spriječiti, odnosno ne izlagati DMP-3 kiseloj hidrolizi i oksidaciji.

## **6. LITERATURA**

- [1] J. M. Ritter, L. D. Lewis, T. G. K. Manta, A. Ferro, *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 5th Edition, Hodden Education, Hachette Livre UK 2008., str. 4-5.
- [2] J. Arrowsmith, P. Miller, Phase II and Phase III attrition rates 2011-2012, *Nature Reviews Drug Discovery* **12** (8) (2013) 569-569.
- [3] R. K. Tekade, *Dosage Form Design Considerations*, Academic Press, Elsevier Inc., 1st Edition, Cambridge, Massachusetts, SAD 2018., str. 1-55.
- [4] J. P. Griffin, *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*, Wiley-Blackwell, 6th Edition, Chichester, West Sussex 2009., str. 3-4., 81-84.
- [5] A. Lopalco, A. Curci, A. Lopodota, A. Cutrignelli, V. Laquintana, M. Franco, N. Denora, Pharmaceutical preformulation studies and paediatric oral formulations of sodium dichloroacetate, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **127** (2019) 339-350.
- [6] S. V. Saibaba, M.S. Kumar, B. Ramu, Pharmaceutical Impurities and their Characterization: A review, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* **2** (4) (2016) 190-196.
- [7] C. Whittlesea, R. Walker, *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Churchill Livingstone Elsevier, 5th Edition, London 2012., str.2.
- [8] Aktivna tvar, [https://en.wikipedia.org/wiki/Active\\_ingredient](https://en.wikipedia.org/wiki/Active_ingredient) (pristup veljača 2020.)
- [9] EMA, <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/biologicals/biologicals-active-substance> (pristup: veljača 2020.)
- [10] D. D. Magar, R. G. Ingle, Heterocyclic Chemistry of Benzimidazoles and Potential, *Int. J. Drug Res. Tech.* **1** (1) (2011), 26-32.
- [11] A. A. El Rashedy, H. Y. Aboul-Enein, Benzimidazole Derivatives as Potential Anticancer Agents, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **13** (3) (2013), 399-407.
- [12] Molekula benzimidazola, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzimidazole#section=3D-Conformer> (pristup: veljača 2020.)
- [13] B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar, Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety, Review Article, *Med. Chem. Res.* **21** (3) (2010) 269–283.

- [14] Y. Bansal, O. Silakari, The therapeutic journey of benzimidazoles: A Review, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20** (21) 6208-6236.
- [15] W. Akhtar, M. F. Khan, G. Verma, M. Shaquiquzzaman, M. A. Rizvi, S. H. Mehdi, M. Akhter, M. M. Alam, Therapeutic evolution of benzimidazole derivatives in the last quinquennial period, *European Journal of Medicinal Chemistry* **126** (2017) 705-753.
- [16] N. Shrivastava, M. J. Naim, M. J. Alam, F. Nawaz, S. Ahmed, O. Alam, Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure–Activity Relationship- Review Article, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **350** (6) (2017) 1-80.
- [17] S. Tariq, P. Kamboj, M. Amir, Therapeutic advancement of benzothiazole derivatives in the last decennial period- Review article, *Archiv Der Pharmazie* **352** (1) (2018) 1-17.
- [18] P. Zahradník, Quantum-chemical study of electronic structure and transmission of substituent effects in benzothiazole derivatives, *Chemical Papers* **44** (2) (1990) 145-150.
- [19] Molekula benzotiazola,  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzothiazole#section=3D-Conformer>  
(pristup: srpanj 2020.)
- [20] N. Pathak, E. Rathi, N. Kumar, S. G. Kini, C. M. Rao, A Review on Anticancer Potentials of Benzothiazole Derivatives, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **20** (1) (2020) 12-23.
- [21] A. Irfan, F. Batool, S. A. Z. Naqvi, A. Islam, S. M. Osman, A. Nocentini, S. A. Alissa, C. T. Supuran, Benzothiazole derivatives as anticancer agents, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **35** (1) (2020) 256-279.
- [22] P. C. Sharma, A. Sinhmar, A. Sharma, H. Rajak, D. P. Pathak, Medicinal significance of benzothiazole scaffold: an insight view, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **28** (2) (2013) 240-266.
- [23] M. Cindrić, I. Sović, M. Mioč, L. Hok, I. Boček, P. Roškarić, K. Butković, I. Martin-Kleiner, K. Starčević, R. Vianello, M. Kralj, M. Hranjec, Experimental and Computational Study of the Antioxidative Potential of Novel Nitro and Amino Substituted Benzimidazole/Benzothiazole-2-Carboxamides with Antiproliferative Activity, *Antioxidants* **8** (477) (2019) 1-22.

- [24] K. Huynh-Ba, Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development, Springer, 1st Edition, New York 2009., str. 1-2.
- [25] M. Jalžabetić, Analitički i regulatorni aspekt ispitivanja stabilnosti tableta od razvoja do odobrenja za stavljanje lijeka u promet, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2016.
- [26] C. T. Rhodes, B. Kommanaboyina, Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **25** (7) (1999) 857-868.
- [27] V. Mikulčić, Prisilna razgradnja torasemida i analiza razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2017.
- [28] M. Blessy, D. R. Patel, N. P. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **4** (3) (2014) 159-165.
- [29] ICH, <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (pristup: veljača 2020.)
- [30] Prisilna razgradnja, <https://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/37640-Forced-Degradation-to-Develop-Stability-indicating-Methods/> (pristup: veljača 2020.)
- [31] T. Loftsson, Drug Stability for Pharmaceutical Scientists, Academic Press Elsevier Inc., 1st Edition, Oxford 2014, str. 115.
- [32] D. W. Reynolds, K. L. Facchine, J. F. Mullaney, K. M. Alsante, T. D. Hatajik, M. G. Motto, Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies, *Pharmaceutical Technology* **26** (2) (2002) 48-56.
- [33] G. Ngwa, Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development, *Drug Delivery Technology* **10** (5) (2010) 56-59.
- [34] E. D. Nelson, P. A. Harmon, R. C. Szymanik, M. G. Teresk, L. Randal, A. Seburg, R. A. Reed, Evaluation of Solution Oxygenation Requirements for Azonitrile-Based Oxidative Forced Degradation Studies of Pharmaceutical Compounds, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **95** (7) (2006) 1527-1539.

- [35] S. W. Baertschi, K. M. Alsante, R. A. Reed, Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation, Informa Healthcare, 2nd Edition, Boca Raton 2011., str.17-41., 19-20.
- [36] F. Iram, H. Iram, A. Iqbal, A. Husain, Forced Degradation Studies- Mini Review, *J. Anal. Pharm. Res.* **3** (6) (2016) 1-5.
- [37] R. Jiben, Pharmaceutical Impurities- A Mini-Review, *AAPS PharmSciTech* **3** (2) (2002) 1-8.
- [38] L. Muller i suradnici, A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **44** (3) (2006) 198-211.
- [39] B. Prathap, A. Dey, G. S. Rao, T. Sundarrajan, S. Hussain, A Review on Impurity Profile in Pharmaceutical Substances, *Research and Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2** (3) (2013) 19-25.
- [40] M. Zelen, Prisilna razgradnja ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 2019.
- [41] A. K. Basak, A. S. Raw, A. H. Al Hakim, S. Furness, N. I. Samaan, D. S. Gill, H. B. Patel, R. F. Powers, L. Yu, Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications, *Advanced drug Delivery Reviews* **59** (1) (2007) 64-72.
- [42] Impurities in New Drug Products Q3B(R2), International Conference on Harmonisation 2006., str.4.
- [43] Impurities in New Drug Substances Q3A(R2), International Conference on Harmonisation 2006., str. 2-3.
- [44] U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry ANDAs: Impurities in Drug Substances, New Hampshire 2010., str. 1-7.
- [45] D. R. Allen, B. C. McWhinney, Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications, *The Clinical Biochemist Reviews* **40** (3) (2019) 135-146.
- [46] QTOF značenje, [https://en.wikipedia.org/wiki/Time-of-flight\\_mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/Time-of-flight_mass_spectrometry) (pristup: veljača 2020.)

- [47] R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd., First Edition, Chichester, West Sussex 2003., str. 7.
- [48] M. Cindrić, A. Marković, Spregnute tehnike tekućinski kromatograf–spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* **45** (3) (2009) 218-232.
- [49] Tekućinski kromatograf, <https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (pristup: ožujak 2020.)
- [50] Analiza, [https://www.msac1.org/2015\\_US\\_Long\\_Abstracts/201412170823\\_10980.pdf](https://www.msac1.org/2015_US_Long_Abstracts/201412170823_10980.pdf) (pristup: ožujak 2020.)
- [51] QTOF djelovi, <https://www.creative-proteomics.com/support/agilent-6540-uhd-quadrupole-time-of-flight-accurate-mass-mass-spectrometer.htm> (pristup: ožujak 2020.)
- [52] QTOF, slika <https://slideplayer.com/slide/4371973/> (pristup: ožujak 2020.)
- [53] T. Martin, User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool), EPA document, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 2016., str. 3., 8., 8-10.
- [54] ECHA, Praktični vodič-Kako koristiti i prijaviti (Q)SAR-ove 3.1., Europska agencija za kemikalije, Helsinki 2016. str. 1-37.
- [55] P. Hou, O. Jolliet, J. Zhu, M. Xu, Estimate ecotoxicity characterization factors for chemicals in life cycle assessment using machine learning models, *Environment International* **135** (2020) 1-12.
- [56] TEST (Toxicity Estimation Software Tool), [https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=243050](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=243050) (pristup: veljača 2020.)
- [57] QSAR modeli, <https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/When to Use QSAR for Chemical Substance Registration and Common QSAR Models.html> (pristup: veljača 2020.)
- [58] ChemDraw Professional, <http://www.cambridgesoft.com/Ensemble for Chemistry/details/Default.aspx?fid=14&pid=736> (pristup: veljača 2020.)



- [59] M. G. Barron, C. R. Jackson, J. A. Awkerman, Evaluation of in silico development of aquatic toxicity species sensitivity distributions, *Aquatic Toxicology* **116-117** (2012) 1-7.
- [60] T. Rawat, I. P. Pandey, Forced degradation studies for Drug Substances and Drug Products- Scientific and Regulatory Considerations, *J. Pharm. Sci. & Res.* **7** (5) (2015) 238-241.
- [61] S. Venkataraman, M. Manasa, Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products- a review, *Drug Invention Today* **10** (2) (2018) 137-146.
- [62] W. X. Wang, N. S. Fisher, Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates, *Science of The Total Environment* **237-238** (1999) 459-472.
- [63] J. López, A. Carballeira, Interspecific differences in metal bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes, *Hydrobiologia* **263** (1993) 95-107.
- [64] B. Beek, S. Bohling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Johncke, G. Studinger, The Assessment of bioaccumulation, *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer, Izdanje 2, Dio J, Berlin, Heidelberg 2000.
- [65] C. Franke, G. Studinger, G. S. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg, U. Jöhncke, The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere* **29** (7) (1994) 1501-1514.
- [66] R. C. Gupta, *Reproductive and Developmental Toxicology*, Academic Press, Elsevier Inc., First Edition, San Diego 2011., str. 207-218.
- [67] S. Korte, J. Bluemel, E. Schenck, G. Weinbauer, *The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment*, Academic Press, Elsevier Inc., First Edition, London 2015., str. 471-499.
- [68] Mutagenost,  
<http://www.caesarproject.eu/index.php?page=results&section=endpoint&ne=3>  
(pristup: srpanj 2020.)
- [69] Ames test,  
[https://www.trinova.de/genetic\\_toxicology.php?gclid=Cj0KCQjw0pfzBRCOARIsANi0g0sNNJZMrUWuN42i0V1VZ2SQfHNjh-ucWVz0RpQxo87WLqdO2pxbshwaAkj\\_EALw\\_wcB](https://www.trinova.de/genetic_toxicology.php?gclid=Cj0KCQjw0pfzBRCOARIsANi0g0sNNJZMrUWuN42i0V1VZ2SQfHNjh-ucWVz0RpQxo87WLqdO2pxbshwaAkj_EALw_wcB) (pristup: ožujak 2020.)

[70] F. Melnikov, J. Kostal, A. Voutchkova-Kostal, J. B. Zimmerman, P. T. Anastas, Assessment of predictive models for estimating the acute aquatic toxicity of organic chemicals, *Green Chemistry* **18** (16) (2016) 4432-4445.

[71] W. Föllmann, G. Degen, F. Oesch, J. G. Hengstler, Ames Test, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Academic Press, Elsevier Inc., Second Edition, London 2013., str. 104-107.

[72] National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals, London 2009., str. 1-34.

[73] E. L. Andrade, A. F. Bento, J. Cavalli, S. K. Oliveira, R. C. Schwanke, J. M. Siqueira, C. S. Freitas, R. Marcon, J. B. Calixto, Non-clinical studies in the process of new drug development- Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **49** (12) (2016) 1414-1431.

[74] Ponovljivost doze,  
<file:///C:/Users/PC/Downloads/Lecture+6++General+toxicology+testing++Rachel+Harland.pdf> (pristup: kolovoz 2020.)

[75] K. A. Ford, Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Toxicity Tests by Computational Methods, *ILAR Journal* **57** (2) (2016) 226-233.

## **7. ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na ukazanom povjerenju, svim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.*

*Također se zahvaljujem asistentici, mag. appl. chem Kristini Tolić na velikoj pomoći i podršci tijekom izrade laboratorijskog dijela rada.*

*Svakako se zahvaljujem i tehničarkama sa Zavoda za analitičku kemiju Tanji Ivančić i Slavici Kos na ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Velika hvala izv. prof. Tatjani Gazivodi Kraljević sa Zavoda za organsku kemiju na pomoći pri identifikaciji struktura razgradnih produkata.*

*Također se zahvaljujem dr.sc. Mislavu Runji na omogućenom pristupu Q-TOF-u te analizi uzoraka u tvrtki Pliva Hrvatska d.o.o. (R&D TAPI Istraživanje i Razvoj/ TAPI analitika).*

*Naposljetku, velika hvala i prof. dr. sc. Marijana Hranjec sa Zavoda za organsku kemiju na sintezi uzoraka čija se stabilnost ispitivala u ovom radu.*

## **8. SAŽETAK**

## **Ispitivanje stabilnosti amidnih derivata benzimidazola i benzotiazola te određivanje strukture njihovih potencijalnih razgradnih produkata spektrometrijom masa visoke razlučivosti**

Ispitivanja stabilnosti rutinska su kontrola prilikom proizvodnje novih farmaceutika koja se provode na aktivnim tvarima kao i gotovim proizvodima, a provode se u svrhu praćenja promjena tijekom proizvodnje i skladištenja koje mogu utjecati na njihovu djelotvornost, sigurnost i kvalitetu. Jedna od metoda ispitivanja stabilnosti je metoda prisilne razgradnje koja uz indikaciju stabilnosti tvari daje uvid u puteve razgradnje i omogućava karakterizaciju nastalih razgradnih produkata. Sami uvjeti ispitivanja prisilne razgradnje nisu u potpunosti regulirani, ali prema ICH smjernicama predlaže se da uključuju ispitivanja u otopinama različitih pH-vrijednosti, u prisutnosti kisika i svjetla te pri temperaturi od 40 °C ili višim.

Benzimidazoli i benzotiazoli su biciklički heteroatomski spojevi koji su zbog niza svojih svojstava (antitumorskih, antimikrobnih, protuupalnih, itd.) vrlo važni potencijalni biološki agensi. Upravo iz tog razloga, u ovom radu ispitana je stabilnost dva derivata benzotiazola (DMP-1 i DMP-2) te dva derivata benzimidazola (DMP-3 i DMP-4) pod utjecajem temperature (80 °C i 100 °C) i UV/VIS svjetla (500 Wh/m<sup>2</sup>), kao i podložnost oksidaciji (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), te kiseloj (0,5 M HCl) i lužnatoj (0,5 M NaOH) hidrolizi. Definiran je put razgradnje ispitivanih spojeva i predložene su strukture glavnih razgradnih produkata.

Za separaciju, identifikaciju te karakterizaciju ispitivanih spojeva korištena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana na spektrometar masa koji prati vremena preleta (2D-UHPLC-QTOF), a dobiveni razgradni produkti i putevi razgradnje grafički su predočeni *ChemDraw Professional* programom. Također je računalnim programom TEST (*Toxicity Estimation Software Tool*) procijenjena toksičnost ispitivanih spojeva i njihovih identificiranih razgradnih produkata.

**Ključne riječi:** ispitivanja stabilnosti, prisilna razgradnja, razgradni produkti, benzimidazoli, benzotiazoli, putevi razgradnje

## **9. ABSTRACT**

## **Stability testing of amide derivatives of benzimidazole and benzothiazole and determination of the structure of their potential degradation products by high-resolution mass spectrometry**

Stability testing are a routine control during the production of new pharmaceuticals that are carried out on active substances as well as finished products, and are carried out to monitor changes during production and storage that may affect the efficacy, safety and quality. One of the methods of stability testing is the method of forced degradation, which, along with the indication of the stability of the substance, gives an insight into the degradation pathway and enables the characterization of the formed degradation products. The conditions of the forced degradation test are not fully regulated, but according to ICH guidelines, it has been suggested to include tests in solutions of different pH values, tests in the presence of oxygen and light, and at temperature of 40 °C or higher.

Benzimidazoles and benzothiazoles are bicyclic heteroatomic compounds that are very important potential biological agents due to a number of their properties (antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory, etc.). In addition to that, in this paper the stability of two benzothiazole derivatives (DMP-1 and DMP-2) and two benzimidazole derivatives (DMP-3 and DMP-4) was examined under the influence of temperature (80 °C and 100 °C) and UV/VIS light (500 Wh/m<sup>2</sup>), as well as susceptibility to oxidation (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and acid (0.5 M HCl) and alkaline (0.5 M NaOH) hydrolysis. The degradation pathway of the test compounds is defined and the structures of the main degradation products are proposed.

For separation, identification and characterization of the tested compounds, ultra-high performance liquid chromatography connected to a time-of-flight mass spectrometer (2D-UHPLC-QTOF) was used, and the obtained degradation products and degradation pathways were graphically represented by the *ChemDraw Professional* program. The toxicity of the tested compounds and their identified degradation products was also estimated by the computer program TEST (*Toxicity Estimation Software Tool*).

**Keywords:** stability testing, forced degradation, degradation products, benzimidazoles, benzothiazoles, degradation pathway



## **10. ŽIVOTOPIS**

Vendi Barbir rođena je 16. 06. 1995. godine u Makarskoj. Osnovnu školu Vladimira Nazora u Pločama završava 2010. godine te svoje obrazovanje nastavlja u Općoj gimnaziji fra Andrije Kačića Miošića u Pločama. Godine 2016. upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Kemijsko inženjerstvo. Završila je sveučilišni preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva 17. rujna 2019. godine, obranom završnog rada na temu „Sorpcija trimetoprima na prirodne uzorke tla i sedimente“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović, te stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke kemijskog inženjerstva, s pohvalom (Cum Laude). U rujnu 2019. godine upisuje diplomski studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijske tehnologije i proizvodi. Korisnica je Državne stipendije za STEM područja tijekom 2. i 3. godine preddiplomskog fakultetskog obrazovanja. Na 1. godini diplomskog studija dodijeljena joj je Stipendija Grada Ploča u kategoriji Tehničkih zanimanja. Studentsku stručnu praksu odradila je 2018. godine u Mađarskoj, u odjelu za energetiku sektora za tehnologiju i razvoj tvrtke MOL Nyrt. U govoru i pismu služi se aktivno engleskim jezikom, a talijanskim i njemačkim jezikom samo osnovno. U računalnom radu aktivno se služi paketom *Microsoft Office*, a osnovno poznaje i računalne programe *Matlab*, *Octava*, *PI Vision*, *LabSolution* te *ChemCAD*.