

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA DROBNIČ

**DOLOČANJE STABILNOSTI SPOJIN IZ KNJIŽNICE  
ZAVIRALCEV TROMBINA S TEKOČINSKO  
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI**

DETERMINATION OF STABILITY OF COMPOUNDS FROM THE  
LIBRARY OF THROMBIN INHIBITORS WITH HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Ilaša, mag. farm. Spojine so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Janezu Ilašu, mag. farm., za pomoč in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge.*

*Zahvaljujem se tudi družini za vzpodbudo tekom študija, sošolcem za lepa študijska leta in prijateljem, ki so mi stali ob strani, posebno Jerci, Poloni in Maji.*

*Hvala Špeli za lektoriranje magistrske naloge.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Ilaša, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Lucija Drobnič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

# VSEBINA

VSEBINA.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO RAZPREDELNIC.....	IV
POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VII
1    Uvod .....	1
1.1 Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS) in knjižnice spojin.....	1
1.1.1 Vrste knjižnic spojin.....	2
1.2 Praktična priprava knjižnice spojin .....	3
1.2.1 Priporočila za pripravo vzorcev .....	3
1.3 Stabilnost spojin.....	4
1.3.1 Pomembnejše kemijske reakcije .....	5
1.4 HPLC-kromatografija .....	6
1.4.1 Tipi HPLC-kromatografije .....	7
1.4.2 Kromatografski parametri.....	8
1.5 Zaviralci trombina .....	9
1.5.1 Koagulacijska kaskada.....	10
1.5.2 Direktni zaviralci trombina (DIT) .....	10
2    Namen dela .....	16
3    Materiali in metode.....	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Aparature .....	17
3.3 Metode .....	17
3.3.1 HPLC-kromatografija .....	17

3.3.2 Masna spektrometrija.....	18
3.4 Eksperimentalno delo .....	18
4 Rezultati.....	20
4.1 Razvoj kromatografske metode .....	20
4.1.1 Optimizacija kromatografskih pogojev .....	22
4.2 Kromatogrami.....	23
4.2.1 Spojine z aminom ali ustreznim boc-em: .....	23
4.2.2 Spojine s kislino ali estrom.....	24
4.2.3 Spojine z benzamidoksimom ali benzamidinom .....	26
4.2.4 Ostali kromatogrami .....	28
4.3 Grafičen povzetek stabilnosti vzorcev .....	31
4.4 Ugotavljanje neznanih struktur z uporabo MS .....	32
5 Razprava .....	34
5.1 Stabilnost spojin.....	34
5.1.1 Spojine z boc-em ali ustrezni amini: .....	35
5.1.2 Spojine s karboksilno kislino ali ustreznim estrom: .....	36
5.1.3 Spojine z benzamidinom ali ustreznim benzamidoksimom: .....	38
5.1.4 Spojine s heterocikli .....	39
5.1.5 Skupina ostalo.....	43
5.2 Kromatografska metoda.....	43
5.3 Optimizacija pogojev .....	44
5.3.1 Knjižnica spojin in HTS .....	44
5.3.2 Uporaba MS, UHMS – masne spektrometrije izredno visoke ločljivosti ( <i>ultra high resolution mass spectrometry</i> ).....	44
6 Sklep.....	46
7 Literatura .....	47

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Delitev kemijskih reakcij .....	6
<b>Slika 2:</b> Koagulacijska kaskada .....	11
<b>Slika 3:</b> Mehanizem delovanja indirektnih in direktnih antikoagulantov .....	12
<b>Slika 4:</b> Dabigatran eteksilat .....	15
<b>Slika 5:</b> Grafični prikaz sestave mobilne faze v odvisnosti od časa. ....	20
<b>Slika 6:</b> Kromatogram vzorca FFA-132.....	21
<b>Slika 7:</b> Strukturi spojin FFA-158 (amin, zaščiten z boc-em) in FFA-159 (amin).....	23
<b>Slika 8:</b> Kromatograma vzorcev FFA-158 in FFA-159. ....	24
<b>Slika 9:</b> Strukturi spojin SJC-150 (etilni ester) in SJC-151 (karboksilna kislina). ....	25
<b>Slika 10:</b> Kromatograma vzorcev SJC-150 in SJC-151.....	25
<b>Slika 11:</b> Strukturi spojin SDJ-19/FFA-251 (etilni ester) in SDJ-20/FFA-252 (karboksilna kislina) .....	26
<b>Slika 12:</b> Kromatograma vzorcev SDJ-19 in SDJ-20. ....	26
<b>Slika 13:</b> Strukturi spojin FFA-137 (benzamidoksim) in FFA-138 (benzamidin).....	27
<b>Slika 14:</b> Kromatograma vzorcev FFA-137 in FFA-138. ....	27
<b>Slika 15:</b> Strukturi spojin FFA-131 (benzamidoksim) in FFA-132 (benzamidin).....	28
<b>Slika 16:</b> Kromatograma vzorcev FFA-131 in FFA-132. ....	28
<b>Slika 17:</b> Struktura spojine SDJ-27 z označenimi kiralnimi centri. ....	29
<b>Slika 18:</b> Kromatogram vzorca SDJ-27. ....	29
<b>Slika 19:</b> Struktura spojine FFA-143. ....	30
<b>Slika 20:</b> Kromatograma vzorca FFA-143 – spodnji prikazuje kromatogram z odštetim ozadjem, zgornji pa brez odštevanja ozadja. ....	30
<b>Slika 21:</b> Grafični prikaz števila vzorcev glede na odstotek AUC glavnega vrha. ....	31
<b>Slika 22:</b> Kromatogram celotnega ionskega toka in masni spekter vzorca FFA-158. ....	36
<b>Slika 23:</b> Strukturi spojin FFA-219 (karboksilna kislina) in FFA-218 (etilni ester). ....	37
<b>Slika 24:</b> Kromatogram celotnega ionskega toka masni spekter vzorca FFA-218. ....	38
<b>Slika 25:</b> Strukturi spojin FFA-259 (benzamidoksim) in FFA-260 (benzamidin).....	39
<b>Slika 26:</b> Kromatogram celotnega ionskega toka in masni spekter vzorca FFA-260. ....	39
<b>Slika 27:</b> Kromatogram vzorca FFA-187.....	43

## KAZALO RAZPREDELNIC

<b>Razpredelnica I:</b> Podatki o shranjevanju .....	4
<b>Razpredelnica II:</b> Delitev antitrombotičnih zdravil.....	10
<b>Razpredelnica III:</b> Prednosti in slabosti antagonistov vitamina K in direktnih zaviralcev trombina.....	13
<b>Razpredelnica IV:</b> Lastnosti direktnih zaviralcev trombina .....	14
<b>Razpredelnica V:</b> Odstotni prikaz deležev vzorcev glede na odstotek AUC glavnega vrha. .....	31
<b>Razpredelnica VI:</b> Seznam poznanih MM in podatkov spojin, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju struktur neznanih spojin. ....	33
<b>Razpredelnica VII:</b> Prikaz števila in odstotkov vzorcev glede na odstotek glavnega vrha. .....	34
<b>Razpredelnica VIII:</b> Razpredelnica heterociklov. ....	40

## POVZETEK

Trombotične motnje predstavljajo resno medicinsko stanje in so eden izmed pomembnih razlogov za smrt bolnikov. Izbira primernega antitrombotičnega zdravila je za bolnika bistvenega pomena, direktni zaviralci trombina pa predstavljajo novejšo možnost antitrombotičnega zdravljenja.

Namen magistrske naloge je bil določiti stabilnost knjižnice spojin zaviralcev trombina z uporabo reverzno-fazne tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

Vzorci knjižnice spojin, ki so bili stari od osem do dvanajst let, smo pripravili za testiranje in posneli kromatograme. Na stabilnost spojin v vzorcu smo sklepali na podlagi površine pod krivuljo vrhov na kromatogramu. S tem smo teoretično določili, ali je vzorec stabilen ali ne. Pri stabilnem vzorcu je najvišji vrh predstavljal nad 80 % celotne površine pod krivuljo, drugi najvišji vrh pa ni presegal 5 %. Vzorce smo glede na razlike v strukturi razdelili v pet skupin: strukture, ki so se razlikovale le v segmentu ester ali kislina, benzamidoksim ali benzamidin, amin ali amin zaščiten z boc-em, različen heterocikel in skupina ostalo. Na podlagi retencijskih časov in polarnosti spojin smo sklepali, kaj predstavlja glavni vrh na kromatogramu. Stabilnim vzorcem smo z uporabo masne spektrometrije potrdili prisotnost izhodne spojine v vzorcu. Ker so se nekaterim vzorcem med shranjevanjem izbrisale kode, nismo poznali njihove strukture. Obenem pa smo imeli nekaj kod s poznano strukturo, katerih vzorci so manjkali. Z uporabo masne spektrometrije smo želeli neidentificiranim vzorcem določiti strukturo glede na seznam poznanih manjkajočih vzorcev.

Le na podlagi testiranja s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti ne moremo z gotovostjo trditi, ali določen vrh predstavlja izhodno spojino ali ne. Ker smo posneli masne spektre primarnih vzorcev in ne ločenih spojin v vzorcu, lahko določimo le prisotnost spojine v vzorcu. Z uporabo le masne spektrometrije nismo mogli določiti strukture nepoznanim spojinam, lahko pa smo naredili seznam možnih struktur za določen vzorec. Teoretično smo določili, kateri izmed vzorcev so stabilni in kateri ne, za zanesljivejše rezultate pa bi morali uporabiti dodatne metode identifikacije.

**Ključne besede:** zaviralci trombina, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, knjižnica spojin, masna spektrometrija

## ABSTRACT

Thrombotic disorders present a serious medical condition and are one of the major causes of death in patients. Selecting a suitable antithrombotic treatment is essential for the patient, and direct thrombin inhibitors represent a newer option for antithrombotic treatment.

The aim of this thesis was to determine the stability of compounds from a library of thrombin inhibitors with reverse-phase high performance liquid chromatography.

Samples from the library, aged from eight to twelve years, were prepared for testing and the chromatograms were recorded. The stability of the compounds in a sample was presented based on area under the curve of peaks in the chromatogram. Thus, we theoretically determined whether the sample is stable or not. In stable samples, the highest peak represented more than 80 % of the total area under the curve; the second highest peak did not exceed 5 %. The samples were divided into five groups according to the differences in their structure: the structure which differed only in the segment of ester or acid; an benzamidoxime or an benzamidine; an amine or an amine protected with boc; a different heterocycle; and the group of others. Based on the retention times and the polarity of the compounds, we concluded what the principal peak in the chromatogram could represent. With mass spectrometry, we confirmed the presence of a compound in the stable samples. As some codes on the samples were erased during storage, structures of those samples were unknown. Additionally, we had some codes with known structure, but samples of those were missing. We wanted to determine the structure of unidentified samples, based on the list of known missing samples.

Based only on the high performance liquid chromatography, we cannot claim with certainty whether a particular peak on the chromatogram represents the starting compound or not. Since the mass spectres were recorded from the whole samples and not from separated compounds from the sample, only the presence of the starting compounds can be determined. By using mass spectroscopy, we could not exactly determine the structure of unknown compounds, but we made a list of possible structures for unidentified samples. We theoretically determined which samples are stable and which are not; nevertheless, for more reliable results, additional methods should be used.

**Keywords:** thrombin inhibitors, high performance liquid chromatography, a chemical library, mass spectrometry



## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>ADME</b>	absorpcija, porazdelitev, presnova, izločanje ( <i>angl. Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination</i> )
<b>AF</b>	atrijska fibrilacija
<b>AK</b>	aminokislina
<b>AUC</b>	površina pod krivuljo ( <i>angl. Area Under the Curve</i> )
<b>CMS</b>	kompaktni masni spektrometer ( <i>angl. Compact Mass Spectrometer</i> )
<b>DIT</b>	direktni zaviralci trombina
<b>DMSO</b>	dimetil sulfoksid
<b>ESI</b>	ionizacija z razprševanjem v električnem polju ( <i>angl. Electrospray Ionisation</i> )
<b>FD</b>	farmakodinamika
<b>FK</b>	farmakokinetika
<b>FO</b>	farmacevtska oblika
<b>GIT</b>	gastrointestinalni trakt
<b>HIT</b>	trombocitopenija, povzročena s heparinom ( <i>angl. Heparin-Induced Thrombocytopenia</i> )
<b>HMWK</b>	kininogen z visoko molekulsko maso ( <i>angl. High Molecular Weight Kininogen</i> )
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>angl. High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HTS</b>	rešetanje visoke zmogljivosti ( <i>angl. High-Troughput Screening</i> )
<b>INR</b>	mednarodno umerjeno razmerje ( <i>angl. International Normalized Ratio</i> )
<b>K</b>	retencijski faktor
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>MM</b>	molska masa
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>N</b>	število teoretskih podov/faktor učinkovitosti
<b>NMH</b>	nizkomolekularni heparini
<b>r</b>	faktor relativne retencije
<b>R</b>	resolucija
<b>RV-HPLC</b>	reverzno-fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

<b>SAR</b>	analiza odnosa med strukturo in delovanjem ( <i>angl. Structure-Activity Relationship</i> )
<b>SF</b>	stacionarna faza
<b>TQMS</b>	masni spektrometer s trojnim kvadrupolom ( <i>angl. Triple Quadrupole Mass Spectrometer</i> )
<b>t<sub>r</sub></b>	retencijski čas
<b>UHMS</b>	masna spektrometrija ultra visoke ločljivosti ( <i>angl. Ultra-High Resolution Mass Spectrometry</i> )
<b>UHPLC</b>	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti ( <i>angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>V<sub>M</sub></b>	mrtvi volumen
<b>V<sub>r</sub></b>	retencijski volumen
<b>ZU</b>	zdravilna učinkovina

# 1 Uvod

## 1.1 Rešetanje visoke zmogljivosti (HTS) in knjižnice spojin

Cilj farmacevtske industrije pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin je identifikacija kvalitetnih spojin vodnic. Uspeh je odvisen od narave tarče in izbrane vrste rešetanja. Za identifikacijo zadetkov lahko uporabimo rešetanje visoke zmogljivosti (HTS) raznolikih ali tarčnih knjižnic, fragmentno rešetanje ali virtualno rešetanje. V nadaljevanju se bomo osredotočili na HTS in različne tipe knjižnic, ki jih pri tem lahko uporabljamo (1).

HTS je metoda za identifikacijo novih farmakološko aktivnih spojin, ki deluje po principu preizkušanja in napak. Skupaj z racionalnimi pristopi oblikovanja spojin je odprlo nove poti za farmakološko raziskovanje. Obenem pa je razvoj HTS-ja pospešil tehnološki razvoj hitrih, poceni in avtomatiziranih bioloških eksperimentov, ki jih uporabljamo za HTS-rešetanje (2). Večja vlaganja in pospešeni razvoj HTS-ja so se začeli okoli leta 1990. Knjižnice so takrat redko presegle 100.000 spojin, rešetanje pa je potekalo nekaj mesecev (3). Dan danes pa je rešetanje 100.000 spojin na dan postalo rutina, knjižnice pa vsebujejo več kot milijon spojin (2).

Kemijske knjižnice, ki jih uporabljamo za odkrivanje novih zdravilnih učinkovin (ZU), vsebujejo kemijska ogrodja, katerih strukturo je možno sintezno izslediti. Izbrane spojine, zgodovinsko gledano in dan danes, so namenjene populaciji knjižnic in temeljijo na lahki sintezi in dostopnosti. Skozi čas je bilo z biološkimi testi zbranih veliko informacij o spojinah v knjižnicah. Ko se je pri iskanju novih ZU uveljavil HTS, so zbirke temeljile na biološko aktivnih farmakoforih; tako so nastale knjižnice spojin, ki so bile aktivne na številnih tarčah in receptorjih. Leta 1988 sta Evans in Merck uvedla izraz »privilegirana struktura« in tako poudarila visoko biološko aktivnost takšne spojine in tako začela graditi knjižnice, ki so temeljile na privilegiranih kemijskih ogrodjih. To so bili začetki označevanja/beleženja bioloških spojin in oblikovanja biološko usmerjenih kemijskih knjižnic. Drugi način povečevanja beleženja informacij o spojinah je pravilo Lipinskega oz. »pravilo števila 5«. Fizikalno-kemijske značilnosti spojin z dobro absorpcijo temeljijo na štirih parametrih, ki so večkratniki števila pet: molski masi, ki ni večja od 500 Da ( $5 \times 100$ ), lipofilnosti (izraženi z  $\log P$ ) –  $\log P$  ni večji od 5, donorjih H-vezi, ki jih ne sme biti več kot 5 in akceptorjih H-vezi, ki jih ne sme biti več kot 10 ( $2 \times 5$ ). To je privedlo do izraza »drug-likeness« (podobnost učinkovin), ki ga uporabljamo, ko govorimo o sestavi in oblikovanju osredotočenih knjižnic za fenotipska testiranja (4).

Med letoma 1981 in 2006 so našli 974 novih učinkovin, med njimi je bilo kar 60 % učinkovin razvitih iz spojin naravnega izvora. Če se osredotočimo le na protibakterijska zdravila in citostatike, pa delež predstavlja od 70 do 80 % (5). Testiranje ekstraktov naravnih produktov je s stališča HTS oteženo. Rešetanje je zahtevno z več vidikov - s časovnega vidika, z vidika dostopnosti virov in identifikacije aktivne spojine ekstrakta naravnega izvora. Naravne spojine je težko sintetizirati, kar preprečuje oziroma otežuje kemijsko derivatizacijo. Z razvojem kombinatorne kemije, z izboljšavami v organski sintezi, so postale dostopnejše večje knjižnice majhnih sinteznih spojin, ki zdaj predstavljajo vir za HTS. Napredek na kemijskem in strukturnem področju nam omogoča razširitev kemijskega prostora okoli aktivnih spojin s pomočjo kemijske derivatizacije. Še več, znanje o strukturnih značilnosti spojin v knjižnici nam omogoča, da s pomočjo kemoinformatike in analiziranja ter zbiranja podatkov povečamo učinkovitost HTS (6).

#### 1.1.1 Vrste knjižnic spojin

Knjižnice spojin so lahko različnih vrst:

1. Tarčno usmerjene knjižnice so usmerjene na tarčo ali družino tarč z znanim farmakoforom ali privilegiranim kemijskim ogrođjem. Ta ogrođja so pridobili tako iz preteklih eksperimentalnih podatkov o biološki aktivnosti, kot tudi z virtualnim rešetanjem usmerjenim proti ligandom ali strukturam. Namen teh knjižnic je povečati verjetnost zadetka ter razmerje stroškov in koristi s pomočjo rešetanja spojin z večjo verjetnostjo, da so aktivne glede na izbrano tarčo. Pogosto pokrivajo omejeno strukturno raznolikost in so usmerjene na manjše število kemijskih ogrođij, le-ta pa so substituirana na veliko mestih (4).
2. Fenotipsko usmerjene knjižnice predstavljajo najbolj biološko oziroma kemijsko raznolike knjižnice. Poseben poudarek je na fizikalno-kemijskih značilnosti spojin z namenom izboljšanja celične prehodnosti in topnosti. Pogosto pokrivajo širok spekter tarč in molekulskih procesov. Več let so pri sestavi upoštevali načelo, da so bile izbrane spojine čim bolj različne s stališča kemijskega ogrođja, 2D in 3D kemijske strukture in farmakofora. Raziskovalci so bili prepričani, da se kemijska raznolikost odraža tudi v biološki raznolikosti in da so posledično kemijsko raznolike knjižnice najbolj primerna odskočna deska za nadaljnje odkrivanje novih učinkovin. Vendar spojin vseeno niso izbirali čisto naključno, saj so ugotovili, da niso vsi deli kemijskega prostora enako biološko aktivni ali pomembni. To so nadgradili s

strategijami, ki direktno vključijo poznane biološke lastnosti spojin v zbirko spojin za rešetanje in to s povečanjem poznane biološke raznolikosti namesto s povečevanjem kemijske raznolikosti izbranih zbirk za rešetanje. Te metode so bile izvedljive zaradi veliko podatkov, ki so jih zbrali z rešetanjem in podatkov o biološki aktivnosti majhnih molekul, ki so jih v zadnjih letih objavili v zasebnih in javnih zbirkah. Zbirke spojin, ki so bile kemijsko in biološko najbolj različne, so imele največjo verjetnost za zadetek v več biokemijskih in celičnih rešetanjih. Natančneje, knjižnice spojin, ki so jih ustvarili na podlagi znanih podatkov o interakcijah med spojino in tarčo, so se izkazale za najbolj perspektivne (4).

3. Hipotezno usmerjene fenotipske knjižnice temeljijo na znanju o bioloških modelih/poteh, pridobljenem v študijah, prek virov iz bioinformatike in kemoinformatike z namenom, da med seboj povežejo bolezni, molekularne procese, poti in funkcije majhnih molekul (4). Podatkovne baze vsebujejo veliko uporabnih podatkov o spojinah, ki so v pomoč pri raziskovanju, npr. pri izbiranju začetnih spojin za rešetanje, identifikaciji »*off-target*« aktivnosti spojine, kar lahko predstavlja problem pri varnosti spojine, razlagi neželenih učinkov, predlogih za nove načine aplikacije že odkritih spojin, analizi odnosa med strukturo in delovanjem (SAR), oceni ADME (absorpcija, porazdelitev, presnova, izločanje) lastnosti spojine (7).

## 1.2 Praktična priprava knjižnice spojin

Pred začetkom testiranja je treba vzorce, oz. alikvotne vzorcev, prenesti iz mikrotitrskih ploščic knjižnice spojin (materinske ploščice) na nove, testne mikrotitrške ploščice (hčerinske ploščice) (8).

### 1.2.1 Priporočila za pripravo vzorcev

Pri pripravi vzorcev moramo biti pozorni na naslednja priporočila:

- v industriji je zaželeno, da se uporablja čim manjše količine učinkovine za vsako testiranje,
- v večini laboratorijev želimo prenesti vzorce iz čistega dimetil sulfoksida (DMSO) v vzorčke z majhnim volumnom (< 50 nL),
- koncentracija DMSO-ja mora biti čim nižja, za celično testiranje je zaželeno < 1 %,
- v večini primerov je zaželeno, da ohranimo koncentracijo vzorca čim višjo,
- če je vzorec predhodno razredčen v vodnem pufru, je vprašljiva integriteta vzorca,

- zaželeno je, da se testne ploščice pripravi z direktnim razredčevanjem, saj se s tem prihrani na učinkovini, korakih redčenja, denarju in času,
- zaželen je istočasen prenos vzorcev iz materinske ploščice, da prihranimo na času,
- uporaba mikrotitrskih ploščic s 96 ali še bolje s 384 ali 1536 vdolbinicami,
- spojine morajo biti kompatibilne z DMSO-jem,
- razpon volumna pri redčenju naj bo med 10–500 nL,
- izgube med redčenjem naj bodo čim manjše,
- zaželeno je nekontaktno redčenje vzorcev in
- kratek čas prenosa (< 1 min za ploščico s 384 vdolbinicami na enako ploščico) (8).

Včasih so vzorce shranjevali v obliki praškov in so morali regulirati predvsem vlago. Danes vzorce shranjujejo večinoma v obliki DMSO raztopin, posledično moramo biti pazljivejši pri shranjevanju predvsem s stališča temperature in prostora shranjevanja (Razpredelnica I) (3).

**Razpredelnica I:** Podatki o shranjevanju so omejeni, pojavili so se štirje tipi shranjevanja, prikazani v tabeli (povzeto po (3)).

Temperatura	lastnosti vzorca
+ 18 °C	vzorci, ki so raztopljeni v čistem DMSO-ju, so zamrznjeni in stopnja razpadanja je sprejemljiva
+ 4 °C	kontrola vsebnosti vode v DMSO-ju, da vzorci ostanejo tekoči
+ 4 °C	strožji nadzor vlage, da bodo vzorci, ki so absorbirali nekaj vlage, še vedno zamrznjeni
- 20 °C	vsi vzorci zamrznjeni, obenem pa zahteva suho atmosfero, da ne pride do nabiranja ledu na opremi; dolgo odtajanje vzorca pred njegovo uporabo

### 1.3 Stabilnost spojin

Stabilnost oziroma nestabilnost ZU v farmaciji pomeni padec vsebnosti ZU, ki je posledica kemijskih reakcij. ZU lahko razpade na toksičen produkt, lahko pride do estetskih sprememb (sprememba vonja, barve). Pri peroralnih ZU moramo preveriti tudi stabilnost pri pogojih, ki jih najdemo v gastrointestinalnem traktu (GIT), to je pomembno predvsem pri acidolabilnih ZU.

ZU, ki jih uporabljamo v farmaciji, imajo zelo raznolike kemijske strukture, zato so podvržene različnim razgradnim mehanizmom. Možne razgradne poti vključujejo hidrolizo,

dehidracijo, izomerizacijo in racemizacijo, eliminacijo, oksidacijo, fotodegradacijo in bolj zapletene interakcije s pomožnimi snovmi ali drugimi ZU. V nadaljevanju se bomo osredotočili na reakcije, ki so bolj verjetne za naš tip spojin. To pa je pomembno s stališča ugotavljanja stabilnosti naših vzorcev – ker so npr. estri podvrženi hidrolizi, bomo na podlagi retencijskih časov vzorca, ki vsebuje ester, in vzorca, ki vsebuje ustrezno kislino, lahko sklepali, ali je ester hidroliziral ali ne. Reakcije so povzete na shemi Slika 1 (povzeto po (9)).

### 1.3.1 Pomembnejše kemijske reakcije

#### Hidroliza

Večina farmacevtskih oblik (FO) pride v stik z vodo ali zračno vlago, zato je hidroliza ena izmed najbolj pogostih reakcij, kar zadeva farmacijo. Estri so zelo podvrženi hidrolizi, kar je bistvenega pomena pri ugotavljanju stabilnosti naših spojin, saj jih je kar nekaj v svoji strukturi vsebovalo ester.

Estri – klasični estri nastanejo z reakcijo med karboksilno kislino in alkoholom, ostali estri pa med karbamsko, sulfonsko ali sulfamsko kislino in alkoholom. Hidroliza pri teh estrih poteče z nukleofilnim napadom hidroksidnega iona.

Amidi – amidi so manj podvrženi hidrolizi kot estri, ker je karbonilni ogljik amidne vezi manj elektrofilen, izstopajoča skupina – amin – pa je slabša kot alkohol.

Imidi – imidi so pogosto v obliki obroča, ki se odpre, nato pa pride do nadaljnih kemijskih reakcij.

#### Izomerizacija in racemizacija

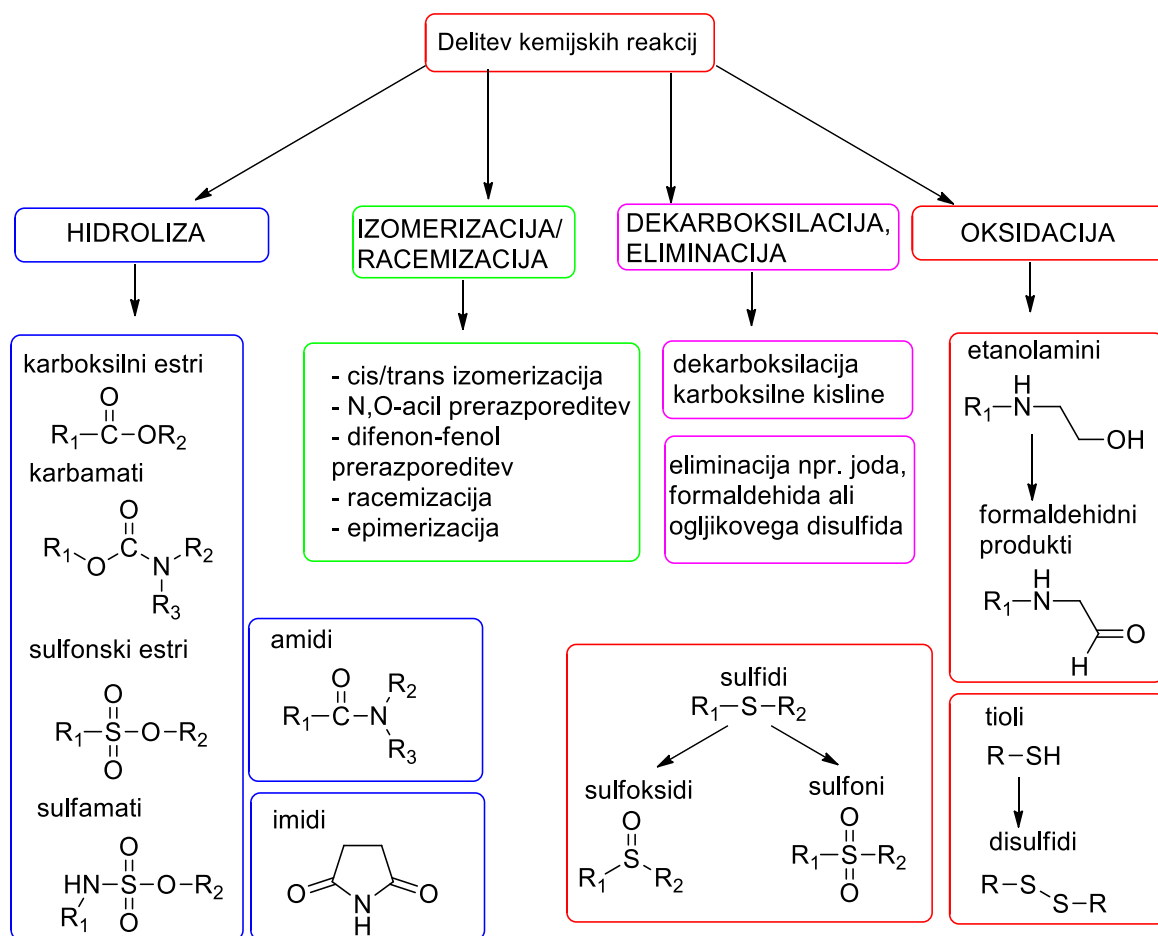
Pri zdravilnih učinkovinah opazimo cis-trans izomerizacijo, *N,O*-acil prerazporeditev in dienon-fenol prerazporeditev. Racemizacija in epimerizacija, reverzibilno pretvarjanje med optičnimi izomeri, sta pogosti pri zdravilnih učinkovinah.

#### Dekarboksilacija in eliminacija

Nekatere zdravilne učinkovine, ki imajo kislo karboksilno skupino, so dovzetne za dekarboksilacijo. Pri eliminaciji se eliminirajo različne spojine, kot so na primer formaldehid, jod in ogljikov disulfid.

## Oksidacija

Oksidacija je zelo pogosta razgradna pot zdravilnih učinkovin, saj so FO med obdelavo ali dolgotrajnim shranjevanjem izpostavljene kisiku. Mehanizem oksidacije je odvisen od kemijske strukture učinkovine in od prisotnosti reaktivnih kisikovih spojin ali drugih oksidantov. Kateholi oksidirajo do kinonov, etanolamini do formilnih produktov, tioli pa do disulfidov. Fenotiazidi oksidirajo po različnih mehanizmih do različnih končnih produktov. Nove učinkovine pogosto vsebujejo žveplov atom, ki je nagnjen k oksidaciji do ustreznih sulfoksidov ali sulfonov (9).



**Slika 1:** Delitev kemijskih reakcij, ki so lahko razlog za nestabilnost ZU (povzeto po (9)).

### 1.4 HPLC-kromatografija

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, je separacijska tehnika, ki spada med kromatografske metode. Vključuje injekcijo majhnega volumna tekočega vzorca v kolono, ki vsebuje majhne delce, in ji pravimo stacionarna faza (SF). Na reverzno-fazni koloni pride do ločbe, ker ima vsaka komponenta drugačen porazdelitveni koeficient med MF in delci SF, s črpanjem MF skozi



kolono, pa povzročimo, da se ravnotežje ves čas vzpostavlja. Posledično spojine, ki se boljše porazdelijo na stacionarni fazi, potrebujejo več časa, da se sperejo iz kolone. Razlika v času spiranja oziroma elucije pa je osnova HPLC-ločbe. Ločene komponente detektiramo na koncu kolone z detektorjem, ki meri njihovo količino. Rezultat te detekcije imenujemo kromatogram (10, 25-27).

Prednosti HPLC-kromatografije so, da je vsestranska – ločimo lahko spojine velike od 54 do 450 000 Da, uporabljamo jo lahko za analitske (vzorci v pg in nm), semi-preparativne (vzorci v µg in mg) ter preparativne namene (vzorci v gramih). Primerna je za vodne vzorce, termolabilne snovi, za ločbo in analizo je potrebno malo predpriprave vzorcev, uporabna tudi za čiščenje standardov. Negativna lastnost HPLC-kromatografije je cena – gre za razmeroma drag sistem – drage kolone, draga topila, problem z odpadnimi topili. Določene komponente niso primerne za HPLC-analizo, za nekatere pa poznamo sisteme, ki omogočajo boljšo ločbo, dosežemo lahko tudi boljšo občutljivost – za komponente v plinastem stanju uporabimo plinsko kromatografijo, za večje nabite molekule pa lahko uporabimo elektroforezo.

#### 1.4.1 Tipi HPLC-kromatografije

Glede na tip ločbe poznamo več tipov HPLC-kromatografije:

- Reverzno-fazna kromatografija (RF-HPLC) – uporabna za nepolarne, delno polarne in ionizirane molekule. SF je nepolarna (C18, C8, C3, fenil, vezan na silikagel ...), MF pa predstavlja voda (pufer) in organsko topilo, ki se meša z vodo (metanol, acetonitril).
- Normalno-fazna kromatografija – uporabna za spojine, občutljive na vodo, geometrijske izomere, cis-trans izomere, kiralne spojine. SF je polarna (silikagel), MF pa nepolarna (heksan, izooktan, metilenklorid, etil acetat).
- Ionsko-izmenjevalna kromatografija – uporabna za organske in anorganske anione ter katione. SF vsebuje ionske skupine (npr. sulfonske), MF pa predstavlja vodni pufer (npr. fosfatni, formatni).
- Izključitvena kromatografija – ločba ne temelji na interakcijah med komponentami vzorca in SF, ampak molekule difundirajo v pore medija, ki se nahaja v SF. Molekule se ločijo glede na velikost – ločba pa je odvisna od velikosti por. Molekule, ki so večje od por, ne difundirajo v pore in se posledično hitreje sperejo iz kolone, kot

manjše, ki difundirajo v porozen medij. Uporablja se predvsem za karakterizacijo polimerov in za proteine.

- Afinitetna kromatografija – zaradi visoke specifičnosti uporabljena pri čiščenju proteinov. Temelji na principu ključa in ključavnice – tarčno mesto na molekuli, ki jo hočemo ločiti, je ključ, prepoznavno mesto na SF pa je ključavnica. Ko se raztopina več spojin pomika po afinitetni koloni, se na koloni zadržijo le spojine, ki imajo tarčno mesto za določeno prepoznavno mesto na koloni. Ostale spojine se naenkrat eluirajo s topilom. Tarčno molekulo pa iz kolone speremo s spremembo pH, višjo koncentracijo soli ali molekulami, ki imajo podobno tarčno mesto (10).

#### 1.4.2 Kromatografski parametri

Kromatografski parametri, na katere moramo biti pozorni pri razvoju kromatografske metode (10, 11):

- Retencijski čas ( $t_r$ ) in volumen ( $V_r$ )

Meritev zadrževanja spojine na koloni lahko izrazimo kot retencijski čas ( $t_r$ ), ki je definiran kot čas, pri katerem ima vrh na kromatogramu svoj maksimum. Iz retencijskega časa lahko izračunamo (enačba 1) retencijski volumen ( $V_r$ ), kjer  $v$  predstavlja pretok mobilne faze,  $t_r$  pa retencijski čas.

$$V_r = v \times t_r \quad (\text{enačba 1})$$

- Retencijski faktor ( $k$ ) – znan tudi kot razmerje masne porazdelitve ( $D_m$ ) ali kapacitivni faktor ( $k'$ )

Retencijski faktor nam pove, kakšno je razmerje med količino raztopine na stacionarni fazi in količino raztopine na mobilni fazi. Retencijski faktor spojine na kromatogramu lahko izrazimo tudi s pomočjo spodnje enačbe (enačba 2):

$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M} \quad (\text{enačba 2})$$

V enačbi  $t_r$  predstavlja retencijski čas,  $t_M$  pa čas, ki ga potrebuje mobilna faza, da pride iz kolone. Namesto retencijskih časov lahko uporabimo tudi ustrezne volumne, kjer  $V_M$  imenujemo tudi mrtvi volumen – to je volumen, ki predstavlja volumen mobilne faze v koloni in predstavlja nujen volumen, da iz kolone speremo topilo vzorca. Ko ta mrtvi volumen pride iz kolone, to na kromatogramu vidimo kot majhno nihanje bazne linije najprej v pozitivno in nato v negativno smer.  $V_M$  je pomemben, saj nam omogoča, da normaliziramo

ločitvene parametre glede na različne dolžine kolon, obenem pa je dokaz, da je vzorec res bil naložen v injektor in nato v kolono.

- Relativna retencija

Faktor  $r$  je faktor relativne retencije in predstavlja relativno ločbo med dvema poljubnima vrhoma na kromatogramu. Faktor  $r$  ima vrednost večjo od 1, zato mora biti  $t_{R2}$  večji od  $t_{R1}$ . Izračunamo ga po spodnji enačbi (enačba 3):

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (\text{enačba 3})$$

- Število teoretskih podov ( $N$ )

S faktorjem učinkovitosti  $N$  (število teoretskih podov) izražamo stopnjo ostrine danega vrha. Dobimo ga, če delimo retencijski čas ali volumen izbranega vrha s širino vrha – izražena morata biti v enakih enotah (enačba 4). Pri tem izračunu lahko uporabljamo različne širine vrha, širino na sredini vrha ali širino na 10 % od bazne linije, širino  $5\sigma$ . Širino na polovici višine je lažje izmeriti, vendar simetrija vrha nanjo nima vpliva. Zato je širina  $5\sigma$  bolj natančna.

$$N = 5,42 \left( \frac{t_r}{W_{0,5}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (\text{enačba 4})$$

- Resolucija

Resolucijo izračunamo s spodnjo enačbo (enačba 5):

$$R = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h0,5\ 1} + W_{h0,5\ 2}} = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\left( \frac{W_1 + W_2}{2} \right)} \quad (\text{enačba 5})$$

in nam pove, kako dobro sta ločena dva vrhova. Resolucija je vedno večja od ena (pri  $R = 1$  vrhova ne bi bila ločena), želena pa je vrednost  $R > 2$ .

### 1.5 Zaviralci trombina

Bolezenska stanja, ki zahtevajo antitrombotično terapijo, predstavljajo resna medicinska stanja in so eden od pomembnih razlogov za smrt bolnikov. Trombotične motnje se pojavijo predvsem v žilah, srcu, možganih in pljučih. V srcu so pomembna stanja miokardni infarkt, bolezen srčnih zaklopk, nestabilna angina pectoris, atrijska fibrilacija in tudi stanja ob kirurških posegih na srcu. Trombotična stanja, ki se pojavijo v žilah, so globoka venska tromboza in periferna žilna bolezen. V pljučih je najpomembnejše stanje pljučna embolija,

v možganih pa možganska kap. Antikoagulantna terapija je indicirana za vsa navedena stanja (12–16).

Glede na to, da trenutno dostopna antitrombotična zdravila vplivajo le na določene specifične dele koagulacijske kaskade, je izbira primerne antikoagulantna za bolnika ključnega pomena. Odvisna je od bolnikove medicinske zgodovine in preteklega jemanja zdravil, starosti, lokacije krvnega strdka, kar je osnova za diagnozo stopnje bolezni in predstavlja cilj terapevtske intervencije (12). Delitev antitrombotičnih zdravil je prikazana v spodnji razpredelnici (Razpredelnica II).

**Razpredelnica II:** Delitev antitrombotičnih zdravil (povzeto po (12)).

Skupina	predstavniki (učinkovine)
<b>peroralni antikoagulanti</b>	kumarinski derivati (varfarin), indan-1,3-dioni (fenindion)
<b>antikoagulanti, ki temeljijo na heparinu</b>	visoko molekularni heparin (nefracioniran heparin), nizkomolekularni heparini (NMH) (ardeparin, dalteparin, enoksaparin ...), pentasaharidi (fondaparinuks)
<b>direktni zaviralci IIa</b>	hirudin, rekombinantni derivati hirudina (lepirudin, desirudin), bivalirudin, argatroban, dabigatran eteksilat
<b>direktni zaviralci Xa</b>	rivaroksaban, apiksaban
<b>zdravila, ki delujejo na trombocite</b>	zaviralci COX-1 (acetilsalicilna kislina, triflusal, indobufen), zaviralci fosfodiesteraze, dipiridamol, cilostazol, tiklopidin, klopidogrel, prasugrel, antagonisti glikoprotein IIb/IIIa receptorja (abciksimab, eptifibatid, tirofiban)
<b>trombolitiki</b>	prva generacija trombolitikov (streptokinaze – urokinaza), druga generacija (alteplaza, prourokinaza), tretja generacija (reteplaza, tenekteplaza)

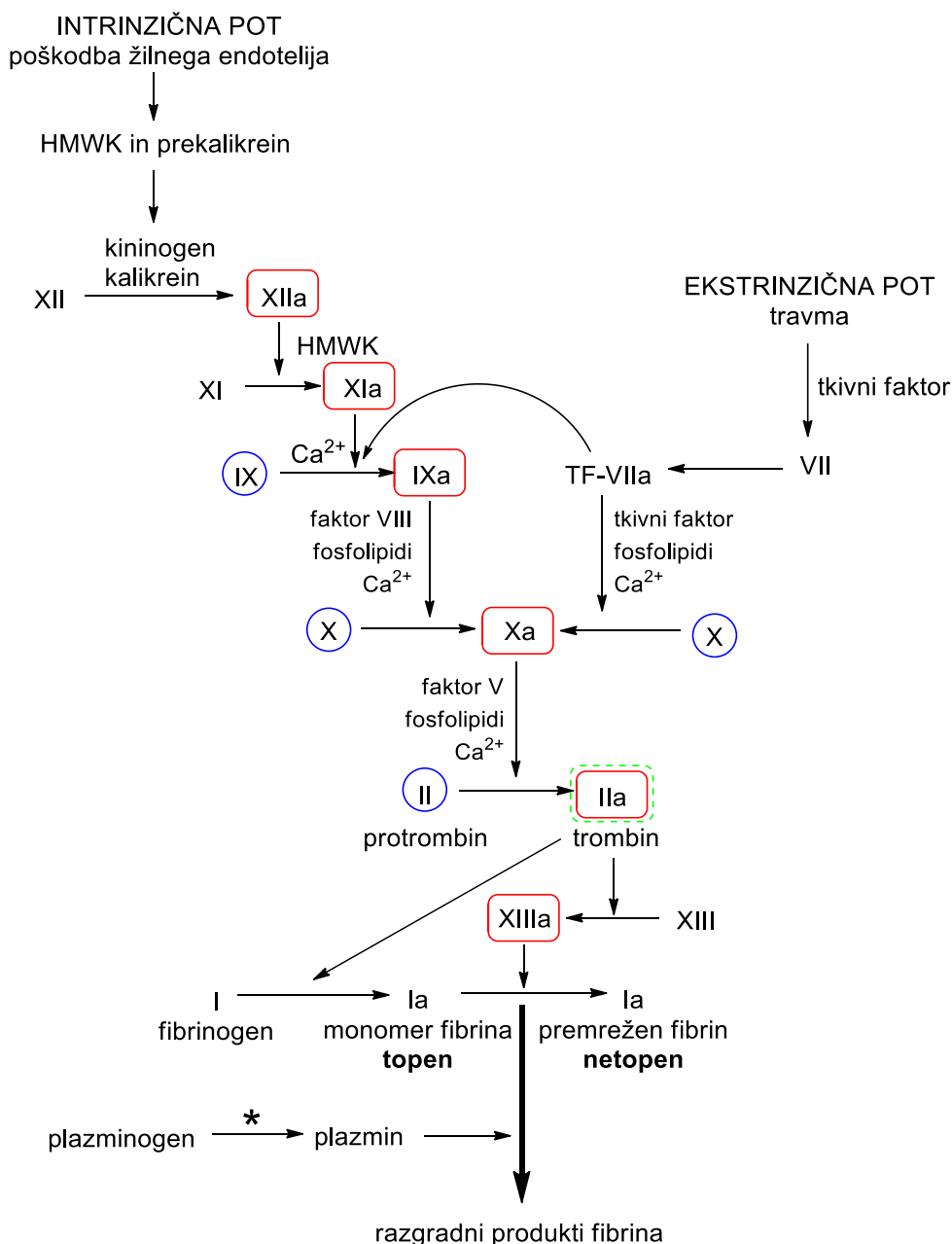
1.5.1 Koagulacijska kaskada

Nastanek krvnega strdka je posledica zapletene in precizne kaskade biokemijskih dogodkov. Kaskado delimo na dve poti, intrinzično in ekstrinzično pot, ali bolje s kontaktom aktivirano pot in pot tkivnega faktorja. Intrinzično pot sproži poškodba žilnega endotelija, ekstrinzično pa travma, torej poškodba celostne žilne stene (17). Spodnja shema (Slika 2) prikazuje koagulacijsko kaskado in mesta delovanja nekaterih zdravil.

1.5.2 Direktni zaviralci trombina (DIT)

Hirudin, spojina vodnica pri načrtovanju DIT-ov, je majhen protein iz 65 aminokislin (AK) in je bil prvotno izoliran iz žlez slinavk medicinske pijavke, *Hirudo medicinalis*. Ima močan

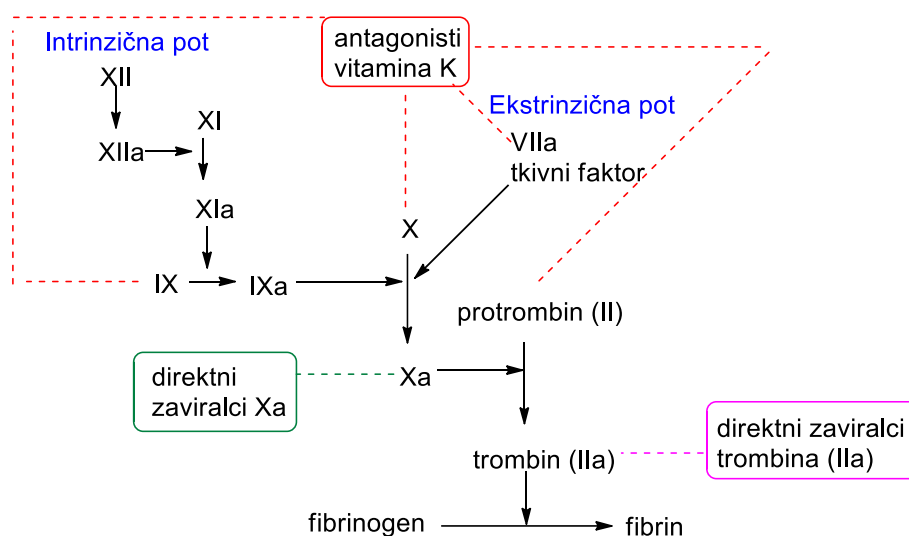
in specifičen inhibitorski učinek na trombin, učinek doseže s tvorbo 1:1 kompleksa s faktorjem koagulacije. Antikoagulantna aktivnost hirudina je najverjetneje povezana z njegovim precej negativno nabitim C-koncem. Predstavniki DIT-ov in njihove lastnosti so zbrani v spodnji razpredelnici. (Razpredelnica IV), mesto delovanja pa na shemi (Slika 3).



**Slika 2:** Koagulacijska kaskada (povzeto po (12)). (HMWK – kininogen z visoko molekularno maso (*High Molecular Weight Kininogen*), obkroženi faktorji – mesto delovanja varfarina in njemu sorodnih učinkovin; rdeči kvadratici - mesto delovanja heparinov; črtkasti zeleni kvadrat – trombin, mesto delovanja DIT; zvezdica – mesto delovanja trombolitičnih učinkovin)

### Mehanizem delovanja direktnih zaviralcev trombina

Mehanizem delovanja DIT-ov temelji na tem, da se vežejo in inaktivirajo tako prost trombin, kot tudi trombin, vezan na fibrin. V primerjavi s heparinom najdemo kar nekaj razlik: DIT, kot so lepirudin, bivalirudin in argatroban se direktno in reverzibilno vežejo na aktivno mesto trombina; za antikoagulantno aktivnost kot kofaktor ne potrebujejo aktivnega antitrombina III; zavirajo le aktivnost trombina (za razliko od heparina, ki zavira faktorje IIa, IXa, Xa, XIa in XIIa) (12). V spodnji tabeli so zbrane prednosti in slabosti DIT glede na antagoniste vitamina K. (Razpredelnica III)



**Slika 3:** Mehanizem delovanja indirektnih antikoagulantov (antagonistov vitamina K) in direktnih anti-IIa in anti-Xa antikoagulantov (povzeto po (17)).

\*Antagonisti vitamina K faktorja VIIa ne zavirajo neposredno, ampak preprečijo njegovo sintezo; enako velja za druge faktorje, ki so odvisni od vitamina K (II, IX, in X).

### Vezavno mesto direktnih inhibitorjev trombina

Poznamo tri domene, kamor se DIT vežejo in blokirajo aktivnost trombina: aktivno mesto (ali katalitično mesto) in dve dodatni domeni. Domena 1 služi kot mesto sidranja za substrate, kot je fibrin, in orientira primerne peptidne vezi v aktivnem mestu za biotransformacijo. Domena 2 pa je domena, kamor se veže heparin. DIT so lahko bivalentni (lepirudin, bivalirudin), ki trombin zavirajo v aktivnem mestu in domeni 1, ali enovalentni (argatroban), ki trombin zavirajo le prek aktivnega mesta (12).

**Razpredelnica III:** Prednosti in slabosti antagonistov vitamina K in direktnih zaviralcev trombina (povzeto po (13–18)).

<b>antagonisti vitamina K</b>	<b>direktni zaviralci trombina (dabigatran)</b>
<p><b>Prednosti:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- visoka biološka uporabnost</li> <li>- spremljanje učinka z INR (mednarodno umerjeno razmerje), regulacija odmerka glede na vrednosti INR</li> <li>- vitamin K je antidot</li> <li>- uporabno za bolnike vseh starostnih skupin</li> <li>- dolgotrajne klinične izkušnje z zdravili</li> <li>- poceni</li> </ul> <p><b>Slabosti:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- nepredvidljiva farmakokinetika (FK) in velika spremenljivost posameznega odmerka</li> <li>- veliko interakcij z drugimi zdravili</li> <li>- omejitve glede prehrane</li> <li>- pogosto spremljanje INR</li> <li>- ozko terapevtsko okno</li> <li>- počasen začetek in konec delovanja</li> <li>- dolg razpolovni čas (problem pri nujnih operacijah in krvavitvah, ki so posledica akumulacije zdravila v krvi)</li> <li>- kožne nekroze, ki se pojavijo zaradi antagonistov vitamina K, če jih uvedemo brez NMH</li> </ul>	<p><b>Prednosti:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- predvidljivi FK in farmakodinamika (FD)</li> <li>- malo interakcij z drugimi zdravili in hrano</li> <li>- brez omejitev glede prehrane</li> <li>- hiter začetek in konec delovanja</li> <li>- kratek razpolovni čas</li> <li>- splošno spremljanje terapije ni zahtevano (razen izjemoma)</li> <li>- široko terapevtsko okno</li> <li>- preklap iz terapije z NMH ali antagonistov vitamina K na DIT</li> <li>- uvedba DIT brez NMH – zaradi hitrega začetka delovanja ni tveganja za kožne nekroze</li> </ul> <p><b>Slabosti:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ni standardiziranega spremljanja delovanja zdravila</li> <li>- antidot ne obstaja</li> <li>- visoka cena</li> <li>- pomen bolnikove compliance in rednega jemanja zdravila je velik zaradi kratkega časa delovanja</li> </ul>

### Aktivno mesto trombina

Aktivno mesto trombina je oblikovano tako, da omogoča katalitično cepitev fiziološkega substrata, to je fibrinogena. V aktivnem mestu najdemo štiri podenote. S1 predstavlja specifičen hidrofobni žep, na svojem koncu vsebuje asparaginsko kislino, kar služi kot

prepoznavno mesto za bazični del verige aminokislin. V delu S2 aktivnega mesta vstavljena zanka okoli končnega dela Trp-60D blokira hidrofobi žep, ki lahko sprejme večji alifatski končni del, kot je npr. valin ali prolin. Del S3 je ploski del in je izpostavljen topilu. Del S4 je zopet hidrofoben (12).

**Razpredelnica IV:** Lastnosti direktnih zaviralcev trombina (povzeto po (12)).

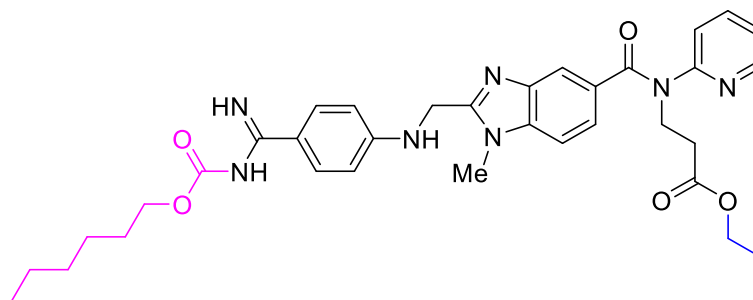
Delitev DIT	Način inhibicije	Sestava ZU	Indikacije	Način aplikacije
<b>Rekombinantni derivati hirudina (lepirudin, desirudin)</b>	bivalentna ireverzibilna inhibicija	65 AK z razlikami glede na hirudin	- trombocitopenija, povzročena s heparinom (HIT) - HIT s trombotičnim sindromom	lepirudin – intravenska injekcija, nato infuzija desirudin – subkutano
<b>Bivalirudin</b>	reverzibilni zaviralec	20 AK dolg peptid	- nestabilna angina pectoris pri izvajanju perkutane koronarne intervencije	intravenska bolusna injekcija, nato infuzija
<b>Argatroban</b>	reverzibilni enovalentni zaviralec	peptidomimetik	- profilaksa in zdravljenje tromboze pri bolnikih s HIT	subkutano
<b>Dabigatran eteksilat</b>	reverzibilni zaviralec	nepeptidomime -tično predzdravilo (metabolizira se do dabigatrana)	- preprečevanje možganske kapi in nastanka krvnih strdkov pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo (AF) - zdravljenje venskega tromboembolizma pri operaciji kolka ali kolena	peroralno



### Dabigatran eteksilat

Dabigatran eteksilat je peroralno aktiven DIT. Je nepeptidomimetično predzdravilo, ki se metabolizira do dabigatrana, bazičnega benzamidinskega derivata, ki predstavlja reverzibilen DIT. Dabigatran eteksilat ima hiter začetek delovanja in se hitro pretvori v dabigatran. Dabigatran je zaradi močno bazične amidinske skupine dokaj hidrofilen in pri fiziološkem pH-ju v obliki nabite molekule. Posledično se po peroralni aplikaciji ne absorbira. Eteksilat pa je manj bazičen, absorbira se v želodcu in tankem črevesju, vendar za absorpcijo potrebuje kislo okolje. Da dosežemo kislo mikrookolje, dabigatran eteksilat obložimo na pelete iz vinske kisline, kar ustvari kislo okolje in omogoča absorpcijo in zmanjša odstopanje zaradi različnega gastričnega pH-ja pri posamezniku. Zaradi majhne biološke uporabnosti (okoli 6,5 %), so odmerki visoki (75 – 150 mg 2×/dan). Okoli 80 % dabigatrana se nespremenjenega izloči prek ledvic, ostanek pa se v obliki acilglukuronida izloči prek žolča. Nima klinično pomembnih interakcij z drugimi zdravili, ki se presnavljajo prek izoenzima P450, zato prilagajanje odmerka in spremljanje koagulacije ni potrebno. Ker se večinsko izloča prek ledvic, ni primeren za bolnike z ledvičnim popuščanjem, odmerki pa prilagajajo glede na očistek kreatinina. Glavni neželeni učinek so gastrointestinalne krvavitve (12).

Struktura dabigatran eteksilata je prikazana na spodnji sliki (Slika 4).



**Slika 4:** Dabigatran eteksilat predstavlja dvojno predzdravilo – karbamat (vijolični del) in ester (modri del) se odcepita, da dobimo aktivno obliko dabigatrana. Cepitev estra poteče tako hitro, da ga v plazmi ne detektiramo (povzeto po (12)).

## 2 Namen dela

Namen naloge je določiti stabilnost zaviralcev trombina v knjižnici spojin z uporabo HPLC-kromatografije in masne spektrometrije.

Obstoječo knjižnico bomo uredili, zbrali podatke, jih preverili in jih podali na bolj pregleden in uporaben način.

Določili bomo ustrezno metodo za analizo stabilnosti oz. čistosti vzorcev s HPLC.

Posneli kromatograme za vse vzorce in določili čistost posameznih vzorcev.

Ocenili bomo stabilnosti vseh vzorcev z uporabo HPLC-metode.

Potrdili in določili bomo strukture izbranih spojin v vzorcih z uporabo masne spektrometrije.

Izvedli bomo zanesljivejšo oceno stabilnosti in čistosti izbranih vzorcev z interpretacijo HPLC-rezultatov.

Spojine, ki bodo izkazovale ustrezno čistost bomo prenesli v novo sodobno knjižnico spojin, ki bo primerna za avtomatsko, robotizirano uporabo.

## 3 Materiali in metode

### 3.1 Materiali

- Vzorci – za ugotavljanje stabilnosti spojin smo uporabili vzorce, ki so bili stari od osem do dvanajst let. Spojine so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorci so bili shranjeni v hladilniku, nekateri so bili v tekočem, drugi pa v trdnem agregatnem stanju, odvisno od vsebnosti vode v DMSO-ju. Vzorci predstavljajo potencialne zdravilne učinkovine – direktne zaviralce trombina.
- DMSO – Sigma-Aldrich, ZDA; čistost > 99,7 %
- Ultra čista demineralizirana voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10
- Trifluoroocetna kislina – Merck Milipore, ZDA; čistost > 99,8 %
- Acetonitril – Sigma-Aldrich, ZDA; čistost > 99,8 %

### 3.2 Aparature

- Polavtomatske pipete – Biohit, Finska (0,5-10  $\mu$ L, 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L)
- Centrifuga – Tehtnica, Centric 400R
- HPLC – instrument Agilent Technologies 1100, detektor G1365B UV-VIS, termostat G1316A, avtomatski vzorčevalnik G1313A, kvarтерна črpalka G1311A, razplinjevalec G1379A, avtomatski zbiralec frakcij G1364A.
- MS – Advion expression CMS, tip ionizacije ESI z enojnim kvadrupolnim masnim analizatorjem v pozitivni in negativni ionizaciji.

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 HPLC-kromatografija

Za ugotavljanje stabilnosti vzorcev smo uporabili reverzno-fazno HPLC-kromatografijo. HPLC-analizo smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies 1100. Kolona, ki smo jo uporabili, je bila Eclipse plus C18; 5  $\mu$ m (4,6 mm  $\times$  150 mm), pretok 1,0 mL/min, volumen injiciranja 20  $\mu$ L. Mobilno fazo je predstavljala 0,1 % trifluoroocetna kislina v vodi, gradientno pa smo spreminjali delež acetonitrila v MF – 2 min 5 %, 8 min 50 %, 14 min 90 %, 15 min 95 %. Čas analize je bil 18 min pri sobni temperaturi. Referenčna valovna dolžina je bila 360 nm, merjena valovna dolžina pa 254 nm.

### 3.3.2 Masna spektrometrija

Izbrane vzorce smo analizirali tudi na masnem spektrometru *Advion expression CMS* (kompaktni masni spektrometer), za tip ionizacije smo izbrali ESI (ionizacija z razprševanjem v električnem polju). Uporabili smo dušik, primeren za MS (oznaka 4.8, N<sub>2</sub> > 99,998 %; O<sub>2</sub> < 6 ppm; H<sub>2</sub>O < 8 ppm; CH<sub>4</sub> < 0,5 ppm), s pretokom 7 L/min. Masni analizator je predstavljal enojni kvadrupol, izbrali smo pozitivno in negativno ionizacijo, razpon razmerja m/z smo določili od 50 do 800. Vzorec smo pripravili za masno analizo in ga ročno injicirali v masni spektrometer. Volumen injiciranja je bil 5 µL.

MS meritve smo izvajali pod sledečimi pogoji:

- razpon m/z od 50 do 800
- negativna in pozitivna ionizacija
- tip ionizacije ESI, kapilarna napetost 3500 V.

### 3.4 Eksperimentalno delo

Prva stopnja dela je bila identifikacija kod na vzorcih, kar je bilo oteženo, saj so bile nekatere kode izbrisane ali slabo vidne. Za vzorce, sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo, prvotno ni bilo mišljeno, da bodo sestavljali knjižnico spojin. Zato niso bili ustrezno pripravljene, označeni, za tako dolgo shranjevanje. Ker ne vemo, če bomo vzorce, ki jih pripravljamo, še kdaj uporabili za testiranja in nadaljnji razvoj, je lahko to dobra motivacija, da mislimo širše in v označevanje in shranjevanje vložimo več časa.

Imeli smo 309 vzorcev, ki so bili osem do dvanajst let shranjeni v hladilniku – nekatere spojine so se med vzorci podvajale. Prvotna koncentracija vzorcev je bila 10 mM, za HPLC-analizo pa smo jih redčili na 0,1 mM (faktor redčitve je bil 100). Potek priprave vzorcev za HPLC-testiranje:

1. Centrifugiranje vzorcev (sobna temperatura, 2.000 obratov na minuto, 15 sekund).
2. V novo epico smo odpipetirali 990 µL bidestilirane vode in ji dodali 10 µL vzorca.
3. Centrifugiranje razredčenega vzorca (sobna temperatura, 18.000 obratov na minuto, 15 minut).
4. 900 µL razredčenega vzorca smo odpepitirali v vialo za HPLC-testiranje.

Prvo centrifugiranje je bilo namenjeno le usedanju delcev, ki so bili v vzorcu, centrifugiranje razredčenih vzorcev pri visokih obratih pa smo izvedli namesto filtriranja, kar je pomemben korak priprave vzorcev za HPLC-testiranje.

V primeru, da je bilo vzorca manj kot 500  $\mu\text{L}$ , smo 1  $\mu\text{L}$  vzorca z bidestilirano vodo redčili na 300  $\mu\text{L}$  in za HPLC-testiranje odpipetirali 270  $\mu\text{L}$ , centrifugiranje je potekalo pod enakimi pogoji, kot so navedeni zgoraj. Tako smo dobili vzorce s koncentracijo 0,033 mM za HPLC-analizo.

Razredčene vzorce smo testirali s HPLC-kromatografijo in iz masnih spektrov sklepali na čistost oziroma stabilnost vzorcev. Na čistost vzorcev smo sklepali iz deleža vrhov AUC (površine pod krivuljo) na kromatogramu.

Vzorce iz obstoječe knjižnice spojin, katerih glavni vrh je imel AUC nad 80 %, glavni razpadni produkt oz. nečistota pa ni presegala 5 %, smo 10-krat redčili z DMSO-jem – 810  $\mu\text{L}$  DMSO smo dodali 90  $\mu\text{L}$  vzorca. Ti vzorci s koncentracijo 1 mM raztopine v DMSO-ju sestavljajo knjižnico spojin, kar predstavlja zaključek našega praktičnega dela.

Iz povezave med strukturo spojin in njihovimi kromatogrami smo sklepali na stabilnost testiranih vzorcev. Določenim spojinam (nekaterim, ki so se izkazale za čiste, in spojinam, katerih strukture so bile nepoznane) smo z masnim spektrometrom posneli masne spektre. Posneli smo masne spektre primarnih vzorcev, metoda pa ni bila vezana na HPLC.

Priprava vzorcev za MS:

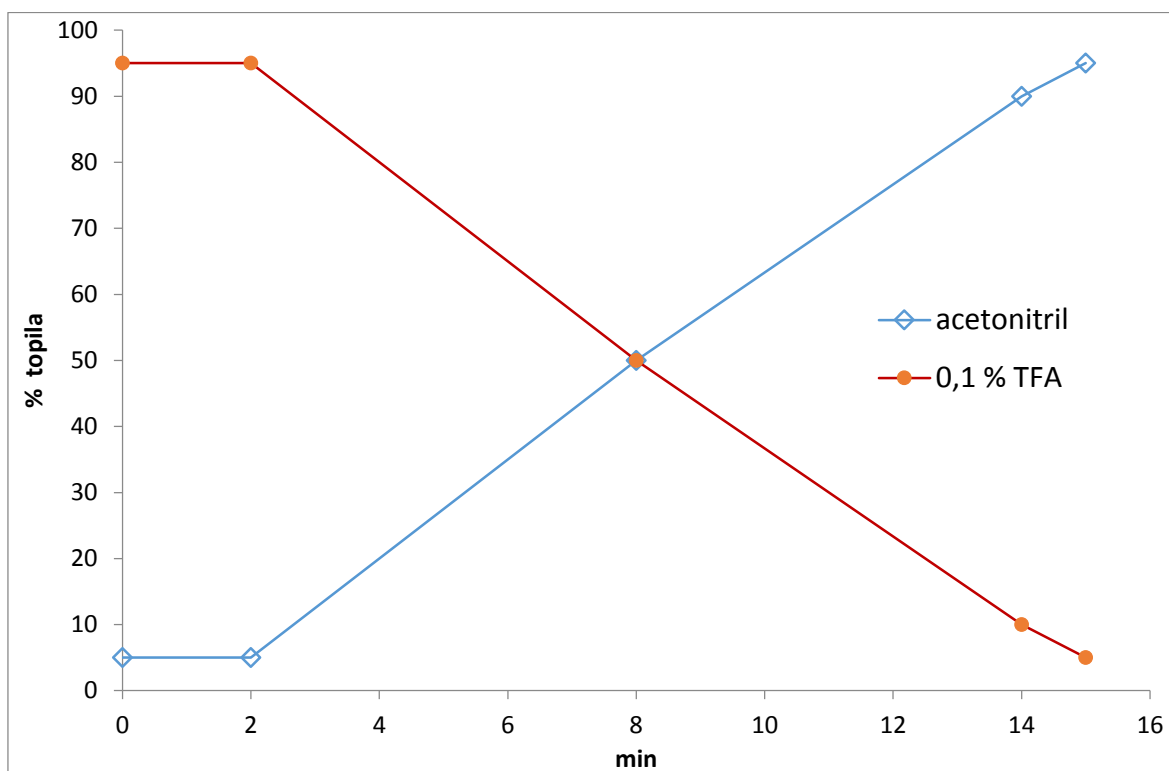
1. 2  $\mu\text{L}$  prvotnega vzorca smo dodali 398  $\mu\text{L}$  metanola (faktor redčenja 200).
2. Razredčen vzorec smo premešali na vortexu.
3. Snemanje masnega spektra.

Posneli smo masne spektre nekaterih vzorcev, za katere smo s HPLC-kromatografijo določili, da so stabilni oz. čisti. Tako smo potrdili prisotnost izhodne spojine v vzorcu. Posneli smo tudi masne spektre vseh neidentificiranih vzorcev. Naredili smo seznam struktur in njihovih molskih mas manjkajočih vzorcev in skušali na podlagi molskih mas uskladiti neidentificirane vzorce s poznanimi strukturami.

## 4 Rezultati

### 4.1 Razvoj kromatografske metode

Glede na fizikalno-kemijske lastnosti spojin (polarnost in ioniziranost) smo se odločili za reverzno-fazno HPLC-metodo. Stacionarna faza je pri kromatografiji RF-HPLC nepolarna, mobilna faza pa polarna. Potrebovali smo univerzalno metodo, ki bi jo lahko uporabili za vse oziroma čim več naših vzorcev. Nekateri vzorci so bili v obliki soli, nekateri pa v nevtralnem obliki; večina jih je izkazovala bazičen značaj, zato smo se odločili za kislno mobilno fazo, predstavljala jo je trifluoroocetna kislina (0,1 % raztopina v vodi). S tem smo dosegli, da so bile vse bazične spojine v obliki soli in so izkazovale bolj podobne lastnosti. Polarni mobilni fazi smo gradientno dodajali acetonitril – 2 min 5 %, 8 min 50 %, 14 min 90 %, 15 min 95 %. Z zelo polarno MF dosežemo, da se bolj nepolarne spojine močno vežejo na SF, z acetonitrilom, ki je manj polaren od vode, pa dosežemo spiranje iz kolone in njihovo ločbo. Obenem tudi skrajšamo retencijski čas, s spreminjanjem deleža acetonitrila dosežemo željeno ločbo. Na spodnjem grafu (Slika 5) je prikazana sestava mobilne faze v odvisnosti od časa.



**Slika 5:** Grafični prikaz sestave mobilne faze v odvisnosti od časa.

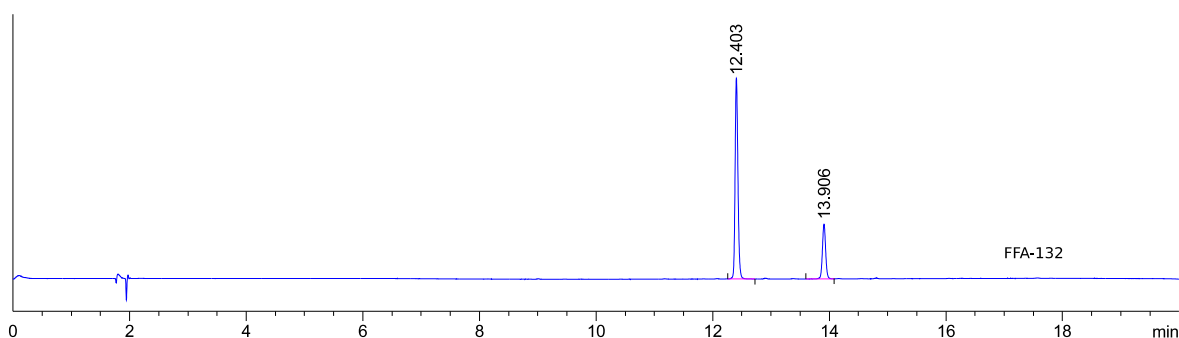
Stabilnost oziroma čistost vzorcev smo določevali glede na AUC najvišjega vrha, med seboj pa smo najpogosteje primerjali po dve spojini, ki sta se razlikovali le v eni funkcionalni

skupini na strukturi. Med seboj smo primerjali retencijske čase in glede na polarnost spojin, ki smo ju primerjali, določili, če izbrani vrh teoretično lahko predstavlja izhodno spojino ali ne. Zato je bila enotna metoda za vse vzorce bistvenega pomena, da so bili retencijski časi vseh vzorcev med seboj primerljivi.

Pozorni smo bili tudi na kromatografske parametre, s katerimi smo vrednotili kromatografsko metodo. V uvodu smo teoretično opisali kromatografske parametre, v tem poglavju pa se bomo osredotočili na njihov praktičen pomen pri določanju HPLC-metode.

- Relativna retencija

Faktor  $r$  predstavlja relativno ločbo med dvema poljubnima vrhoma na kromatogramu – za spojini na spodnjem kromatogramu (Slika 6) je  $r = 1,14$ .



**Slika 6:** Kromatogram vzorca FFA-132.

- Število teoretskih podov ( $N$ )

Faktor učinkovitosti za višji vrh je  $N_A = 8,93 \times 10^5$ , za nižji vrh pa  $N_B = 8,83 \times 10^5$ .

- Faktor resolucije

Resolucija za vrhova na zgornjem kromatogramu (Slika 6) je  $R = 26,91$ .

V literaturi (10) zasledimo tudi slednjo enačbo za resolucijo (enačba 6), kjer lahko boljše vidimo, kako spreminjanje kromatografskih parametrov vpliva na faktor resolucije.

$$R = \frac{1}{4} \left( \frac{r-1}{r} \right) \sqrt{N} \frac{k}{1+k} \quad (\text{enačba 6})$$

$N$  se v formuli pojavi kot kvadratni koren, torej tudi velike spremembe faktorja učinkovitosti povzročijo majhen vpliv na resolucijo. Če je vrednost  $k$ -ja nizka, imajo že majhne spremembe velik vpliv, pri velikih vrednostih  $k$ -ja (nad 8), pa spremembe  $k$ -ja nimajo velikega vpliva na čas zadrževanja spojine. Največji vpliv na resolucijo ima  $r$ , vendar

praktično težko predvidimo, kakšen vpliv na vrhove bo imela določena sprememba pogojev, ki vplivajo na  $r$ . Zato pri razvoju metode za zeleno ločbo najprej spreminjamo  $N$ , zavedajoč se, da je njegov vpliv dokaj majhen, nato bomo k poizkušali spraviti na čim višjo vrednost. Če zelena stopnja ločbe še ni dosežena, spreminjamo še faktor  $r$ .

Glede na zelene vrednosti kromatografskih parametrov in vrednosti, ki smo jih določili na dobljenih kromatogramih naših vzorcev, je določena HPLC-metoda izkazovala dovolj dobre karakteristike za našo nadaljnjo analizo.

#### 4.1.1 Optimizacija kromatografskih pogojev

Pri določanju HPLC-metode je bil naš glavni cilj določiti čim bolj univerzalno metodo, ki bi dala zadovoljive rezultate pri testiranju čim več vzorcev. Zaradi količine vzorcev, ki smo jih imeli, smo določili metodo, ki je sicer dajala zadovoljive rezultate, vendar bi z optimizacijo pogojev za vsak vzorec posebej, lahko dobili še boljše rezultate.

- Izbira mobilne faze

Z izbiro mobilne faze vplivamo na čas zadrževanja spojine in posledično na resolucijo. Če bi povečali razliko v polarnosti med mobilno in stacionarno fazo, bi podaljšali čas zadrževanja spojin, katerih polarnost je bolj podobna polarnosti stacionarne faze, v našem primeru torej bolj nepolarnim spojinam. Te spojine bi zaradi daljšega časa zadrževanja in pojava difuzije imele širše vrhove. Obratno pa lahko dosežemo, če razliko v polarnosti zmanjšamo – spojine se iz kolone sperejo hitreje, vrhovi so bližje skupaj, vendar ostanejo ozki.

- Pretok

Ločba je odvisna tudi od pretoka. Če zmanjšamo pretok, se vrhova bolje ločita. Vendar je treba najti dober kompromis med pretokom in ločbo in sicer s časovnega vidika in vidika učinkovitosti. Pri večjih pretokih učinkovitost pade. V literaturi smo našli podatek, da se bo v primeru, da razpolovimo pretok, ločba povečala za približno 40 % (10).

- Uporaba gradienta

Delež acetonitrila vpliva na čas zadrževanja naših spojin. Začeli smo samo s trifluoroocetno kislino, po 2 minutah smo imeli 5 % acetonitrila, po 8 minutah 50 %, po 14 minutah 90 % in po 15 minutah 95 % acetonitrila. Če bi acetonitril začeli dodajati v



večjih količinah hitreje, bi dobili drugačno ločbo, saj bi se spojine hitreje sprale iz stacionarne faze. Lahko bi celo začeli z mobilno fazo, ki bi vsebovala npr. 25 % acetonitrila. Tudi to bi skrajšalo retencijske čase spojin. Dolgi retencijski časi niso zaželeni, saj podaljšajo čas analize, obenem pa lahko pride do širših vrhov zaradi difuzije.

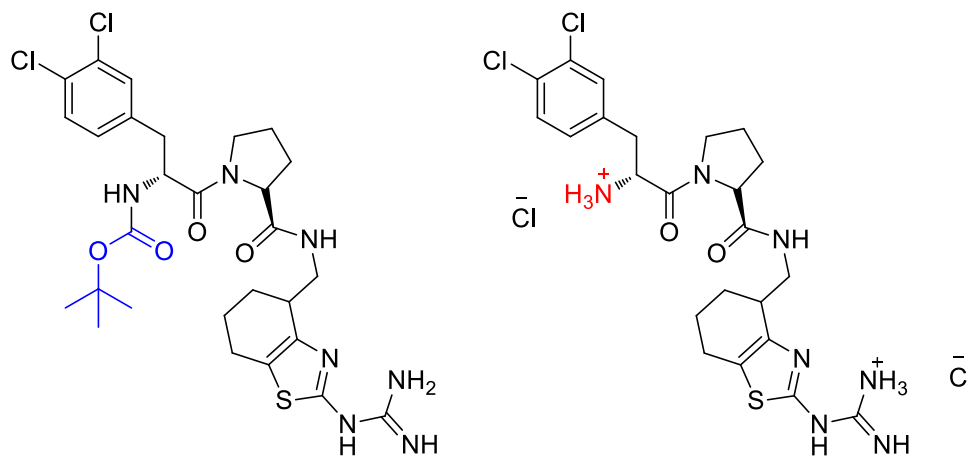
- Uporaba UHPLC

Za dosego boljše ločbe, bi se lahko odločili tudi za UHPLC – tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (*ultra-high performance liquid chromatography*). Uporaba stacionarne faze, katere delci so manjši od 2  $\mu\text{m}$ , se odraža v boljši ločbi, kot jo dosežemo pri klasični HPLC-metodi. Ker so delci SF manjši, moramo uporabiti višji tlak, kar se odraža v krajšem času zadrževanja spojine, obenem pa ohranimo dobro ločbo (19, 20).

## 4.2 Kromatogrami

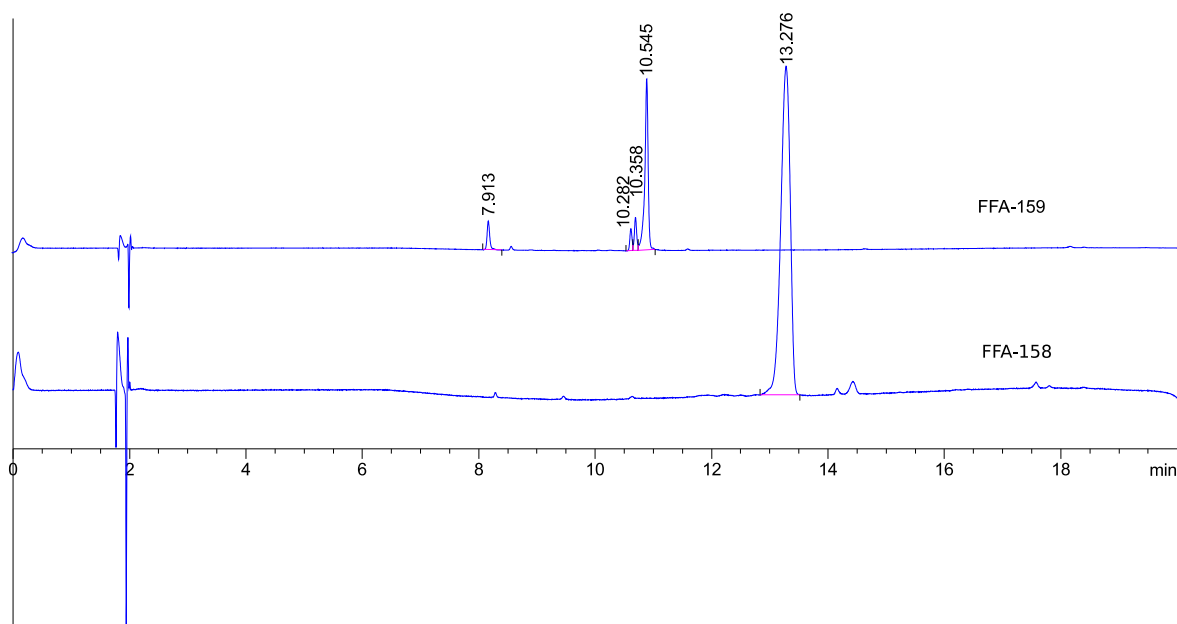
### 4.2.1 Spojine z aminom ali ustreznim boc-em:

Spojina FFA-158 vsebuje zaščiteno aminske skupino z boc-em, struktura FFA-159 pa predstavlja odščiten amin (Slika 7). Amin je bolj polaren kot amin, zaščiteno z boc-em, zato smo pričakovali daljši retencijski čas z boc-em zaščitene spojine, torej spojine FFA-158.



**Slika 7:** Strukturi spojin FFA-158 (amin, zaščiteno z boc-em) – levo in FFA-159 (amin) – desno.

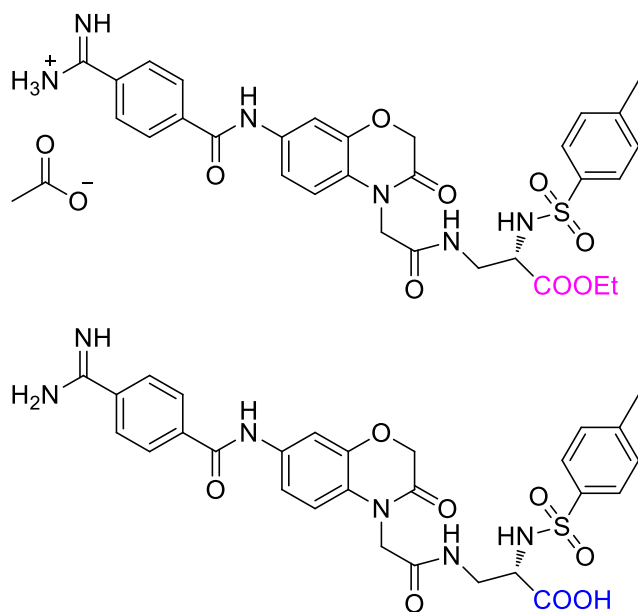
Kot lahko vidimo na obeh kromatogramih (Slika 8), je spojina FFA-158 imela daljši retencijski čas (13,28 min) kot spojina FFA-159 (10,55 min). Glede na to, da na obeh kromatogramih opazimo še nekaj manjših vrhov, verjetno le-ti predstavljajo nečistote.



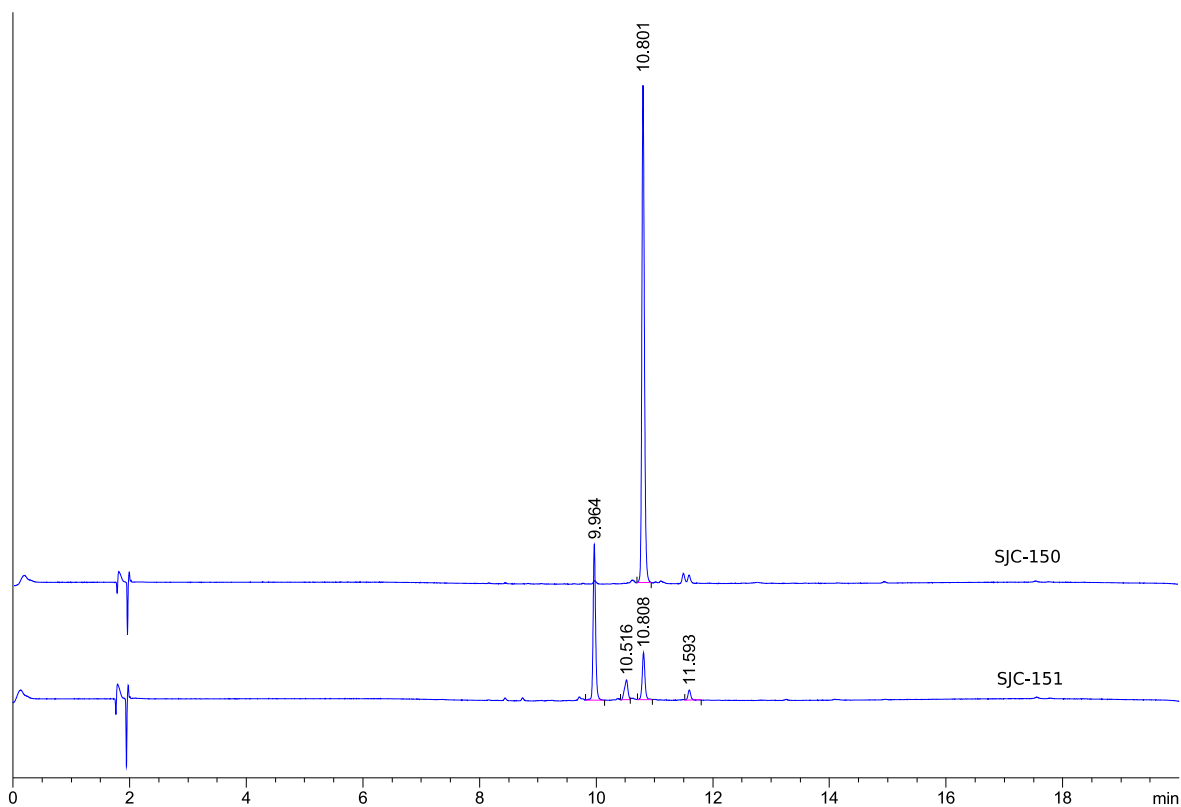
**Slika 8:** Kromatograma vzorcev FFA-158 in FFA-159.

#### 4.2.2 Spojine s kislino ali estrom

Spojina SJC-150 ima na desnem delu strukture etilni ester, spojina SJC-151 pa ima ustrezno karboksilno kislino (Slika 9). Kislina je bolj polarna kot ester, zato smo pričakovali, da se bo ester dlje časa zadrževal na nepolarni stacionarni fazi. Iz spodnjih kromatogramov (Slika 10) vidimo, da je glavni vrh vzorca SJC-150 pri daljšem času (10,80 min) kot pri vzorcu SJC-151 (9,96 min), kar sovpada z našo predpostavko, da se bo ester na koloni zadrževal dlje. Zopet opazimo nekaj manjših vrhov, ki verjetno pripadajo nečistotam.



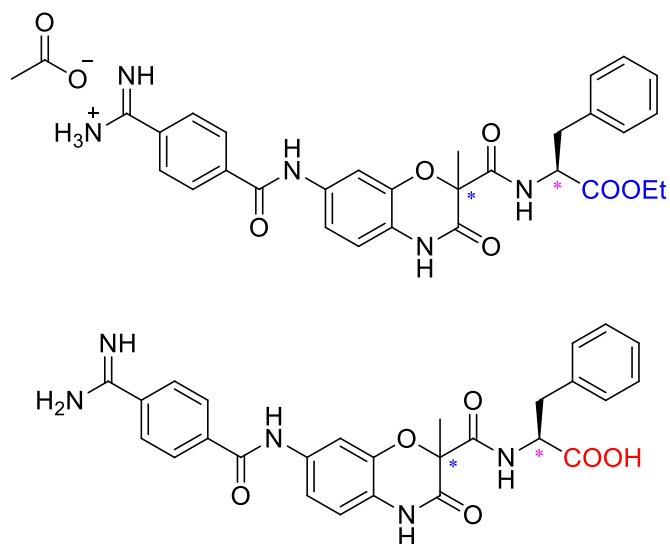
**Slika 9:** Strukturi spojnin SJC-150 (etilni ester) – zgoraj in SJC-151 (karboksilna kislina) – spodaj.



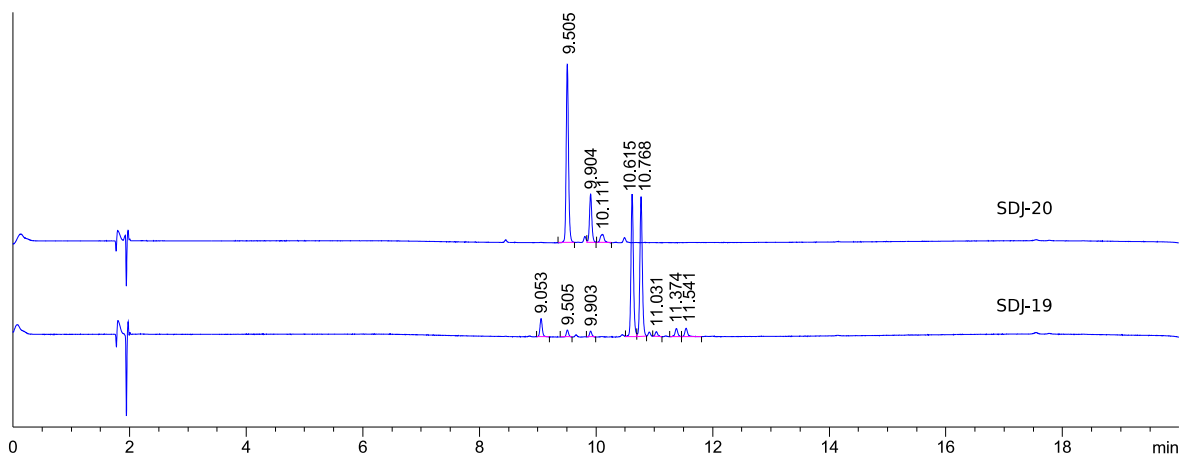
**Slika 10:** Kromatograma vzorcev SJC-150 in SJC-151.

Pri vzorcih SDJ-19 in SDJ-20 (Slika 11) smo dobili podobne rezultate – iz struktur lahko vidimo, da imamo dva kiralna centra, eden je označen z modro in drugi z vijolično zvezdico, vijolični ima definirano konfiguracijo, modri pa ne – zato je možen pojav diastereoizomerije.

Iz oblike in površine vrhov na kromatogramih (Slika 12) lahko sklepamo, da do kromatografske ločbe diastereoizomerov pride le v primeru estra, zato smo sešteli površino obeh vrhov, torej se je zopet ester (SDJ-19) izkazal za bolj stabilnega od kisline (SDJ-20).



**Slika 11:** Strukturi spojin SDJ-19/FFA-251 (etilni ester) – zgoraj in SDJ-20/FFA-252 (karboksilna kislina) – spodaj.

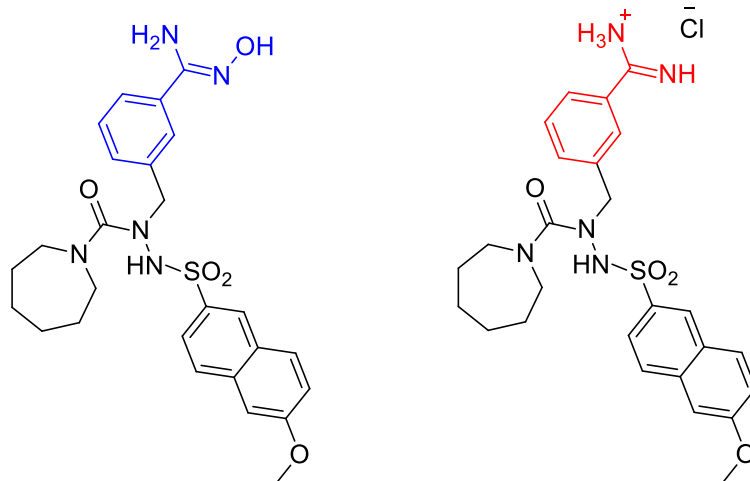


**Slika 12:** Kromatograma vzorcev SDJ-19 in SDJ-20.

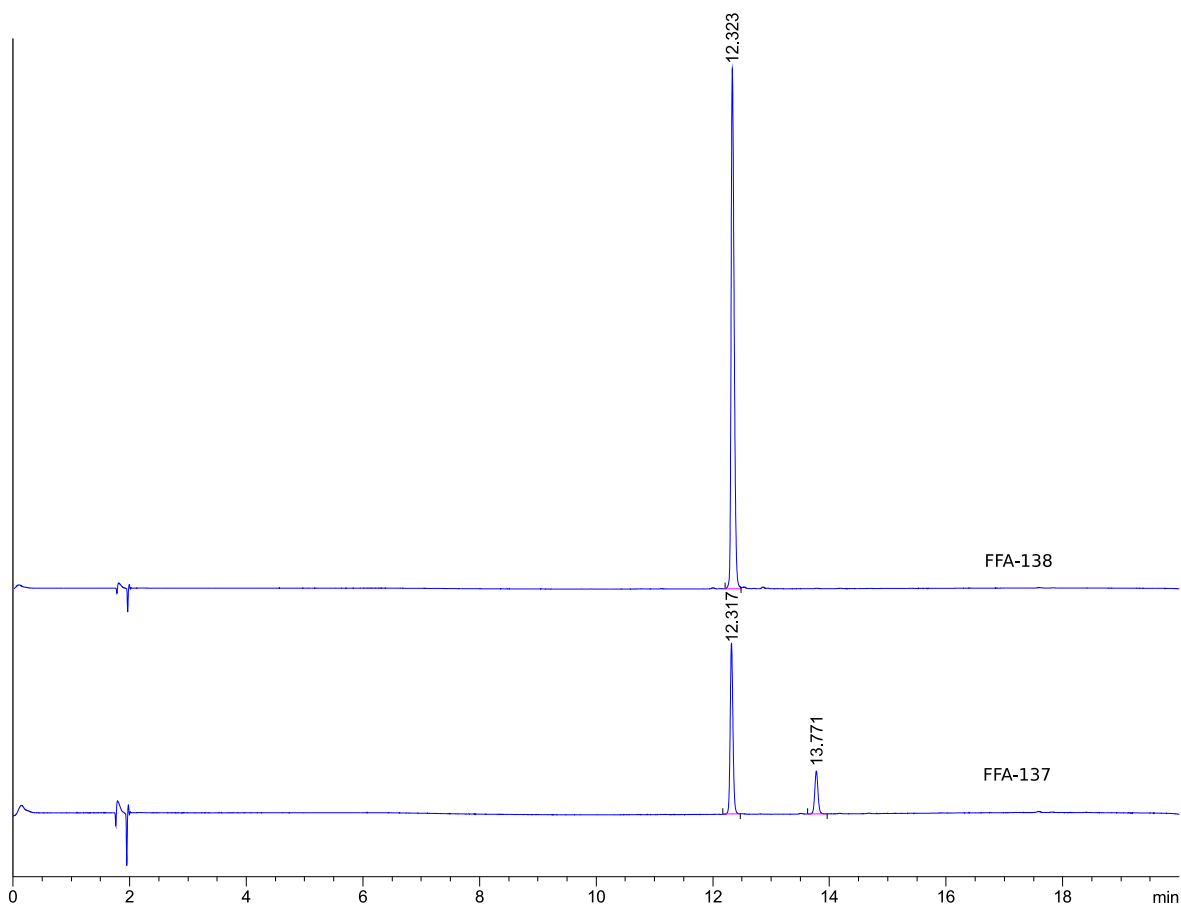
#### 4.2.3 Spojine z benzamidoksimom ali benzamidinom

Spojina FFA-137 v svoji strukturi vsebuje benzamidoksim, spojina FFA-138 pa ustrezen benzamidin (Slika 13). Glede na polarnost, benzamidin izkazuje malo bolj nepolaren značaj, zato bi pričakovali daljši čas zadrževanja. Vendar je razlika v polarnosti tako majhna, da so retencijski časi glavnih vrhov obeh tipov spojin večinoma enaki. Samo s HPLC-analizo pa

ne moremo sklepati, ali imata obe spojini enak retencijski čas, ali pride do enakih razpadnih produktov. Glavni vrh spojine FFA-137 je imel retencijski čas pri 12,32 min, spojine FFA-138 pa tudi pri 12,32 min (Slika14).

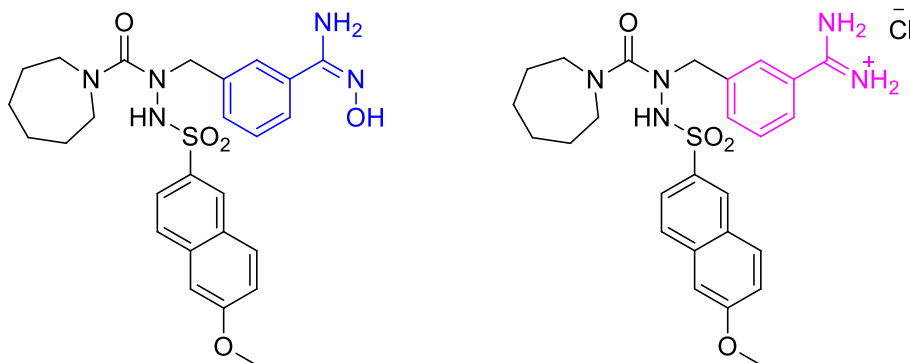


**Slika 13:** Strukturi spojin FFA-137 (benzamidoksim) – levo in FFA-138 (benzamidin) – desno.

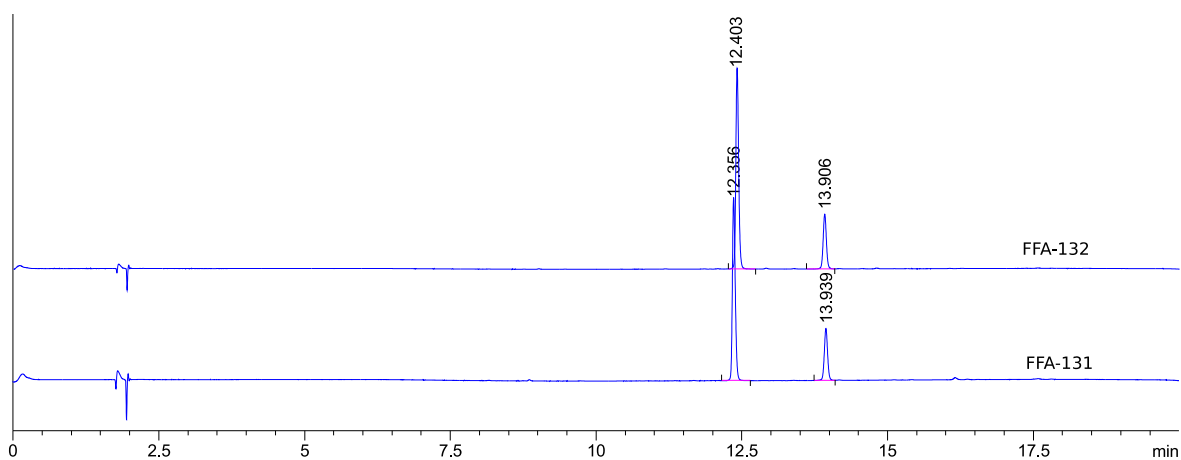


**Slika 14:** Kromatograma vzorcev FFA-137 in FFA-138.

Za vzorca FFA-131 in FFA-132 (Slika 15) dobimo skoraj identična kromatograma – prikazana na Sliki 16. Glede na to, da se pojavi manjši vrh pri enakem retencijskem času, gre verjetno ali za enak razpadni produkt ali za enako nečistoto. Zaradi zelo podobne polarnosti obeh struktur pa ne moremo sklepati, ali oba glavna vrhova predstavljata spojini, ali gre za enak razpadni produkt.



**Slika 15:** Strukturi spojin FFA-131 (benzamidoksim) – levo in FFA-132 (benzamidin) – desno.



**Slika 16:** Kromatograma vzorcev FFA-131 in FFA-132.

#### 4.2.4 Ostali kromatogrami

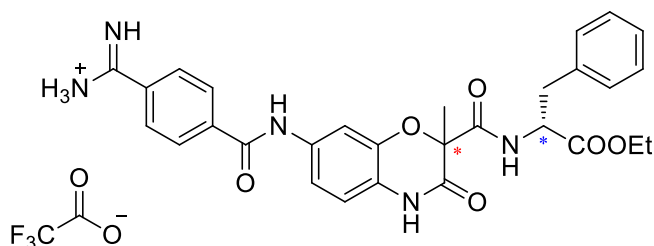
##### Diastereoizomerija

Diastereoizomerija je vrsta stereoizomerije, ki se pojavi, ko imata dva ali več stereoizomerov različno konfiguracijo na vsaj enem in ne na vseh stereocentrih in spojini ne predstavljata zrcalne slike ena druge. Če se dva stereoizomera razlikujeta v konfiguraciji le na enem

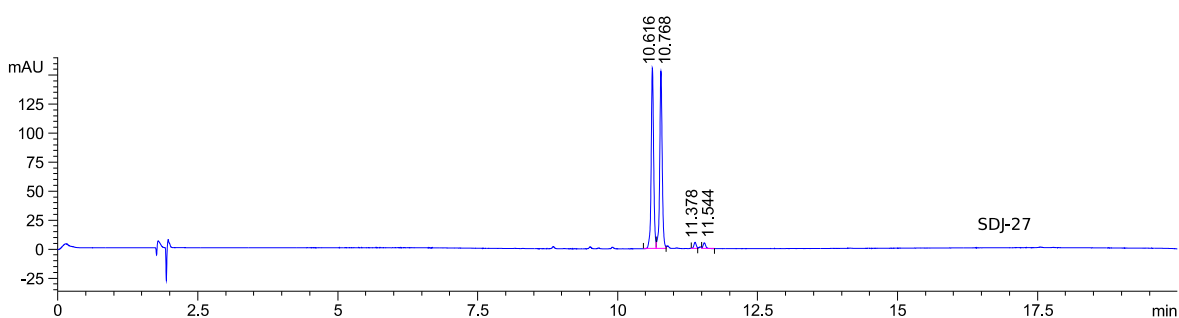
stereocentru, ju imenujemo epimera. Atomi so na vsakem stereocentru lahko v dveh različnih konfiguracijah, zato vsak stereocenter poveča število stereoizomerov s faktorjem 2. Razlika med enantiomeri in diastereoizomeri pa je v tem, da se enantiomeri razlikujejo v konfiguraciji na vseh stereocentrih in so zato spojine med seboj zrcalne slike ena druge.

Med kromatogrami smo opazili zanimiv pojav dveh enakih vrhov zelo blizu eden drugemu. Iz strukture smo sklepali, da je možen pojav diastereoizomerije. Glede na to, da diastereoizomeri izkazujejo drugačne fizikalno-kemijske lastnosti, jih lahko ločimo na nekiralni koloni.

Na spodnji strukturi SDJ-27 opazimo dva stereocentra, označujeta ju rdeča in modra zvezdica (Slika 17). Stereocenter z modro zvezdico ima definirano konfiguracijo, z rdečo pa ne, torej je možen pojav stereoizomerije. Pojavita se dva diastereoizomera. Na kromatogramu (Slika 18) vidimo dva vrha blizu skupaj, retencijska časa pa sta 10,62 min in 10,77 min. Njuni površini in obliki sta zelo podobni, zavzemala sta 46,9 % in 46,7 % celotne površine. Ostalo verjetno predstavljajo nečistote.



**Slika 17:** Struktura spojine SDJ-27 z označenimi kiralnimi centri.

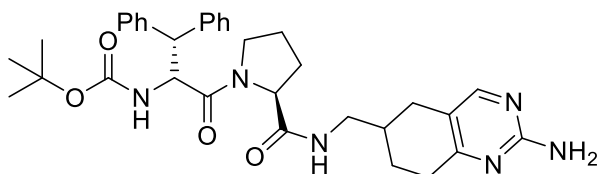


**Slika 18:** Kromatogram vzorca SDJ-27.

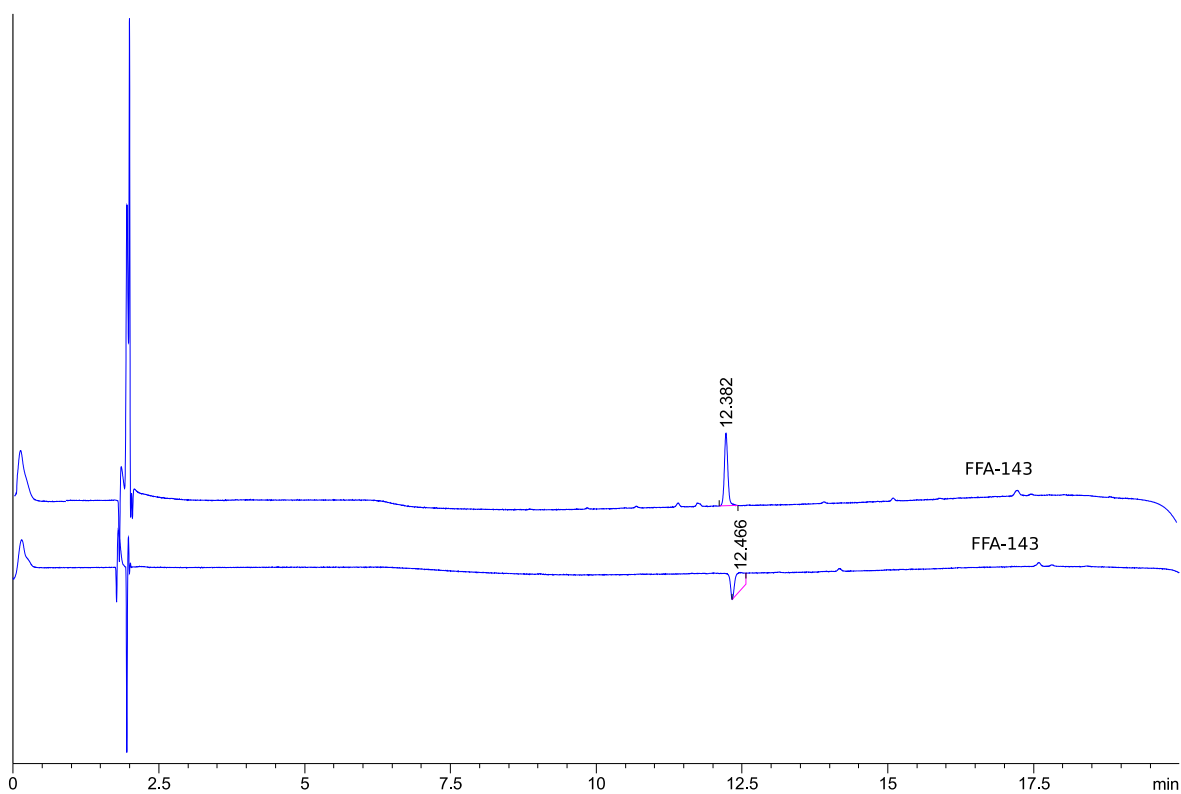
### Pojav negativnih vrhov

Pri nekaterih spojinah je prišlo do negativnih vrhov. To je posledica večje absorpcije spojine pri referenčni valovni dolžini (360 nm) kot pri merjeni valovni dolžini (254 nm). Temu se lahko izognemo tako, da ne odštejemo ozadja in tako dobimo pozitivne vrhove, ali pa

pogledamo kromatograme pri drugi valovni dolžini, saj ima spojina absorpcijski maksimum očitno pri drugi valovni dolžini. Primer je spodnja spojina FFA-143 (Slika 19). Na prvem kromatogramu (254 nm) opazimo negativen vrh (Slika 20). V drugem primeru nismo odšteli ozadja in smo dobili več pozitivnih vrhov. Absorpcijski maksimum FFA-143 je pri drugi valovni dolžini kot pri 254 nm, saj vrhovi na kromatogramu pri 220 nm in 280 nm niso bili negativni.



**Slika 19:** Struktura spojine FFA-143.

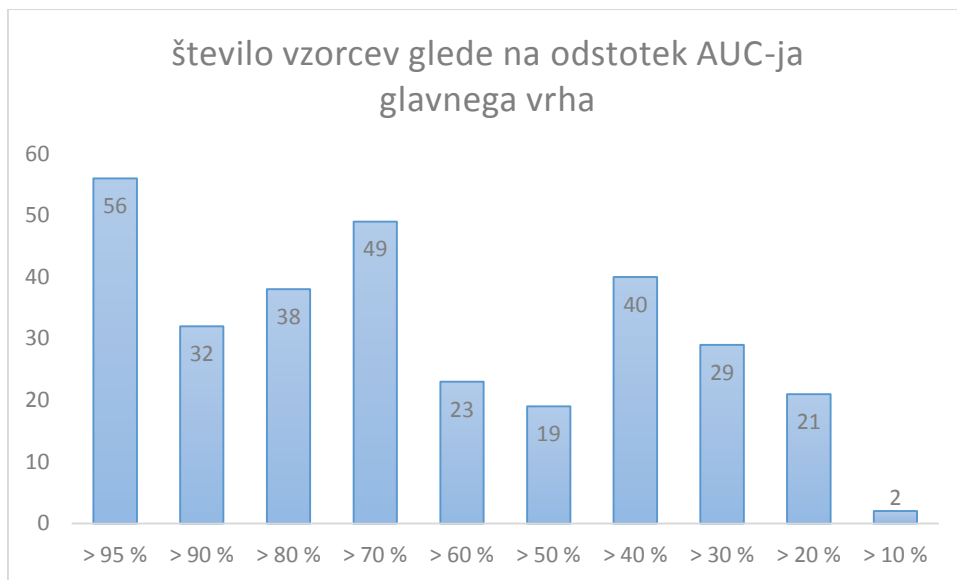


**Slika 20:** Kromatograma vzorca FFA-143 – spodnji prikazuje kromatogram z odštetim ozadjem, zgornji pa brez odštevanja ozadja.



### 4.3 Grafični povzetek stabilnosti vzorcev

Imeli smo 309 vzorcev, število vzorcev glede na odstotek površine glavnega vrha je prikazana na spodnji sliki (Slika 21). Privzeli smo, da vrh, katerega površina pod krivuljo je bila največja, predstavlja našo izhodno spojino v vzorcu. Odstotni prikaz za graf pa je podan v spodnji razpredelnici (Razpredelnica V).



**Slika 21:** Grafični prikaz števila vzorcev glede na odstotek AUC glavnega vrha.

**Razpredelnica V:** Odstotni prikaz deležev vzorcev glede na odstotek AUC glavnega vrha.

Odstotek AUC-ja glavnega vrha	Število vzorcev	Odstotni delež vzorcev (%)
95 – 100 %	56	18,12
90 – 95 %	32	10,36
80 – 90 %	38	12,30
70 – 80 %	49	15,86
60 – 70 %	23	7,44
50 – 60 %	19	6,15
40 – 50 %	40	12,94
30 – 40 %	29	9,39
20 – 30 %	21	6,80
10 – 20 %	2	0,65
0 – 10 %	0	0

#### 4.4 Ugotavljanje neznanih struktur z uporabo MS

Tekom shranjevanja vzorčkov so se nekatere kode izbrisale, zato smo z uporabo MS poizkusili določiti strukture teh spojin. Glede na to, da smo imeli seznam struktur, katerih vzorčki so manjkali, smo si s tem pomagali, da bi uskladili manjkajoče kode in strukture. Izhajali smo iz naslednje razpredelnice, ter na masnih spektrih iskali vrhove z ustreznim razmerjem  $m/z$  (Razpredelnica VI). Pogosto se pri pozitivni ionizaciji pojavijo adukti z natrijevim ali kalijevim ionom, zato smo v tej razpredelnici upoštevali še molske mase z dodatnim  $\text{Na}^+$  ali  $\text{K}^+$  ionom (21-24).

Za sedem neznanih spojin smo našli potencialne strukture:

- Vzorec SDJ-36 ima pri negativni ionizaciji vrh pri 510,6 – to se ujema z vzorcem FFA-254.
- Vzorec ILD-43 ima pri negativni ionizaciji vrh pri 457,5 – to se ujema z vzorcem FFA-205.
- Vzorec ILD-46 ima pri pozitivni ionizaciji vrh pri 616,0 in pri negativni ionizaciji vrh pri 614,0 – oboje se ujema z vzorcem FFA-262.
- Pri vzorcu ILD-155 imamo več opcij, katera struktura je potencialno prava – pri pozitivni ionizaciji ima vrh pri 453,5 (kar bi lahko ustrezalo vzorcu FFA-166); pri 475,5 (kar bi lahko ustrezalo vzorcu FFA-336); pri 517,6 (kar bi lahko ustrezalo vzorcu FFA-214, če je prišlo do adukta z natrijevim ionom ali vzorcu FFA-343, če je prišlo do adukta s kalijevim ionom). Glede na to, da pri negativni ionizaciji nismo dobili ustreznega vrha, ne moremo sklepati na stukturo spojine ILD-155.
- Tudi pri vzorcu SMC-76 imamo več opcij – pri pozitivni ionizaciji ima vrh pri 501,6 (kar bi lahko ustrezalo vzorcu FFA-343, če je prišlo do adukta z natrijevim ionom), pri 545,7 (kar bi lahko ustrezalo vzorcu FFA-242, če je prišlo do adukta s kalijevim ionom). Pri negativni ionizaciji vzorca SMC-76 dobimo vrh pri 514,6 (to bi lahko ustrezalo vzorcu FFA-285). Glede na razhajanje rezultatov pri pozitivni in negativni ionizaciji ne moremo sklepati na stukturo spojine SMC-76.
- Vzorec SDJ-37 ima pri pozitivni ionizaciji vrh pri 512,5; pri negativni ionizaciji pa pri 510,6 – oboje ustreza vzorcu FFA-254.
- Vzorec FFA-269 ima pri pozitivni ionizaciji vrh pri 553,8, kar ustreza vzorcu FFA-284, če je prišlo do adukta z natrijevim ionom.

Dokončnega sklepa, za katere strukture gre, ne moremo podati, saj ima veliko spojin, katerih struktura je bila poznana in jih nismo vključili v to iskanje, iste MM in bi šlo lahko tudi za katero izmed teh spojin. Spojine so lahko tudi razpadle in ne predstavljajo nobene izmed izhodnih spojin, torej s tako primerjavo MM izhodnih spojin ne bi mogli najti ustrezne strukture.

**Razpredelnica VI:** Seznam poznanih MM in podatkov spojin, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju struktur neznanih spojin.

Koda	MM	(M+H) <sup>+</sup>	(M+H) <sup>-</sup>	(M+Na) <sup>+</sup>	(M+K) <sup>+</sup>
FFA-336	474,2	475,2	473,2	498,2	514,3
FFA-343	477,2	478,2	476,2	501,2	517,3
FFA-292	438,2	439,2	437,2	462,2	478,3
FFA-166	452,2	453,2	451,2	476,2	492,3
FFA-200/DPS-293	657,3	658,3	656,3	681,3	697,4
FFA-335	472,2	473,2	471,2	496,2	512,3
FFA-205	458,2	459,2	457,2	482,2	498,3
FFA-281	439,1	440,1	438,1	463,1	479,3
FFA-284	529,2	530,2	528,2	553,2	569,3
FFA-285	515,2	516,2	514,2	539,2	555,3
FFA-263	543,2	544,2	542,2	567,2	583,3
FFA-214	493,2	494,2	492,2	517,2	533,3
FFA-217	465,2	466,2	464,2	489,2	505,3
FFA-221	465,2	466,2	464,2	489,2	505,3
FFA-230	555,1	556,1	554,1	579,1	595,2
FFA-237	537,2	538,2	536,2	561,2	577,3
FFA-242	505,1	506,1	504,1	529,1	545,2
FFA-250	636,2	637,2	635,2	660,2	676,3
FFA-254	511,2	512,2	510,2	535,2	551,3
FFA-262	615,4	616,4	614,4	639,4	655,5

## 5 Razprava

### 5.1 Stabilnost spojin

Pri ugotavljanju stabilnosti smo spojine razdelili v pet skupin: boc/amin, ester/kislina, benzamidoksim/benzamidin, različen heterocikel in skupino ostalo. V nadaljevanju so predstavljeni rezultati, ki smo jih pridobili z uporabo metode RF-HPLC. Glede na to, da smo uporabili le to metodo, ne moremo z gotovostjo trditi, da nek vrh predstavlja našo spojino ali njene razpadne produkte. Nekaterim spojinam, ki so se izkazale za čiste, smo z masno spektrometrijo posneli masne spektre in na podlagi le-teh lažje sklepali, kaj predstavlja najvišji vrh na kromatogramu. Pri prvih treh skupinah spojin smo na podlagi razlike v strukturi, ki je predstavljala kritično točko za stabilnost, in posledične razlike v polarnosti, iz retencijskih časov sklepali, ali bi nek vrh teoretično lahko predstavljal izhodno spojino ali njen razpadni produkt. Z uporabo MS smo nekaterim neznanim spojinam določili strukturo, saj smo iz seznama manjkajočih spojin in struktur, katerih oznaka se je v času shranjevanja vzorcev izbrisala, lahko sklepali, kateri strukturi pripada določena koda. Spodnja tabela (Razpredelnica VII) prikazuje število in odstotek vzorcev po skupinah glede na odstotek glavnega vrha.

**Razpredelnica VII:** Prikaz števila in odstotkov vzorcev glede na odstotek glavnega vrha.

tip spojine	število vzorcev glede na odstotek glavnega vrha	odstotek glede na število vzorcev
boc (upoštevana 2 para z estrom/kislino)	3 > 95 %	42,8 %
	1 > 90 %	14,3 %
	1 > 80 %	14,3 %
	2 > 70 %	28,6 %
amid (upoštevana 2 para z estrom/kislino)	1 > 95 %	14,3 %
	1 > 90 %	14,3 %
	4 > 70 %	57,1 %
	1 > 60 %	14,3 %
kislina (upoštevani par z alkilbenzenom/brez in benzamidoksimom/benzamidom)	1 > 80 %	10 %
	1 > 70 %	10 %
	2 > 60 %	20 %
	2 > 50 %	20 %
	2 > 40 %	20 %
	2 > 20 %	20 %

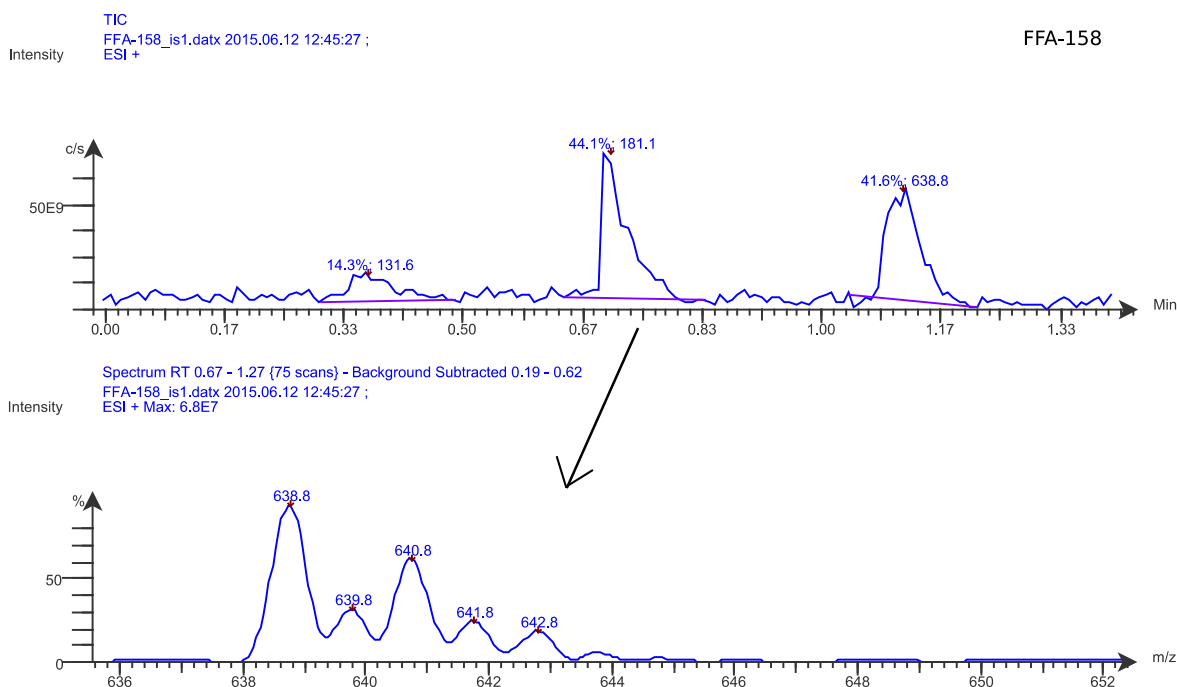
<b>ester</b> (upoštevan par z alkilbenzenom/brez in benzamidoksimom/benzamidom)	4 > 95 %	40 %
	1 > 90 %	10 %
	3 > 80 %	30 %
	1 > 40 %	10 %
<b>benzamidoksim</b>	2 > 95 %	14,4 %
	1 > 90 %	7,1 %
	1 > 80 %	7,1 %
	5 > 70 %	35,7 %
	1 > 60 %	7,1 %
	1 > 50 %	7,1 %
	2 > 30 %	14,4 %
	1 > 20 %	7,1 %
<b>benzamidin</b>	4 > 95 %	28,6 %
	1 > 80 %	7,1 %
	4 > 70 %	28,6 %
	1 > 60 %	7,1 %
	1 > 50 %	7,1 %
	3 > 30 %	21,5 %

### 5.1.1 Spojine z boc-em ali ustrezni amini:

V to skupino je bilo vključenih pet parov spojin in pa dva dodatna para, kjer so se spojine poleg boc/amin razlike v strukturi razlikovale še v tem, da je struktura vključevala še ester ali kislino. Pri štirih od petih parov se je struktura, ki je vsebovala boc, izkazala za bolj stabilno – glavni vrh je predstavljal nad 80 % površine pod krivuljo, struktura z aminom pa nad 60 %. Pri enem paru se je amin izkazal za bolj stabilnega, kjer so bili odstotki ravno obratni. Pri dodatnih dveh parih pa smo dobili procentualno enake rezultate ne glede na to, da je struktura dodatno vsebovala še funkcionalno skupino ester ali kislino – pri enem paru za obe spojini 100 % in pri drugem okoli 70 %. Pri vseh kromatogramih smo si z retencijskimi časi pomagali določiti, kateri vrh predstavlja spojino z boc-em in kateri amin. V vseh primerih smo pri spojini z boc-em dobili glavni vrh z daljšim retencijskim časom kot pri spojini z aminom. Ponekod smo opazili tudi okoli 5 % vrh pri obeh spojinah, kar je verjetno posledica nečistot. Spodnji strukturi prikazujeta par spojin – razlikujeta se v boc ali amin strukturnem segmentu. Spojina FFA-159 je v obliki klorida, FFA-158 pa je nevtralna. Tej razliki in potencialnim vplivom na obnašanje spojin na koloni, smo se pri pripravi

vzorcev izognili z uporabo kisle mobilne faze, ki je vse strukture z bazičnimi centri pretvorila v obliko soli. FFA-158 vsebuje boc in se je izkazala za bolj stabilno spojino. Strukturi spojin FFA-158 in FFA-159 sta prikazani na strani 22 (Slika 7).

Z uporabo MS smo posneli masni spekter za spojino FFA-158 (Slika 22). Molska masa (MM) spojine znaša 637,20; na masnem spektru opazimo vrh pri 638,8 – gre za protonirano molekulo z enim pozitivnim nabojem  $(M+H)^+$ , kar dokazuje prisotnost spojine FFA-158. Na masnem spektru opazimo še dodatni vrh pri 640,8, kar nam pove, da je poleg izhodne spojine v vzorcu še spojina, ki ima MM za 2 večjo od izhodne spojine, kar kaže na to, da vzorec vsebuje razgradni produkt, kar oteži sklepanje na stabilnost izhodne spojine le na osnovi HPLC in MS rezultatov.

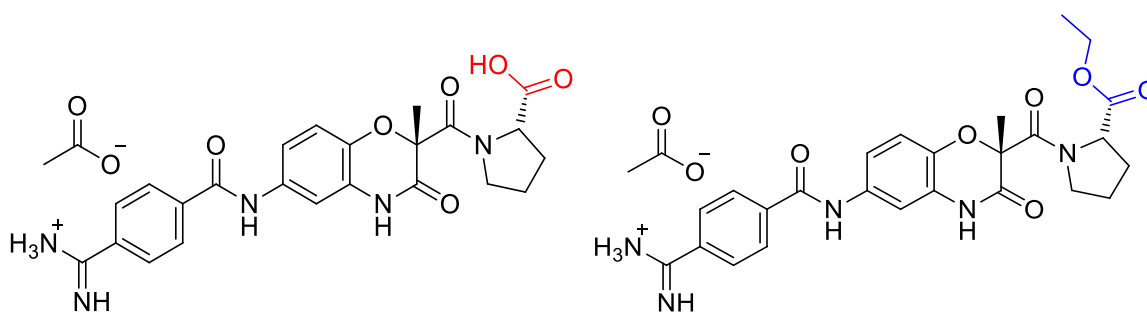


**Slika 22:** Kromatogram celotnega ionskega toka (zgoraj) in masni spekter (spodaj) vzorca FFA-158.

### 5.1.2 Spojine s karboksilno kislino ali ustreznim estrom:

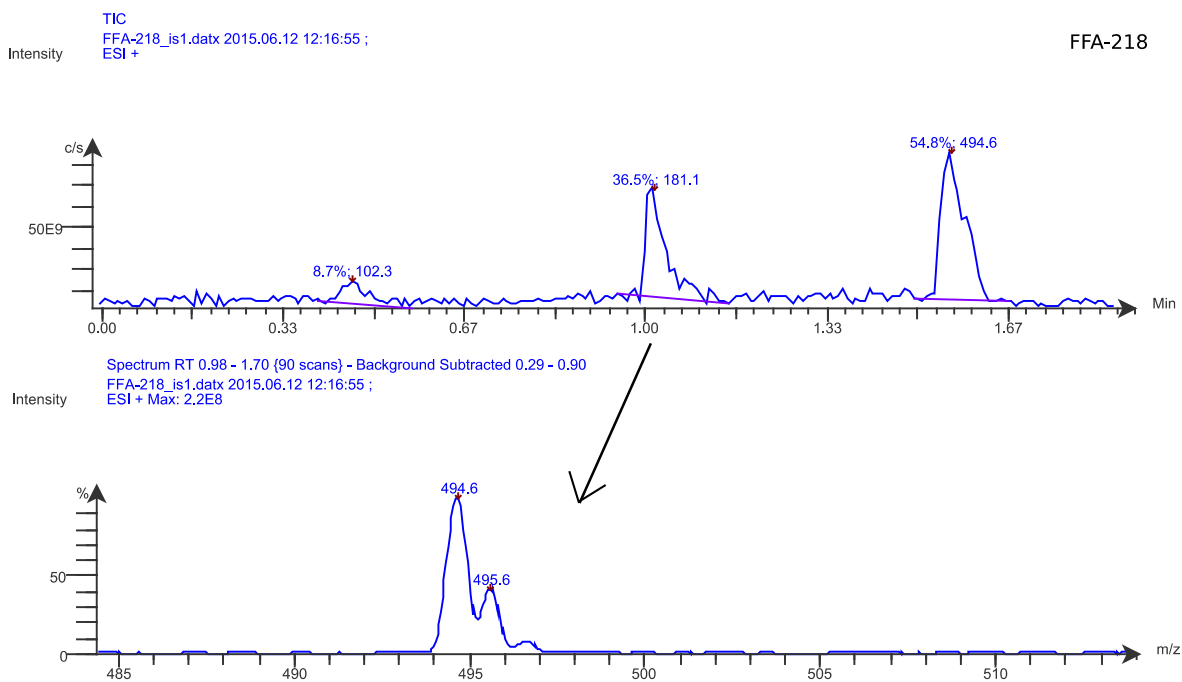
Med spojinami je bilo osem parov ester-kislina in pa štirje dodatni pari, ki so se razlikovali v dodatnem strukturnem fragmentu. Pri šestih od osmih parov se je za bolj stabilnega izkazal ester, pri dveh pa kislina. Estri so po pričakovanju imeli daljši retencijski čas, le pri enem paru so bili retencijski časi nenavadni, vendar samo s HPLC-analizo ne moremo sklepati, na kaj sta spojin razpadli. Pri dodatnih štirih parih smo dva opisali že v prejšnjem odstavku, saj sta poleg ester-kislina segmenta vsebovala še boc ali amin. Dodaten fragment

(alkilbenzen), vezan na spojino z estrom, ni imel opaznega vpliva na stabilnost – spojina z estrom je bila stabilnejša, retencijski časi pa so bili po pričakovanju. Spojina z estrom in benzamidoksimom se je prav tako izkazala za bolj stabilno kot ustrezna spojina s kislino in benzamidinom. Pri več spojinah smo opazili zanimiv kromatogram – dva okoli 40% vrhova s skoraj enakima retencijskima časoma. Iz strukture smo lahko sklepali, da sta se diastereoizomera različno zadrževala na koloni, ta razlika pa je bila minimalna. Glede na to, da je šlo za enako spojino, smo AUC-je vrhov sešteli in vsoto smatrali za glavni vrh. Spodnji spojini se razlikujeta le v segmentu kislina-ester (Slika 23).



**Slika 23:** Strukturi spojin FFA-219 (karboksilna kislina) – levo in FFA-218 (etilni ester) – desno.

Z uporabo MS smo posneli masne spektre spojine FFA-218, ki vsebuje ester (Slika 24). Na podlagi MM, ki znaša 493,20; smo lahko sklepali, da vrh na masnem spektru pri 494,7 predstavlja našo spojino –  $(M+H)^+$  ion.



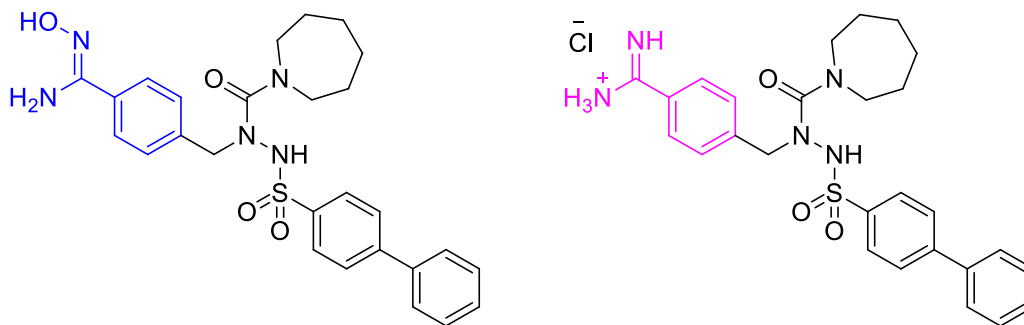
**Slika 24:** Kromatogram celotnega ionskega toka (zgoraj) masni spekter (spodaj) vzorca FFA-218.

### 5.1.3 Spojine z benzamidinom ali ustreznim benzamidoksimom:

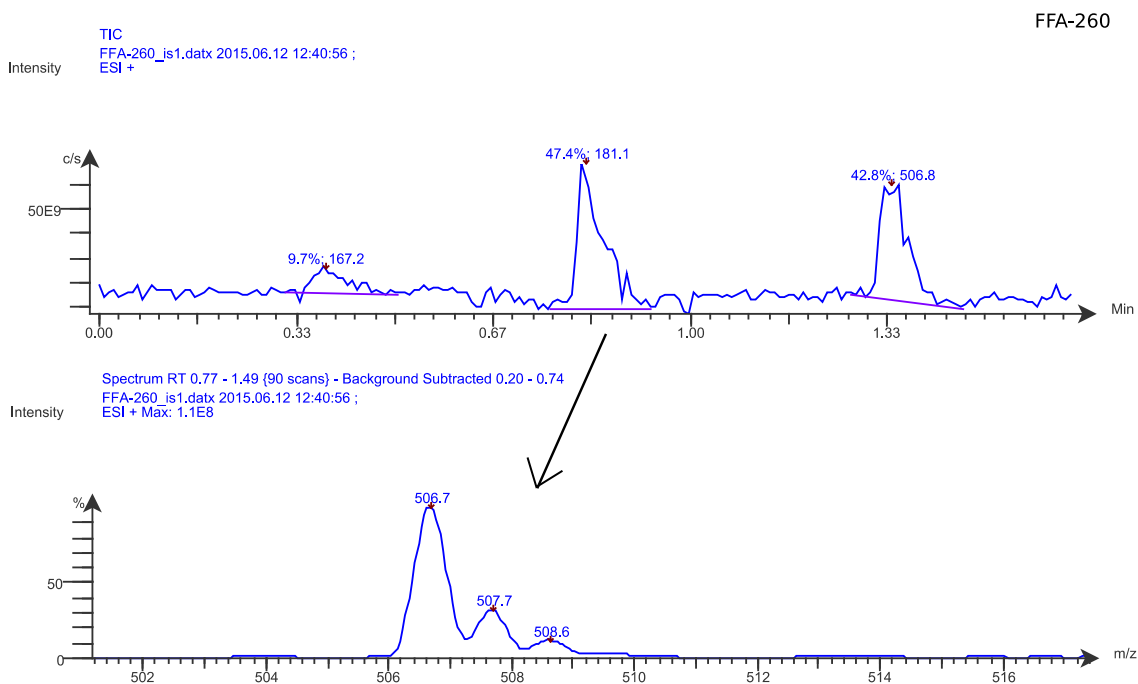
V tej skupini je bilo štirinajst parov benzamidin-benzamidoksim in pa en par, ki je poleg tega vseboval še segment ester-kislina in smo ga omenili že v prejšnji skupini. Med štirinajstimi pari je bila stabilnost obeh spojin v osmih parih enaka, trikrat pa je bil bolj stabilen benzamidoksim in trikrat benzamidin. Zanimivo je, da se je stabilnost gibala med okoli 30 in skoraj 100 %, zato je stabilnost spojine očitno odvisna ne le od tega segmenta, temveč tudi od sestave celotne spojine. Retencijski časi glavnega vrha pri spojini z benzamidoksimom in benzamidinom so bili večinoma isti oziroma zelo podobni. Na podlagi samo HPLC-analize ne moremo predvideti, ali imata spojini enak retencijski čas, ali pride do razpada spojine na fragmente z enakim retencijskim časom. Glede na polarnost bi pričakovali daljše zadrževanje benzamidina, vendar so razlike zelo majhne in je sklep samo na podlagi HPLC-analize zato otežen. Spodnji spojini se razlikujeta le v segmentu benzamidoksim-benzamidin (Slika 25).

Z MS smo posneli masni spekter spojine FFA-260, ki vsebuje benzamidinski fragment (Slika 26). MM spojine je 505,21; vrh pri 506,7 ( $M+H$ )<sup>+</sup> pa predstavlja pozitivno nabito obliko spojine FFA-260.





**Slika 25:** Strukturni spojini FFA-259 (benzamidoksim) – levo in FFA-260 (benzamidin) – desno.

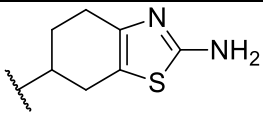
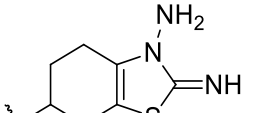
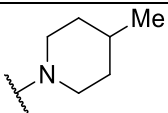
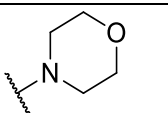
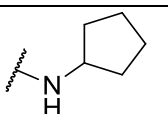
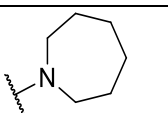
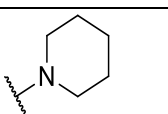
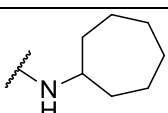
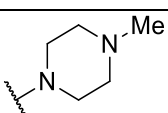
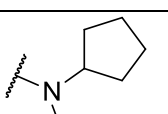
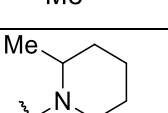


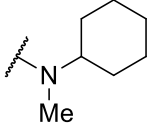
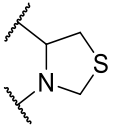
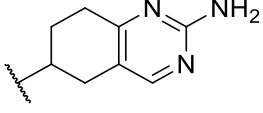
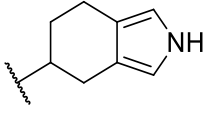
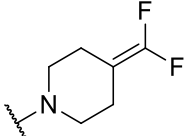
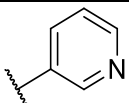
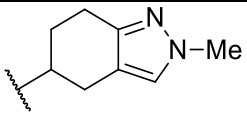
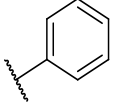
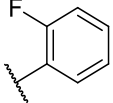
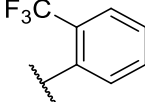
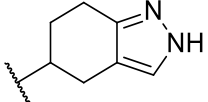
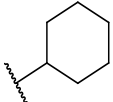
**Slika 26:** Kromatogram celotnega ionskega toka (zgoraj) in masni spekter (spodaj) vzorca FFA-260.

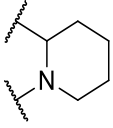
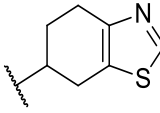
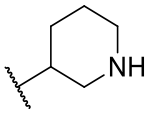
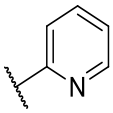
#### 5.1.4 Spojine s heterocikli

V to skupino smo vključili spojine, ki so se razlikovale v heterociklu in jih nismo mogli vključiti v katero od zgornjih treh skupin. Vključenih je 65 spojin, večinoma smo primerjali rezultate dveh spojin, ponekod pa tudi treh ali več spojin. V spodnji tabeli so zbrani obroči, ki so se pojavljali v strukturah spojin, v nadaljevanju so imena obročev zaradi boljše preglednosti označena z oznako v desnem delu razpredelnice (Razpredelnica VIII).

**Razpredelnica VIII:** Razpredelnica heterociklov.

Struktura heterocikla	IUPAC ime	Oznaka
	2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]tiazol-6-il	obroč 1
	3-amino-2-imino-2,3,4,5,6,7-heksahidrobenzo[d]tiazol-6-il	obroč 2
	4-metilpiperidin-1-il	obroč 3
	morfolin-4-il	obroč 4
	ciklopentanamin- <i>N</i> -il	obroč 5
	azepan-1-il	obroč 6
	piperidin-1-il	obroč 7
	cikloheptanamin- <i>N</i> -il	obroč 8
	4-metilpiperazin-1-il	obroč 9
	<i>N</i> -metilciklopentanamin- <i>N</i> -il	obroč 10
	2-metilpiperidin-1-il	obroč 11

	<i>N</i> -metilcikloheksanamin- <i>N</i> -il	obroč 12
	tiazolidin-3,4-diil	obroč 13
	2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il	obroč 14
	4,5,6,7-tetrahidro-2 <i>H</i> -izoindol-5-il	obroč 15
	4-(difluorometilen)piperidin-1-il	obroč 16
	piridin-3-il	obroč 17
	2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-2 <i>H</i> -indazol-5-il	obroč 18
	benzen-1-il	obroč 19
	2-fluorobenzen-1-il	obroč 20
	2-(trifluorometil)benzen-1-il	obroč 21
	4,5,6,7-tetrahidro-2 <i>H</i> -indazol-5-il	obroč 22
	cikloheksan-1-il	obroč 23

	piperidin-1,2-diil	obroč 24
	4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]tiazol-6-il	obroč 25
	piperidin-3-il	obroč 26
	piridin-2-il	Obroč 27

Spojine smo razdelili v 24 parov oziroma skupin, katerih rezultate smo primerjali. Pri osmih skupinah spremenjen obroč ni vplival na stabilnost, pri desetih je obroč vplival na stabilnost spojine, pri štirih pa so bili AUC-ji zelo nizki. Če je bila površina glavnega vrha zelo nizka, je to otežilo sklep na stabilnost dane spojine, saj je že nihanje bazne linije zelo vplivalo na odstotek AUC-ja glavnega vrha. Eden od načinov, da bi optimizirali kromatograme teh vzorcev, je, da ne bi odšteli ozadja in bi zato lahko dobili večje površine vrhov. Lahko pa bi tudi posneli kromatogram pri drugi valovni dolžini.

Spojine, katerih AUC-ji so bili prenizki, so vsebovale naslednje obroče – obroč 1, 2, 12, 19 in 22.

Skupine, kjer obroč ni vplival na stabilnost, so vključevale obroče – 3 in 4; 3, 4, 5, 6 in 7 (5 je bil najmanj stabilen, 4 in 6 pa najbolj); 9 in 10; 24 in 13; 1 in 14; 1 in 18; 19 in 23; 3 in 6; 4, 6 in 7.

Pri naslednjih skupinah spojin pa je glede na dobljene rezultate obroč vplival na stabilnost – 2 > 1; 5 in 6 > 4 in 8; 8 > 5; 6 > 11; 12 > 6; 9 > 16; 26 > 17; 1 > 2; 20 > 21; 7 > 6.

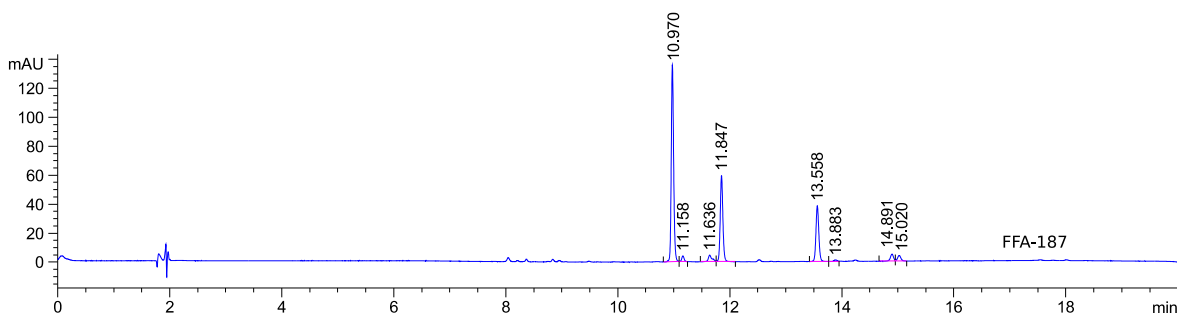
Iz dobljenih rezultatov ne moremo sklepati, da določen obroč zveča ali zmanjša stabilnost strukture, saj imamo premajhno število vzorcev in samo HPLC-metodo, ki ne daje zadostnih informacij o strukturah. Stabilnost strukture ni odvisna le od obroča, ki je vezan nanjo, ampak od vseh funkcionalnih skupin, ki se pojavijo na strukturi.

### 5.1.5 Skupina ostalo

V to skupino smo vključili pare spojin, ki so se med seboj razlikovale v številu C-atomov v verigi, v dodatnih fragmentih, dodatnih funkcionalnih skupinah, v drugem položaju funkcionalne skupine, in podobno; vključili smo tudi posamezne spojine, katerih struktura je bila drugačna od ostalih, skupno 125 spojin. Podobno kot v prejšnji skupini je vzorcev premalo za končen sklep, ali sprememba v strukturi vpliva na stabilnost ali ne.

## 5.2 Kromatografska metoda

Pri določanju kromatografske metode smo morali biti pozorni predvsem na to, da je ločba vrhov dovolj dobra, da lahko z gotovostjo trdimo, da so vse spojine v vzorcu ločene. Za ta namen smo uporabili kromatogram vzorca, katerega izhodna spojina je očitno razpadla in se je na kromatogramu pojavilo veliko število vrhov. Slika 27 prikazuje kromatogram vzorca FFA-187. Pomembno je bilo, da je bazna linija ravna, da so vrhovi ločeni in ozki. Ker smo tudi pri vzorcih, ki so vsebovali razpadne produkte, dobili zadovoljivo ločbo, smo metodo uporabili za vse vzorce. Enotna metoda je pomembna tudi s stališča primerjave retencijskih časov in sklepanja na strukturo spojin v vzorcu.



**Slika 27:** Kromatogram vzorca FFA-187.

Ustreznost kromatografske metode smo lahko določili tudi na podlagi tega, da smo z našo metodo lahko ločili dva diastereoizomera. Glede na to, da gre za zelo majhno modifikacijo strukture, je metoda zagotavljala zelo dobro ločbo obeh struktur. Kot vidimo na sliki (Slika 12) smo pri vzorcu SDJ-19 (Slika 11) dosegli dobro ločbo obeh diastereoizomerov z ostrimi vrhovi. Število teoretskih podov za levi vrh znaša  $N_A = 8,86 \times 10^5$ , za desni vrh  $N_B = 9,58 \times 10^5$ , faktor resolucije pa je  $R = 3,43$ .

### 5.3 Optimizacija pogojev

#### 5.3.1 Knjižnica spojin in HTS

Pri kromatografskem testiranju vzorcev smo se takoj srečali s potencialnim problemom, saj smo vse vzorce ročno pripravljali in redčili. To predstavlja dodatne možne napake (človeški faktor), ki pa bi jih z avtomatiziranim pristopom lahko odpravili. Obenem je to zamudno tudi s časovnega vidika. Če bi imeli večje število vzorcev ali časovne omejitve, bi se morali drugače lotiti testiranja s čim več avtomatiziranimi stopnjami. Ker so bili vzorci stari več let, so se kode na nekaterih že izbrisale, nekatere so bile slabo vidne. To je otežilo identifikacijo vzorcev, zopet pa so možne napake v identifikaciji. Tem problemom bi se v našem primeru težko izognili, saj je na to potrebno misliti že pri snovanju knjižnice spojin in uporabiti primernejši način označevanja in organizacije vzorcev. Ko se srečujemo z velikim številom vzorcev, je ugodno, da se čim več podatkov hrani v elektronski obliki, saj sta preglednost in iskanje podatkov lažja. Zato smo s programom ChemBioDraw narisali strukture vseh spojin in tako zbrali in poenotili zapis čim več podatkov o vzorcih. Tudi ta stopnja predstavlja izziv pri urejanju knjižnic spojin, saj potencialne napake pri prepisovanju podatkov lahko vplivajo na kvaliteto in zanesljivost knjižnice. Wassermann s sodelavci (4) v svojem članku govori o izzivih zbiranja podatkov v knjižnicah, saj pri zbiranju podatkov iz podatkovnih baz lahko pride do zapletov in težav. Pri zapisovanju podatkov v baze lahko pride do napak, do nejasnosti, napak pri kopiranju podatkov, napak v enotah, napak v ekstrakciji tarčnih proteinov (napaka v navedenem podtipu receptorja ali izpuščen podatek o podtipu). Pride lahko tudi do napak v kemijski strukturi, predvsem v stereokemiji. Tudi podatki, ki so pravi, brez napak, niso vsi enako zanesljivi, saj so testiranja potekala pod različnimi pogoji, z različnimi substrati, koncentracijami in drugimi parametri. Za encimske teste so zato začeli uvajati standardni način poročanja podatkov o encimski aktivnosti in inhibiciji. Pomembna je tudi dostopnost podrobnejših podatkov o testih in protokolih, kar pa ni vedno možno. Podatki v bazah pa so lahko zapisani v različnih oblikah in formatih, kar otežuje primerjavo podatkov iz različnih baz. Na vse to bi se morali osredotočiti, da bi povečali kvaliteto naše knjižnice.

#### 5.3.2 Uporaba MS, UHMS – masne spektrometrije ultra visoke ločljivosti (*ultra high resolution mass spectrometry*)

Vzorci, ki smo jih testirali, smo najprej analizirali na HPLC-aparatu, nato pa jim naknadno posneli še masne spektre. Glede na to, da smo tudi za MS uporabili začetni vzorec in ne ločenih spojin, nam rezultati lahko potrdijo, da začetna spojina v vzorcu je prisotna, ne

moremo pa trditi, da najvišji vrh predstavlja ravno to spojino. Bolje bi bilo, če bi uporabili vezano metodo, kjer bi najprej s HPLC ločili spojine v vzorcu, nato pa za vsako ločeno spojino posneli masni spekter. S tem bi lahko z gotovostjo trdili, če gre za izhodno spojino ali ne. V našem primeru bi bilo najbolje, če bi uporabili metodo LC-MS/MS ali LC-UHMS, ki pa je žal nismo imeli na voljo. Pri naši nalogi nas je zanimala najprej kvalitativna sestava vzorcev, sekundarno pa tudi delež izhodne spojine, torej kvantitativna sestava vzorcev. S tem smo vrednotili stabilnost oziroma čistost naših vzorcev. LC-MS/MS, predvsem masni spektrometer s trojnim kvadrupolom – TQMS, je pogostejša izbira metode, kadar je primarni cilj raziskave kvalitativna analiza. Glede na to, da je nas zanimalo oboje, kvalitativna in kvantitativna sestava vzorcev, je boljša izbira HPLC-UHMS, saj nam eno injiciranje vzorca da vse želene rezultate. Najprej določimo preiskovano območje za razmerje  $m/z$  in z enim korakom dobimo podatke za MM za vse spojine, ki smo jih ločili na kromatogramu. Uporaba UHMS nam omogoča tudi analiziranje podatkov iz več zornih kotov, kar nam da nov pogled na rezultate (*data mining*). S tem pridobimo koristne informacije, analiza pa poteka računalniško, kar je zaželeno, kadar operiramo z velikim številom vzorcev. Le-to pa ni možno, če uporabimo TQMS. Tako bi z uporabo HPLC-UHMS lahko strukturo spojine določili v vsakem vrhu na kromatogramu in z gotovostjo trdili, ali kateri vrh predstavlja izhodno spojino. Dobili bi tudi molekulske formule razpadnih produktov in nečistot.

## 6 Sklep

V okviru magistrskega dela smo z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti določevali stabilnost knjižnice spojin zaviralcev trombina. Za potrjevanje struktur spojin in določevanje nepoznanih struktur smo uporabili masno spektrometrijo. S pomočjo retencijskih časov in polarnosti smo na podlagi manjših sprememb na strukturi skleпали, kateri vrh predstavlja katero spojino.

Ugotovili smo:

- glede na polarnost smo dobili predvidljive retencijske čase – boc > amin, ester > karboksilna kislina, benzamidoksim = benzamidin;
- pri štirih od petih parov se je struktura, ki je vsebovala boc, izkazala za bolj stabilno od ustreznega amina;
- pri šestih od osmih parov se je struktura, ki je vsebovala ester, izkazala za bolj stabilno od ustrezne kisline;
- pri štirinajstih parih med strukturami z benzamidinom in benzamidoksimom se je osem parov izkazalo za enako stabilne, trikrat je bil bolj stabilen benzamidin in trikrat benzamidoksim;
- le na podlagi naših rezultatov ne moremo sklepati kako na stabilnost vpliva drugačen heterocikel;
- 18,12 % vzorcev je imelo površino pod krivuljo na kromatogramu med 95 in 100 %, 10,36 % vzorcev med 90 in 95 %, 12,30 % vzorcev med 80 in 90 %, 15,86 % vzorcev med 70 in 80 %, 7,44 % vzorcev med 60 in 70 %, 6,15 % vzorcev med 50 in 60 % in 29,75 % vzorcev pod 50 %;
- z uporabo masne spektrometrije smo potrdili prisotnost izhodne spojine izbranim stabilnim oziroma čistim vzorcem;
- neidentificiranim vzorcem smo določili potencialne strukture glede na seznam poznanih manjkajočih vzorcev s poznano strukturo.

Le na podlagi kromatogramov in MS ne moremo z gotovostjo trditi, da gre za določeno spojino. Vzorci, ki smo jih s HPLC- in MS-analizo določili za stabilne oziroma čiste, predstavljajo knjižnico spojin inhibitorjev trombina.



## 7 Literatura

1. Sheppard DW, MacRitchie JA: Building in molecular diversity for targeted libraries. *Drug Discovery Today: Technologies* 2013; 10: e461–e466.
2. Heyse S: Comprehensive analysis of high-throughput screening data. *Proceedings of SPIE* 2002; 4626: 535–547.
3. JR, Archer: History, Evolution, and Trends in Compound Management for High Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies* 2004; 2: 675–681.
4. Wassermann AM, Camargo LM, Auld DS: Composition and applications of focus libraries to phenotypic assays. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5: 164, 1–12.
5. Jukič M, Perdih P, Šolmajer T: Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 54–63.
6. Hüser J, Lohrmann E, Kalthof B, Burkhard N, Brüggemeier U, Bechem M: High-Throughput Screening for Targeted Lead Discovery, in *High-Throughput Screening in Drug Discovery*, 1st ed., Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006: (35) 15–36.
7. Gaulton A, Bellis L, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, Light Y, McGlinchey S, Michalovich D, Al-Lazikani B, Overington JP: ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research* 2011; 40: D1100–D1107.
8. Comley J: Tools and Technologies that Facilitate Automated Screening, in *High-Throughput Screening in Drug Discovery*, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: (35) 37–73.
9. Yoshioka S, Stella VJ: *Stability of Drugs and Dosage Forms*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002: 4–33.
10. McMaster MC: *HPLC, A Practical User's Guide*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007: 3–105.
11. Council of Europe: *European pharmacopoeia*, 8.0. ed, Strasbourg, 2014: 72–77.
12. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Baltimore, Philadelphia, 2013: (26) 841–875.

13. CL, Fanola: Current and emerging strategies in the management of venous thromboembolism: benefit-risk assessment of dabigatran. *Vascular Health and Risk Management* 2015; 11: 271–282.
14. King CS, Holley AB, Moores LK: Moving Toward a More Ideal Anticoagulant, The Oral Direct Thrombin and Factor Xa Inhibitors. *American College of Chest Physicians* 2013; 4: 1106–1116.
15. Schadeva A, Paul B: Direct Thrombin Inhibitors versus Warfarin in Non-Valvular Atrial Fibrillation. *JAPI* 2012; 62: 361–362.
16. Lukasik M, Undas A, Zawilska K: Intracranial bleedings in patients on long-term anticoagulant treatment: Benefits from oral thrombin and factor Xa inhibitors in clinical practice. *Polish Neurological Society* 2015; 49: 171–179.
17. Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, Miftari EI: New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Therapeutic and Clinical Risk Management* 2015; 11: 967–977.
18. Adcock DM, Gosselin R: Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thrombosis Research* 2015; 136: 7–12.
19. Maurer HH: What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening? *Journal of Chromatography A* 2013; 1292: 19–24.
20. Rodriguez-Aller M, Gurny R, Veuthey JL, Guillaume D: Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constrains and possible applications. *Journal of Chromatography A* 2013; 1292: 2–18.
21. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ: *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 1<sup>st</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2005: 1–38.
22. Ma S, Chowdhury SK: Data acquisition and data mining techniques for metabolite identification using LC coupled to high-resolution MS. *Future Science* 2013; 5: 1285–1297.
23. Huang MQ, Lin ZJ, Weng N: Applications of high-resolution MS in bioanalysis. *Future Science* 2013; 5: 1269–1267.
24. Fung EN, Jemal M, Aubry AF: High-resolution MS in regulated bioanalysis: where are we now and where do we go from here? *Future Science* 2013; 5: 1277–1284.

25. Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, Schmitt-Kopplin P: Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzer in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *Journal of Chromatography A* 2013; 1292: 51–65.
26. Novakova L: Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography* 2013; 1292: 25–37.
27. Dołowy M, Pyka A: Application of TLC, HPLC and GC methods to the study of amino acid and peptide enantiomers: a review. *Biomed Chromatography* 2013; 28: 84–101.