

Edi Vuljanković

**NMR studija utjecaja UV svjetla na reakciju
kloriranja ifosfamida**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2025.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog Fakulteta, na kolegiju Organska kemija te je izrađen na Institutu za fiziku u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i neposrednim voditeljstvom Antonija Ljulja, mag. pharm.

Ovim putem se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na pruženoj prilici za izradu Diplomskog rada te na savjetima, potpori i razumijevanju.

Rad je dio projekta „Kemijska sudbina zabrinjavajućih farmaceutika u okolišu: eksperimentalno i računalno istraživanje produkata razgradnje i njihovih ekotoksikoloških svojstava“ (HRZZ-IP-2022-10-2634 Pharma-Eco) i „Jačanje znanstveno-istraživačkih i inovacijskih kapaciteta Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (FarmInova)“ financiran je iz Europskoga fonda za regionalni razvoj (KK.01.1.1.02.0021).

Zahvale na gostoprimstvu Institutu za fiziku (IF) u Zagrebu u čijim se prostorijama trenutno nalazi NMR instrument (Varian INOVA 400 spektrometar), posebice Kriogenom centru IF-a koji osigurava podršku u recikliranju i ukapljivanju helija.

Zahvale suradnicima iz Laboratorija za fotoniku i kvantnu optiku Zavoda za eksperimentalnu fiziku Instituta Ruđer Bošković, koji su dizajnirali i pripremili optičke dijelove eksperimentalne arhitekture.

Najveće zahvale mojoj užoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom obrazovanja.

Posebne zahvale mojoj djevojci i majci jer bez njih nikada ne bih došao ovako daleko.

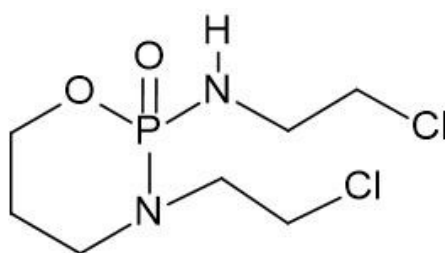
UVOD

1. UVOD.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	5
3. MATERIJALI I METODE.....	6
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	12
5. ZAKLJUČAK.....	18
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	19
7. LITERATURA.....	20
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	22

1. UVOD

Ifosfamid je alkilirajući citotoksični lijek koji se koristi u terapiji mnogih karcinoma poput tumora testisa, raka grlića maternice, sarkoma mekih tkiva, Erwingovog sarkoma, metastatskog raka dojke, Hodkingovog i non-Hodkingovog limfoma (Gilard i sur., 1999).

Strukturni je izomer ciklofosfamida te ima strukturu oksazofosforina. Sintetiziran je kao analog dušikovog iperita s ciljem smanjenja toksičnosti, ali zadržavanja terapijskog učinka.



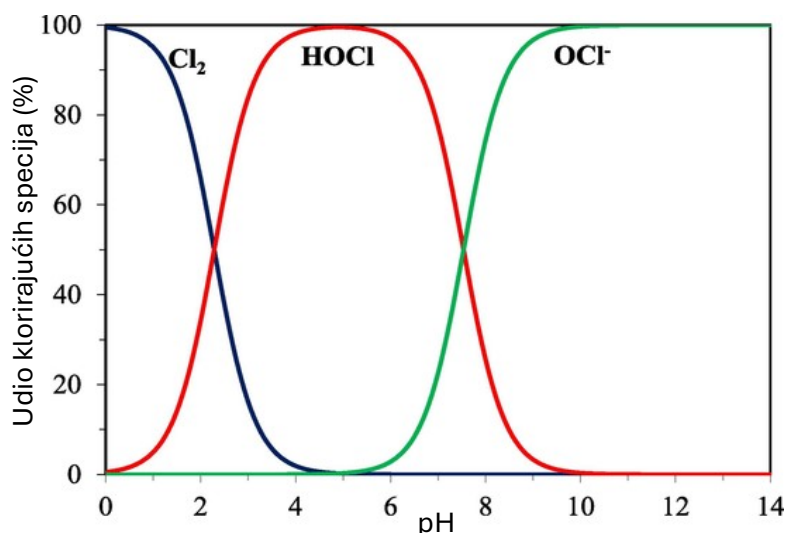
Slika 1. Struktura ifosfamida

Njegova primjena je u usporedbi s ciklofosfamidom ograničena zbog više nuspojava te se iz tog razloga koristi kod karcinoma koji su uznapredovali, neoperabilni ili otporni na ostalu terapiju (www.halmed.hr).

Budući da ifosfamid pripada skupini rekalcitranata, spojeva koji su otporni na kemijsku i biološku razgradnju u okolišu, s vremenom se taj lijek nakuplja u površinskim i podzemnim vodama. U otpadnim vodama je moguće očekivati njegovu reakciju s klorirajućim sredstvima, pa je potrebno proučiti mehanizam i moguće produkte kloriranja ifosfamida, kao i njihove (foto)stabilnosti u vodenom mediju.

Natrij hipoklorit (NaOCl) je dezinfekcijsko sredstvo koje se najčešće koristi u kemijskoj obradi otpadne i pitke vode te je iz tog razloga korišten kao klorirajuće sredstvo u ovom radu.

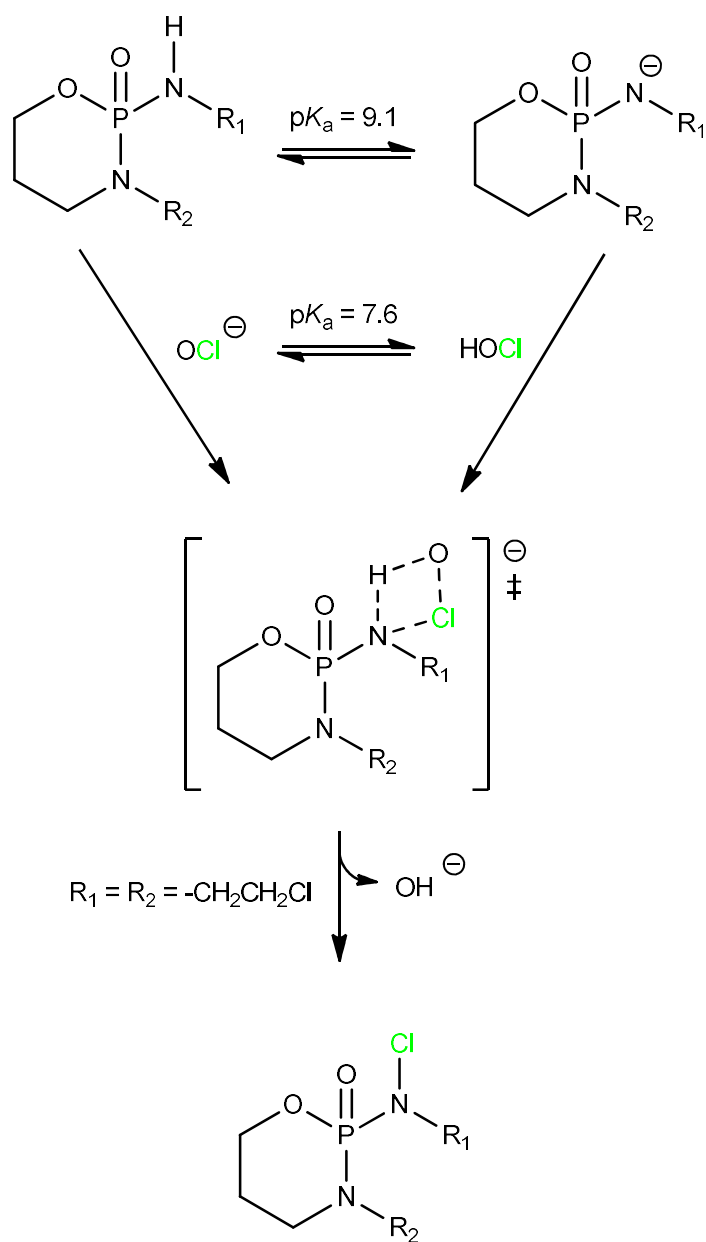
U lužnatim uvjetima, u kojima se čuva natrijev hipoklorit, dominantna klorirajuća specija su hipokloritni ioni (OCl⁻) što se može uočiti iz slike broj 2.



Slika 2. Prikaz udjela klorirajućih specija u vodenoj otopini u ovisnosti o pH (Luna - Trujillo i sur., 2020)

U tim uvjetima mehanizam kloriranja ifosfamida može se opisati pomoću dva reakcijska puta. U prvome dolazi do reakcije neutralnog ifosfamida s hipokloritnom kiselinom, dok u drugome dolazi do reakcije anionskog oblika ifosfamida s hipokloritnim anionom (Slika 3). Međutim, ovi se putovi kinetički ne mogu razlikovati jer uključuju isto prijelazno stanje.

Naime, u reakcijskoj smjesi postoje dvije ravnotežne reakcije koje su jako ovisne o pH, odnosno udio pojedinih specija je ovisan o pH reakcijske smjese. Kako je početni pH reakcijske smjese približno 11, iz pKa vrijednosti ifosfamida koja iznosi 9.1 (Mioduszevska i sur., 2017), može se zaključiti da je većina ifosfamida u anionskom obliku. Pri navedenoj vrijednosti pH, od klorirajućih specija najprisutniji je hipokloritni anion jer porastom pH reakcijske smjese iznad pKa hipokloritne kiseline, koja iznosi oko 7.5, raste i udio hipokloritnog aniona.



Slika 3. Prepostavljeni mehanizam kloriranja ifosfamida

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tijekom primjene ifosfamida zabilježene su mnoge nuspojave vezane uz oštećenje organa: nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, neurotoksičnost, kardiotoxičnost, pulmotoksičnost te genotoksičnost. Unutar 24 sata se 80% primijenjene doze izlučuje urinom nepromijenjeno te dospijeva u otpadne i površinske vode. Vodu je prije konzumacije potrebno dezinficirati u čiju se svrhu nerijetko koristi postupak kloriranja. U tim se reakcijama klor koristi kao oksidans kojim se organske molekule pokušavaju ukloniti iz otpadnih voda. (Reberski Lj i sur., 2022).

Produkti reakcije kloriranja ifosfamida nisu poznati kao ni njihova ekotoksikološka svojstva. Također, nije poznato na koji način svjetlost utječe na brzinu i mehanizam kloriranja ifosfamida.

Ciljevi ovog rada su asignirati produkte kloriranja ifosfamida i procijeniti utjecaj bijelog svjetla i UV zračenja na tijek reakcije kloriranja.

Ovaj rad je dio projekta „Kemijska sudbina zabrinjavajućih farmaceutika u okolišu: eksperimentalno i računalno istraživanje produkata razgradnje i njihovih ekotoksikoloških svojstava“.

3. MATERIJALI I METODE

Za snimanje NMR spektara u ovom radu korišten je Varian INOVA 4000 NMR spektrometar privremeno smješten na Institutu za fiziku u Zagrebu.

Reaktant i produkt reakcije kloriranja asignirani su ^1H , ^{13}C i ^{31}P spektrima, dok su reakcijske promjene praćene ^{31}P NMR spektroskopijom zbog jednostavne interpretacije i kvantifikacije produkata.

Korišteno otapalo je bila teška voda (D_2O) čija je gustoća $\rho(\text{D}_2\text{O}) = 1.11 \text{ g/mL}$, a molekulska masa $M_w = 20.0276 \text{ g/mol}$.

Sredstvo pomoću kojeg je kloriran ifosfamid je natrij hipoklorit (NaOCl) ($\rho(\text{NaOCl}) = 1.20 \text{ g/mL}$, $M_w = 74.44 \text{ g/mol}$) koji se čuva u lužnatom mediju kako bi bio stabilan.

NMR spektri su snimani uz pomoć programa OpenVnmrJ, a kasnije su analizirani u programu MestReNova (Willcott, 2009).

Napravljena su dva orijentacijska pokusa. Uzorci su pripremljeni tako da je ifosfamid otopljen u teškoj vodi u plastičnoj epruveti. Nakon toga je dodan natrijev hipoklorit te je smjesa prebačena u NMR cjevčicu promjera 5 mm. Integrirani su signali dobiveni u ^{31}P NMR spektru kako bi se utvrdio udio pojedinog reaktanta i produkta u reakcijskoj smjesi te su navedeni podaci prikazani u grafovima u dijelu rada „Rezultati i rasprava“.

U prvom pokusu napravljena je usporedba kloriranja ifosfamida pomoću 20 μL NaOCl i 40 μL NaOCl . Ovaj pokus napravljen je s ciljem da se procijeni vrijeme potrebno za završetak reakcije. Reakcija ne smije biti prebrza jer se tada NMR spektroskopijom ne može promatrati postepeno nastajanje produkta, odnosno nestajanje reaktanata, ali isto tako ne smije biti prespora jer se potencijalno nestabilni produkti mogu raspadati te ih je teško analizirati u NMR-u.

Tablica 1. Korištene mase i volumeni supstanci za pripremu uzoraka u prvom orijentacijskom pokusu, izračunate koncentracije ifosfamida i hipokloritnog iona

	Epruveta 1	Epruveta 2
m (ifosfamid)	6.6 mg	5.4 mg
V (D ₂ O)	630 µL	610 µL
V (NaOCl)	20 µL	40 µL
c (OCl ⁻)	67.7 mM	135.4 mM
c (ifosfamid)	38.9 mM	31.8 mM

U drugom je pokusu reakcijska smjesa (epruveta 2 iz tablice 2) osvjetljavana unutar NMR cjevčice pomoću Kessil lampe PR160L- 370 nm Gen 2 visokog intenziteta zračenja od 399 mW/cm² (mjereno s udaljenosti od 1 cm) (slika 8). Reakcijska smjesa bila je osvjetljena lampom 5 minuta te je zatim sniman ³¹P NMR spektar. Postupak je ponovljen nekoliko puta. Međutim, za vrijeme osvjetljavanja Kessil lampom reakcijska smjesa nije bila termostatirana, odnosno zagrijavala se tijekom osvjetljavanja. Stoga je bilo potrebno razdvojiti učinak UV svjetla od termičkog efekta (povećanje temperature smjese). Zato je proveden eksperiment bez osvjetljavanja s reakcijskom smjesom u epruveti 3 (Tablica 2) koja je bila termostatirana na temperaturi od 40 °C.

Kako bi se točno odredio utjecaj UV svjetla na reakciju, bilo je potrebno provesti eksperiment unutar NMR uređaja u kojem je NMR cjevčica termostatirana i u koju je izvana uvedeno optičko vlakno povezano s izvorom odgovarajuće svjetlosti.

Tablica 2. Korištene mase i volumeni supstanci za pripremu uzoraka u drugom orijentacijskom pokusu, izračunate koncentracije ifosfamida i hipokloritnog iona.

	Epruveta 1	Epruveta 2	Epruveta 3
m (ifosfamid)	6.6 mg	6.6 mg	6.6 mg
V (D ₂ O)	630 µL	630 µL	630 µL
V (NaOCl)	20 µL	20 µL	20 µL
c (OCl ⁻)	67.7 mM	67.7 mM	67.7 mM
c (ifosfamid)	38.9 mM	38.9 mM	38.9 mM

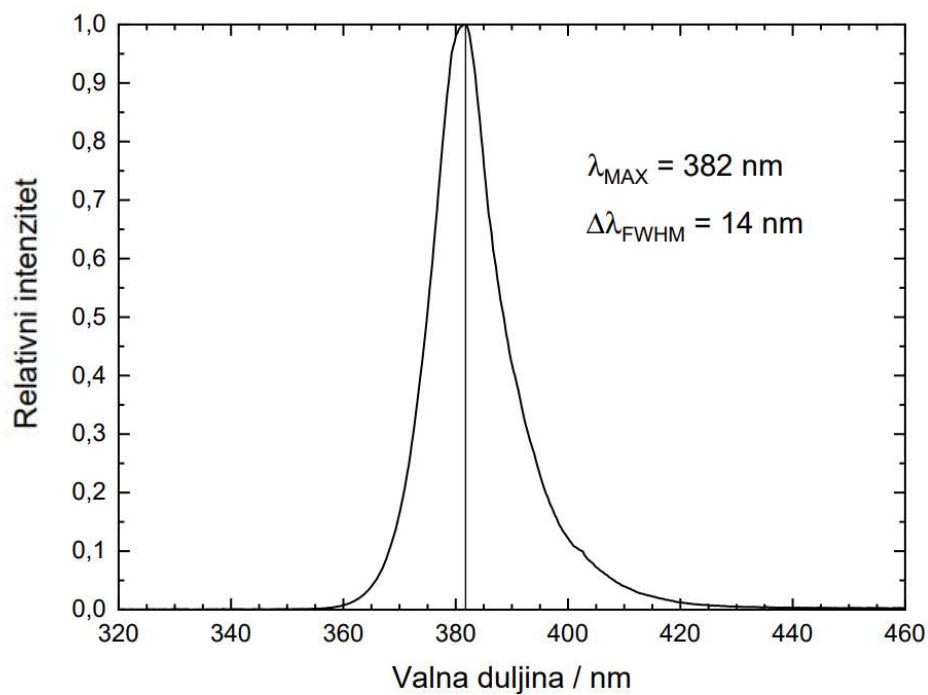
Osim orijentacijskih pokusa „off-site“, napravljeni su i *in situ* pokusi usporedbe utjecaja bijelog i UV svjetla na reakciju kloriranja ifosfamida. Uspoređivao se uzorak u epruveti 2 (Tablica 3), kojeg se obasjavalo bijelom svjetlošću tijekom reakcije, s uzorkom u epruveti 1 (Tablica 3), kod kojeg se reakcija odvijala u mraku. Isti eksperiment je ponovljen s izvorom UV svjetlosti kojom se obasjavao uzorak iz epruvete 3 (Tablica 3) te je uspoređena dobivena krivulja s onom dobivenom za epruvetu 1 (Tablica 3). Iz epruvete 1 (Tablica 3) i epruvete 3 (Tablica 3) je odvojeno 500 μL uzorka kako bi visina stupca uzorka u NMR cjevčici bila jednaka kao u drugim eksperimentima. Svi uzorci su termostetirani na 20 °C tijekom reakcije.

Kao izvor UV svjetlosti korištena je LED lampa maksimuma intenziteta na 382 nm (slika 4). Intenzitet lampe u NMR cjevčici iznosi 25 mW/cm^2 .

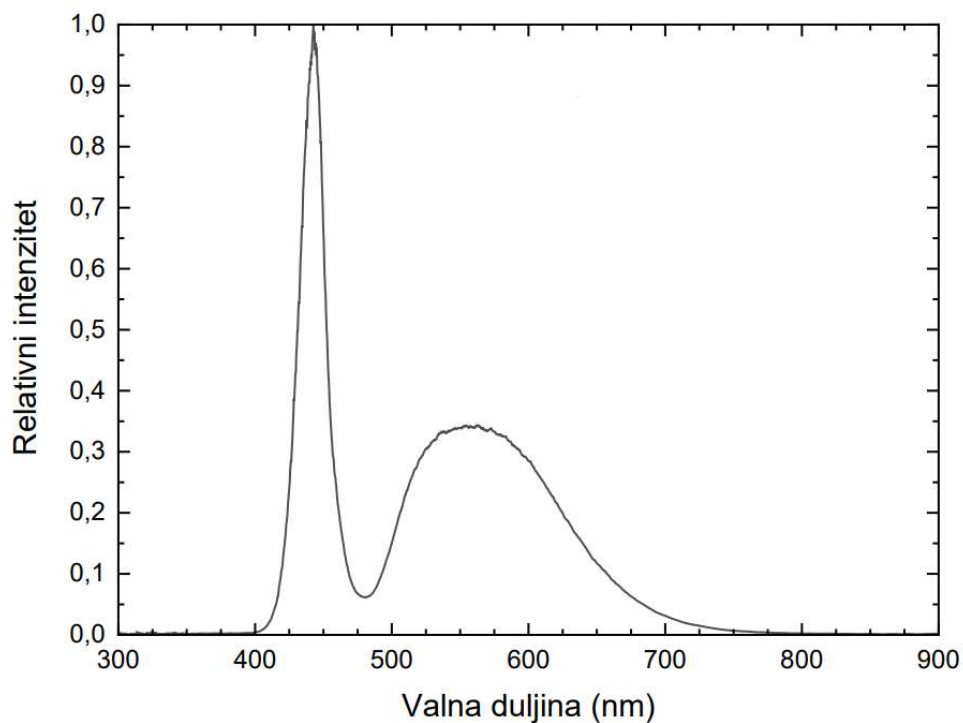
Kao izvor bijele svjetlosti (bez UV i IR dijela spektra) korištena je LED lampa LED Ultra White 6500 K (slika 5).

Tablica 3. Korištene mase i volumeni supstanci za pripremu uzoraka, izračunate koncentracije ifosfamida i hipokloritnog iona.

	Epruveta 1	Epruveta 2	Epruveta 3
m (ifosfamid)	6.6 mg	5.8 mg	6.9 mg
V (D_2O)	630 μL	482.4 μL	630 μL
V (NaOCl)	20 μL	17.6 μL	20 μL
c (OCl^-)	67.7 mM	77.4 mM	67.7 mM
c (ifosfamid)	38.9 mM	44.4 mM	40.7 mM



Slika 4. Grafički prikaz relativnog intenziteta svjetlosti na određenoj valnoj duljini za UV LED 380 nm lampu



Slika 5. Grafički prikaz relativnog intenziteta svjetlosti na određenoj valnoj duljini za LED Ultra White 6500 K lampu



Slika 6. NMR spektrometar Varian INOVA 4000



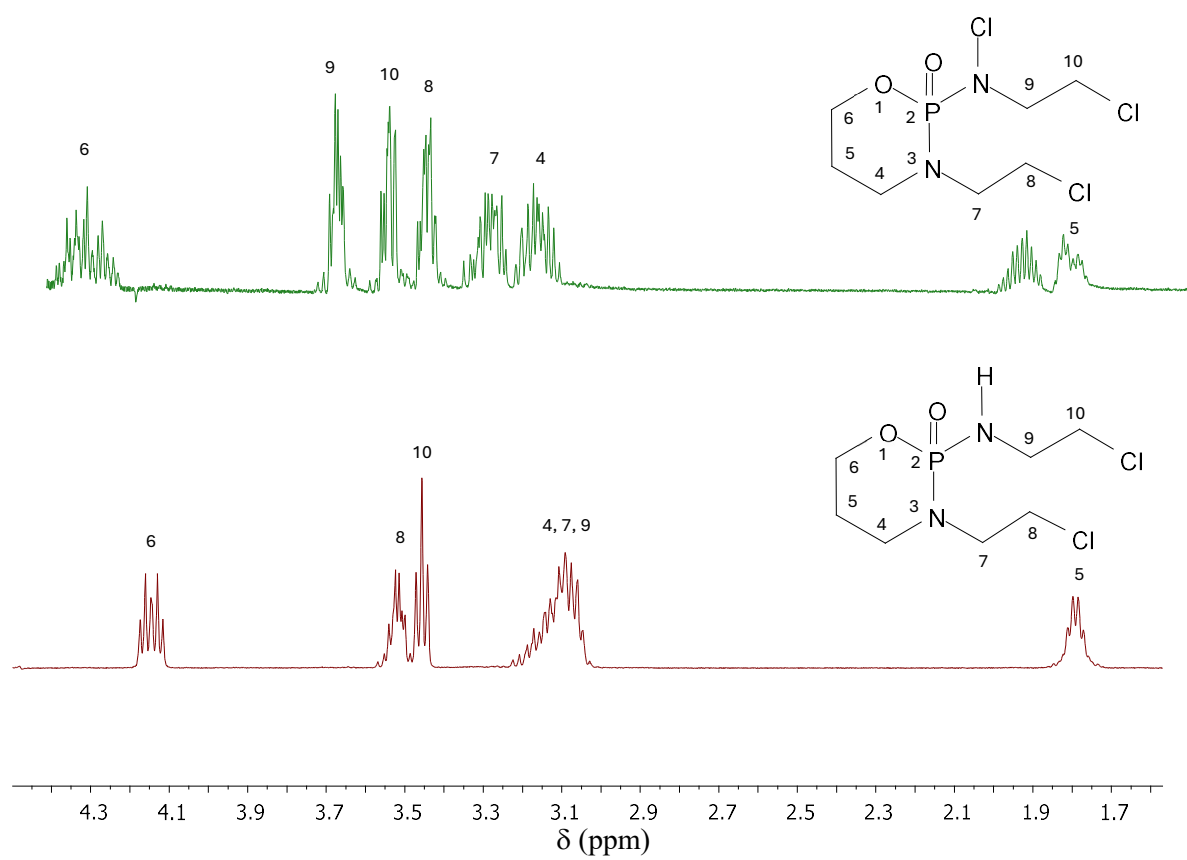
Slika 7. Prikaz optičkog vlakna koje se nalazi unutar NMR cjevčice s uzorkom



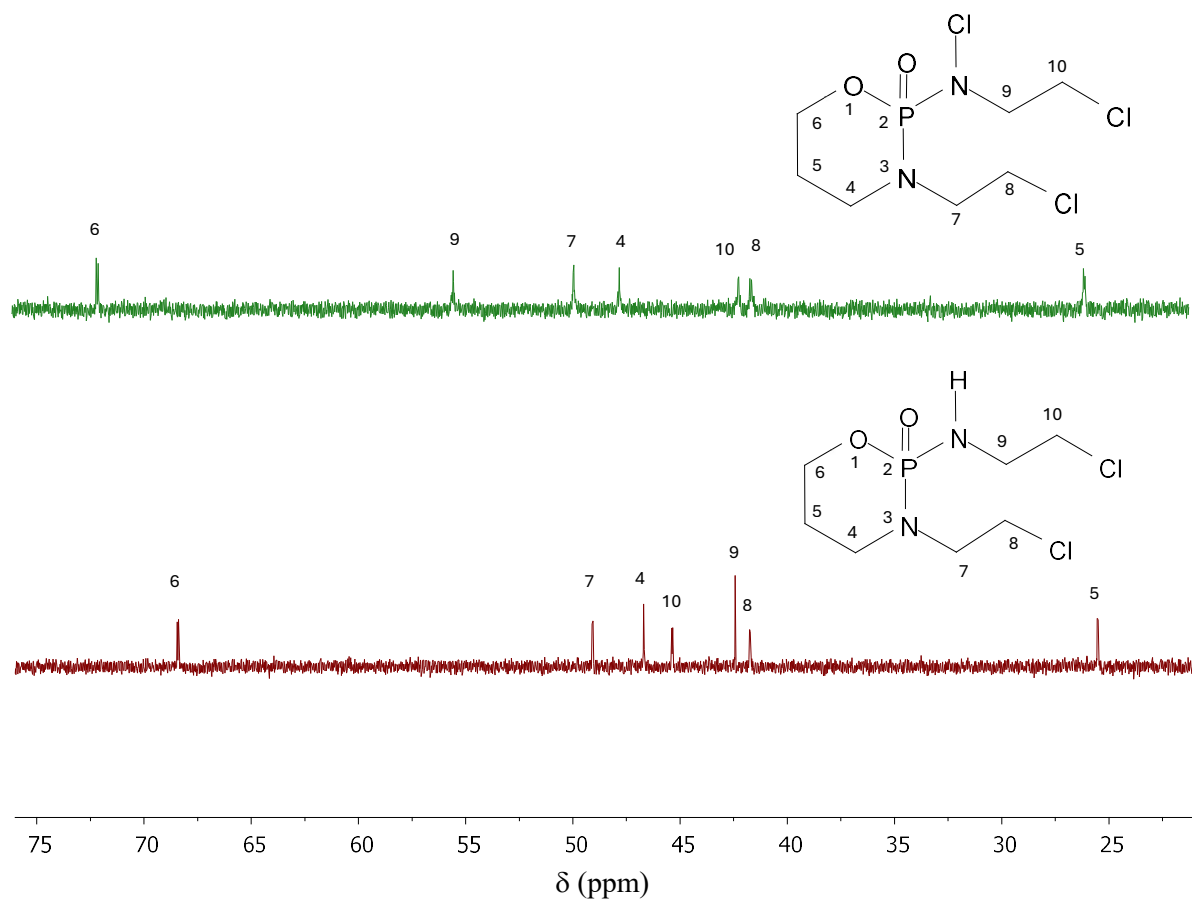
Slika 8. Aparatura za „off site“ osvjetljavanje uzoraka pomoću Kessil lampe PR160L- 370 nm

Gen 2

4. REZULTATI I RASPRAVA

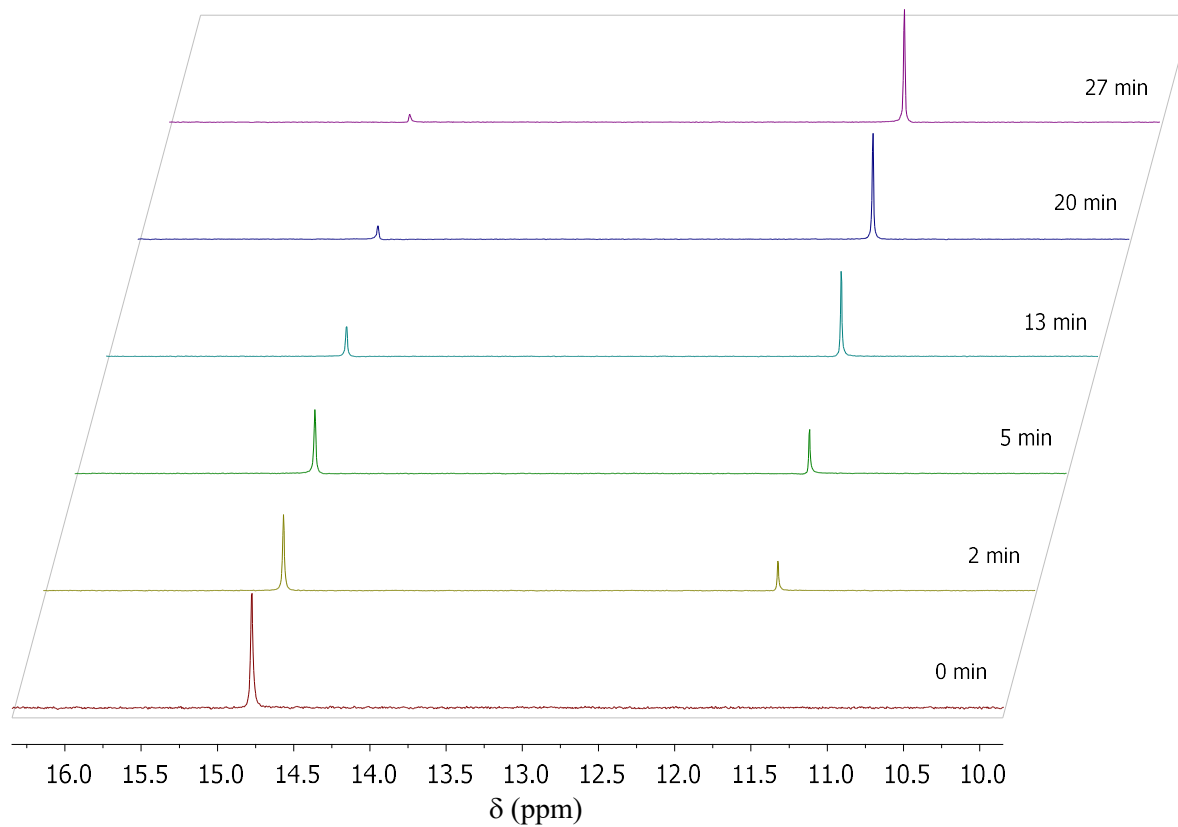


Slika 9. ^1H NMR spektar ifosfamida (crveno) i produkta kloriranja (zeleno) u D_2O

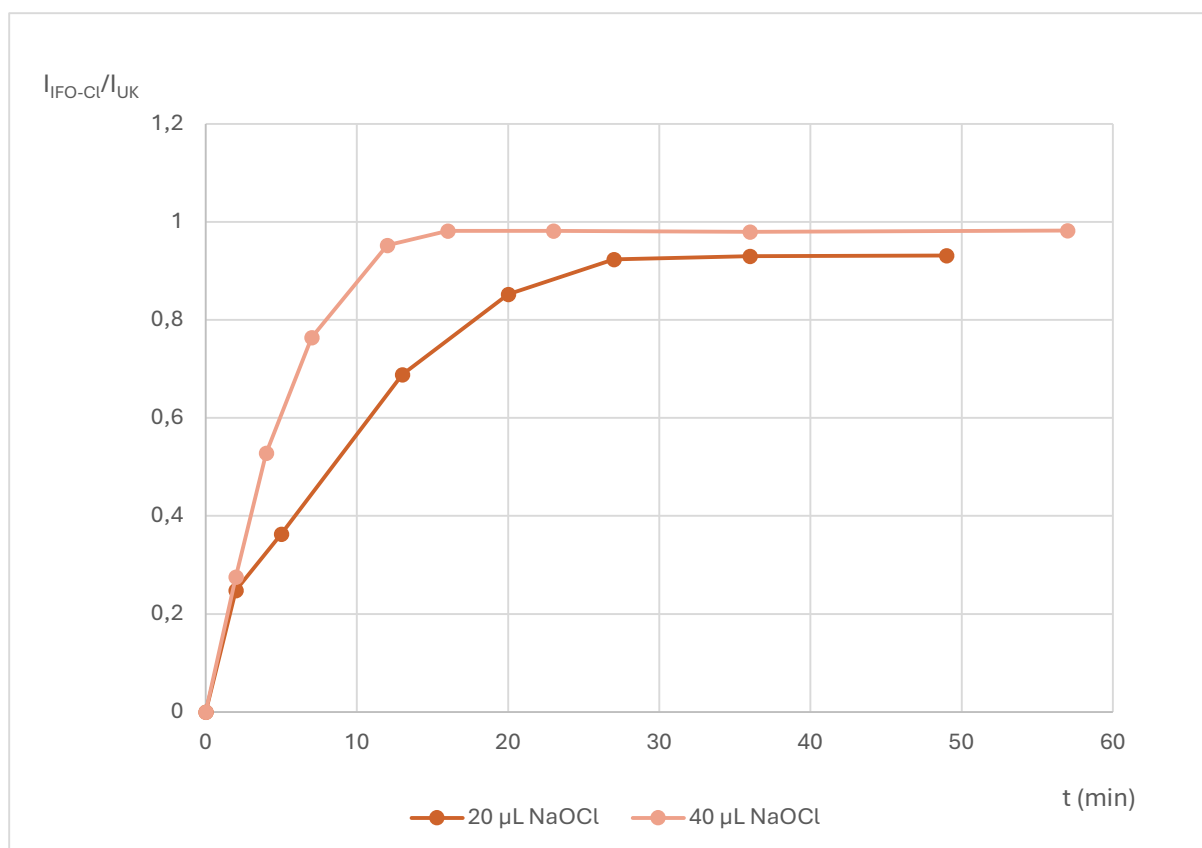


Slika 10. ^{13}C NMR spektar ifosfamida (dolje, crveno) i produkta kloriranja (gore, zeleno)

Nakon kloriranja dolazi do vidljivih pomaka određenih signala u ^{13}C NMR spektru prema većem kemijskom pomaku iz čega se može zaključiti da u blizini tih ugljikovih atoma dolazi do promjene u strukturi te njihove jezgre postaju manje zasjenjene elektronskim oblakom. To ukazuje na snažan elektron-odvlačeći učinak klora u strukturi.

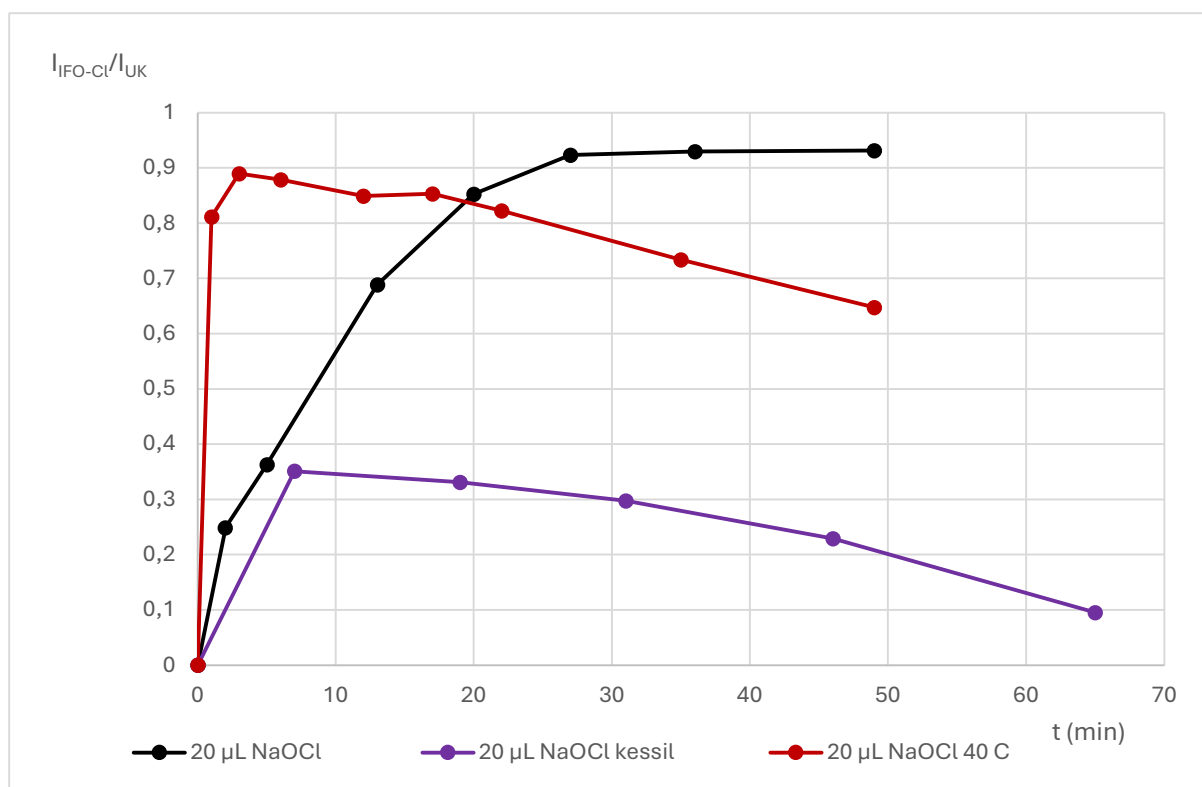


Slika 11. ^{31}P NMR spektri ifosfamida (14.77 ppm) i kloriranog produkta (11.52 ppm) u teškoj vodi tijekom kloriranja ifosfamida pomoću 20 μL NaOCl u tami na 20 °C



Slika 12. Graf ovisnosti $I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ o vremenu kloriranja ifosfamida pomoću 20 µL NaOCl i 40 µL NaOCl. $I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ predstavlja omjer integrala ^{31}P signala kloriranog produkta ifosfamida i integrala signala svih specija u reakcijskoj smjesi.

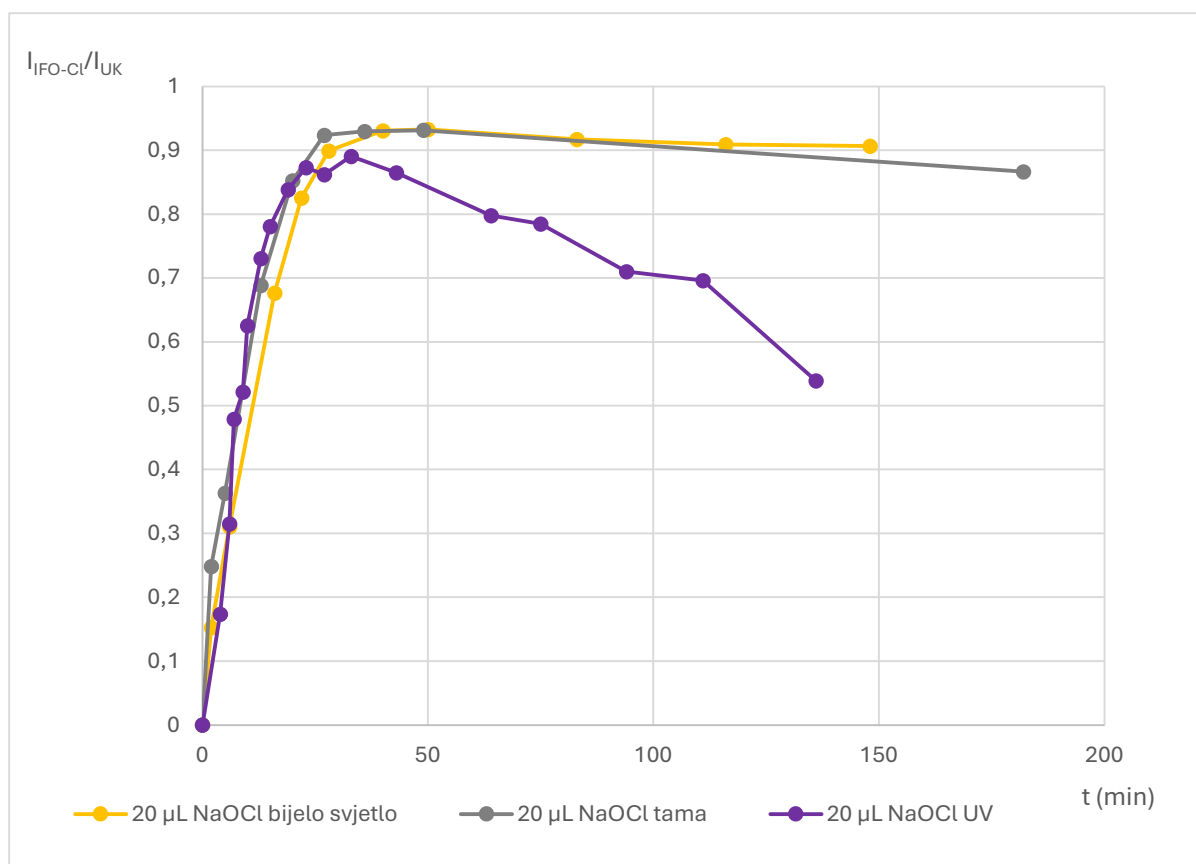
Iz grafa (slika 12) je vidljivo da porastom koncentracije klorirajućeg sredstva raste i brzina kloriranja ifosfamida. Pri dodatku 40 µL NaOCl 50% produkta nastaje za oko 4 minute, dok je uz dodatak dvostruko manje količine NaOCl za isti doseg reakcije potrebno oko 8 minuta. U prvom slučaju reakcija ide gotovo do kraja i udio kloriranog produkta doseže 98 % nakon 16 minuta od početka reakcije. U drugom slučaju postiže se maksimalni udio kloriranog produkta od 93% nakon 49 minuta.



Slika 13. Graf ovisnosti $I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ o vremenu kloriranja ifosfamida pomoću 20 µL NaOCl u tami na 20 °C, u tami na 40 °C, te pod Kessil lampom. $I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ predstavlja omjer integrala signala kloriranog produkta ifosfamida i integrala signala svih specija u reakcijskoj smjesi.

Iz grafa (Slika 13) je vidljivo da viša temperatura (40 °C) ubrzava nastajanje kloriranog produkta, ali isto tako dovodi i do njegove brže razgradnje, nego u slučaju uzorka na nižoj temperaturi (20 °C). U slučaju reakcije u kojoj je smjesa osvijetljivana Kessil lampom, uzorak nije termostatiran stoga nije moguće definirati temperaturni učinak na reakcijski profil.

Usprkos tome očigledan je inhibicijski učinak UV zračenja na udio nastalog kloriranog produkta, neovisno o udjelu temperaturnog efekta, jer u slučaju osvijetljavanja UV zračenjem dolazi do izrazitog usporavanja brzine kloriranja i pada koncentracije nastalog produkta.



Slika 14. Graf ovisnosti $I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ o vremenu kloriranja pomoću 20 µL NaOCl u tami, tijekom osvjetljavanja izvorom bijele svjetlosti i tijekom osvjetljavanja izvorom UV svjetlosti. Svi uzorci su termostetirani na 20 °C tijekom reakcije. $I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ predstavlja omjer integrala signala kloriranog produkta ifosfamida i integrala signala svih specija u reakcijskoj smjesi.

Na temelju krivulja prikazanih na grafu (Slika 14) ne može se nedvojbeno donijeti zaključak o utjecaju bijele svjetlosti na reakciju kloriranja ifosfamida, no može se zaključiti da zračenje korištenog intenziteta ima minimalan utjecaj na reakciju.

U sva tri slučaja oko 90 % produkta nastaje u prvih pola sata reakcije, a nakon toga se vidi značajan UV zračenjem induciran proces vraćanja kloriranog produkta u početni ifosfamid.

5. ZAKLJUČAK

Mnogi su N-klorirani produkti osjetljivi na fotokemijsku razgradnju što znači da brzina nastajanja kloriranog ifosfamida i doseg kloriranja mogu biti smanjeni u prisutnosti svjetlosti. No bitno je spomenuti da je fotokemijska razgradnja jako ovisna o intenzitetu i tipu zračenja, što je pokazano u ovom radu. U slučaju kloriranja ifosfamida pod utjecajem UV zračenja (LED lampa, 380 nm) početna brzina nastajanja kloriranog ifosfamida jednaka je onoj u mraku. Međutim, brzina razgradnje nastalog produkta veća je pod utjecajem UV svjetla. Kloriranjem pod Kessil lampom jakog intenziteta izražena je inhibicija reakcije kloriranja i povratak kloriranog produkta u početni ifosfamid. Kidanje se N-Cl veze vjerojatno odvija mehanizmom homolitičkog cijepanja pri čemu nastaje N- radikal na kojeg se veže atom vodika te nastaje ifosfamid. Što je intenzitet zračenja veći, reakcija se odvija brže. Toksikološki profil kloriranog produkta nije poznat i iz tog je razloga potrebno provesti ekotoksikološke studije jer mehanizam njegove pregradnje u ifosfamid uključuje radikalske međuprodukte koji su reaktivne specije.

Ifosfamid je, prema tome, spoj koji se postupkom redovitog kloriranja teško može ukloniti iz otpadnih voda. Njegovim kloriranjem nastaje potencijalno reaktivan produkt koji se pregrađuje pod utjecajem intenzivnog UV svjetla. Stoga je potrebno procijeniti druge kemijske procese obrade otpadnih voda kako bi se ifosfamid i njegov klorirani derivat efikasno uklonili iz okolišnih voda.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

CNS – centralni živčani sustav

δ – kemijski pomak

pKa – ionizacijska konstanta

ρ – gustoća

M_w – molekulska masa

$I_{\text{IFO-Cl}}/I_{\text{UK}}$ – omjer integrala pika kloriranog produkta ifosfamida i integrala pikova svih specija u reakcijskoj smjesi što odgovara udjelu kloriranog ifosfamida.

D₂O – teška voda

JRC – Joint Research Centre

7. LITERATURA

Ajithkumar T, Parkinson C, Shamshad F, Murray P (2007). Ifosfamide encephalopathy. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*, 19(2), 108-114.

Fleming R A (1997). An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy*, 17(5 Pt 2), 146S-154S.

Gilard V, Martino R, Malet-Martino M, Niemeyer U i Pohl J (1999). Chemical Stability and Fate of the Cytostatic Drug Ifosfamide and Its N-Dechloroethylated Metabolites in Acidic Aqueous Solutions. *J. Med. Chem.*, 42(14), 2542-2560.

Holoxan 1000 mg prašak za otopinu za injekciju/infuziju, 2019., <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Holoxan-1000-mg-prasak-za-otopinu-za-injekciju-infuziju/8915/> , pristupljeno 29.01.2025.

Ifosfamide, 2012., <https://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0015312> , pristupljeno 17.02.2025.

Luna Trujillo M, Palma-Goyes R, Vazquez-Arenas J, Manzo-Robledo A (2020). Formation of active chlorine species involving the higher oxide MO_{x+1} on active Ti/ RuO₂-IrO₂ anodes: A DEMS analysis. *J. Electroanal. Chem.* 878, 114661

Mioduszewska K, Dołżonek J, Wyrzykowski D, Kubik Ł, Wiczling P, Sikorska C, Toński M, Kaczyński Z, Stepnowski P, Białk-Bielińska A (2017). Overview of experimental and computational methods for the determination of the pK_a values of 5-fluorouracil, cyclophosphamide, ifosfamide, imatinib and methotrexate, *Trends in Analytical Chemistry*

Reberski LJ, Selak A, Vrčec V, ... , Zicardi S, Roati G, Attenuation of emerging contaminants for water supply purposes (natural attenuation and technical removals). U: Monograph of the boDEREC-CE project “Board for detection and assessment of pharmaceutical drug residues in drinking water - capacity building for water management in CE”. Lukač RJ, Selak A, urednici, Zagreb, Hrvatski geološki zavod, 2022, str. 115-124

Wade LG, Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 561-624

Willcott MR(2009). MestReNova. J. Am. Chem. Soc., 131, 13180–13180.

8. SAŽETAK

Ifosfamid se nalazi u grupi citotoksičnih lijekova kojeg je JRC Europske komisije svrstala u zabrinjavajuće spojeve obzirom da još uvijek nije razvijena učinkovita metoda njegovog uklanjanja iz otpadnih voda. Najvećim dijelom se izlučuje urinom nepromijenjen i kao takav dolazi u sustav otpadnih voda. U ovom radu je proučavana reakcija kloriranja ifosfamida u tami i pod utjecajem različitih tipova elektromagnetskog zračenja (bijelo svjetlo, UV svjetlo), s ciljem utvrđivanja učinkovitosti najčešće korištenih metoda obrade otpadnih voda u uklanjanju navedenog onečišćivala iz otpadnih voda. Identificiran je glavni produkt reakcije kloriranja i razmotrena njegova stabilnost u mraku i pod svjetlom, kako bi se utvrdila njegova relevantnost za ekotoksikološka ispitivanja. Iz dobivenih ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR spektara, može se zaključiti da dolazi do kloriranja egzocikličkog dušika iz N-(2-kloroetil) skupine ifosfamida. Klorirani produkt je fotolabilan u prisutnosti UV svjetla i njegova razgradnja je jako ovisna o intenzitetu zračenja, dok je sam ifosfamid stabilan. Obzirom da se pregradnja kloriranog ifosfamida u ifosfamid vjerojatno odvija putem homolitičkog cijepanja, ali i zbog same toksičnosti ifosfamida, potrebno je provesti daljnja istraživanja ekotoksičnosti kloriranih produkata.

SUMMARY

Ifosfamide is in the group of cytotoxic drugs classified by the JRC of the European Commission as a compound of concern, since an effective method of its removal from wastewater has not yet been developed. It is mostly excreted in the urine unchanged and as such enters the wastewater system. In this paper, the chlorination reaction of ifosfamide in the dark and under the influence of different types of electromagnetic radiation (white light, UV light) was studied, with the aim of determining the effectiveness of the most commonly used wastewater treatment methods in removing this pollutant from wastewater. The main product of the chlorination reaction was identified and its stability in the dark and under light was considered, in order to determine its relevance for ecotoxicological studies. From the obtained ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR spectra, it can be concluded that chlorination of exocyclic nitrogen from the N-(2-chloroethyl) group of ifosfamide occurs. The chlorinated product is photolabile in the presence of UV light and its degradation is highly dependent on the intensity of radiation, while ifosfamide itself is stable. Given that the conversion of chlorinated ifosfamide to ifosfamide probably occurs by homolytic cleavage, but also due to the toxicity of ifosfamide itself, further research on the ecotoxicity of chlorinated products needs to be conducted.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Organsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska
ili druga adresa

Diplomski rad

NMR studija utjecaja UV svjetla na reakciju kloriranja ifosfamida

Edi Vuljanković

SAŽETAK

Ifosfamid se nalazi u grupi citotoksičnih lijekova kojeg je JRC Europske komisije svrstala u zabrinjavajuće spojeve obzirom da još uvijek nije razvijena učinkovita metoda njegovog uklanjanja iz otpadnih voda. Najvećim dijelom se izlučuje urinom nepromijenjen i kao takav dolazi u sustav otpadnih voda. U ovom radu je proučavana reakcija kloriranja ifosfamida u tami i pod utjecajem različitih tipova elektromagnetskog zračenja (bijelo svjetlo, UV svjetlo), s ciljem utvrđivanja učinkovitosti najčešće korištenih metoda obrade otpadnih voda u uklanjanju navedenog onečišćivala iz otpadnih voda. Identificiran je glavni produkt reakcije kloriranja i razmotrena njegova stabilnost u mraku i pod svjetlom, kako bi se utvrdila njegova relevantnost za ekotoksikološka ispitivanja. Iz dobivenih ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR spektara, može se zaključiti da dolazi do kloriranja egzocikličkog dušika iz N-(2-kloroetil) skupine ifosfamida. Klorirani produkt je fotolabilan u prisutnosti UV svjetla i njegova razgradnja je jako ovisna o intenzitetu zračenja, dok je sam ifosfamid stabilan. Obzirom da se pregradnja kloriranog ifosfamida u ifosfamid vjerojatno odvija putem homolitičkog cijepanja, ali i zbog same toksičnosti ifosfamida, potrebno je provesti daljnja istraživanja ekotoksičnosti kloriranih produkata.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 22 stranice, 14 grafičkih prikaza, 3 tablice i 10 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ifosfamid, NMR, klorirani ifosfamid, reakcija N-kloriranja

Mentor: **Dr. sc. Valerije Vrček**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ime i Prezime**, viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ime i Prezime, viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ime i Prezime, viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2025.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Organic chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

NMR study of the effect of UV light on the chlorination reaction of ifosfamide

Edi Vuljanković

SUMMARY

Ifosfamide is in the group of cytotoxic drugs classified by the JRC of the European Commission as a compound of concern, since an effective method of its removal from wastewater has not yet been developed. It is mostly excreted in the urine unchanged and as such enters the wastewater system. In this paper, the chlorination reaction of ifosfamide in the dark and under the influence of different types of electromagnetic radiation (white light, UV light) was studied, with the aim of determining the effectiveness of the most commonly used wastewater treatment methods in removing this pollutant from wastewater. The main product of the chlorination reaction was identified and its stability in the dark and under light was considered, in order to determine its relevance for ecotoxicological studies. From the obtained ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR spectra, it can be concluded that chlorination of exocyclic nitrogen from the N-(2-chloroethyl) group of ifosfamide occurs. The chlorinated product is photolabile in the presence of UV light and its degradation is highly dependent on the intensity of radiation, while ifosfamide itself is stable. Given that the conversion of chlorinated ifosfamide to ifosfamide probably occurs by homolytic cleavage, but also due to the toxicity of ifosfamide itself, further research on the ecotoxicity of chlorinated products needs to be conducted.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 22 pages, 14 figures, 3 tables and 10 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ifosfamide, NMR, chlorinated ifosfamide, N-chlorination reaction

Mentor: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ime i Prezime, Ph.D.** */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ime i Prezime, Ph.D. */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ime i Prezime, Ph.D. */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2025.