

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 9.07.2015. godine, određeni smo za članove Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Aleksandra Mladenovića, dipl. inž. tehnologije pod nazivom :
“Proučavanje stabilnosti donepezil-hidrohlorida različitim analitičkim metodama”.
Posle pregleda doktorske disertacije Komisija podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A.PRIKAZ SADRŽAJA DISERTACIJE

Doktorska disertacija Aleksandra Mladenovića napisana je na srpskom jeziku na 176 strana i sadrži Izvod (na srpskom i engleskom jeziku), Uvod u kome je definisan cilj doktorske disertacije, Teorijski deo sa pregledom literature o oblastima koje su u vezi sa temom (68 strana), Eksperimentalni deo (17 strana), Rezultate i diskusiju (50 strana), Zaključak (3 strane), Literaturu (9 strana), Prilog (22 strana), Biografiju kandidata, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije i Izjavu o korišćenju. Tekst disertacije sadrži 83 slika, 26 tabela i 121 literaturnih navoda.

U uvodu je prikazano objašnjenje značaja analitičkog ispitivanja lekova koji se nazivaju „inhibitori acetilholinesteraze“ u cilju proširenja saznanja o njihovom mehanizmu delovanja, stabilnosti, kao i razvoju metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje, pri čemu je odabran donepezil-hidrohlord.

Istaknuto je da je predmet rada ispitivanje stabilnosti donepezil-hidrohlorida kao aktivne supstance i u komercijalnom obliku i da se ispitivanjem stabilnosti odgovarajućim transformacijama donepezil-hidrohlorida razviju metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje donepezil hidrohlorida u smešama, a analizom dobijenih smeša nakon određenih reakcija forsirane razgradnje utvrdi priroda transformacija ispitivanog molekula. U tom cilju korišćene su različite tehnike za ispitivanje: tehnike za ispitivanje elektrohemijske aktivnosti (ciklična voltometrija (CV) i voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV)), tehnike koje su korišćene za ispitivanje elektrolita posle elektrohemijskih reakcija, visokoeffikasna tečna hromatografija (HPLC) i masena spektrometrija (MS) i tehnike koje su koje korišćene za strukturnu karakterizaciju svih dobijenih proizvoda razgradnje korišćenjem IR i UV-Vis spektrofotometrija, LC-MS i 1D i 2D NMR spektroskopija.

Takođe je objašnjeno ispitivanje stabilnosti donepezil-hidrohlorida i proučavanje njegovih proizvoda razgradnje koji su dobijeni u studiji forsirane razgradnje u uslovima kisele i alkalne hidrolize, oksidacije, termičke i elektrohemijske razgradnje, kao i proučavanje njegove elektrohemijske aktivnosti.

Teorijski deo obuhvata 5 celina. U prvom delu opisani su „inhibitori acetilholinesteraze“ njihova farmakologija i posebno donepezil-hidrohlorid. U drugom delu su kratko opisane elektrohemijske metode (ciklična voltometrija i SWV voltometrija) koje su korišćene u istraživanju; opisane su elektrohemijske metode određivanja donepezil-hidrohlorida iz literaturnih navoda, zatim je dat pregled odabranih hromatografskih i spektrometrijskih tehnika i njihovih principa, a posebno su predstavljene hromatografske i spektrometrijske metode određivanja donepezil-hidrohlorida iz literaturnih navoda. U trećem delu objašnjeni su osnovi ispitivanja stabilnosti lekova, studija forsirane razgradnje aktivnih farmaceutskih supstanci i gotovih proizvoda i objašnjeni su mehanizmi razgradnje koji se najčešće pojavljuju kod aktivnih supstanci i različitih farmaceutskih oblika. Na kraju je dat osvrt na tehnike izolovanja nepoznatih nečistoća i proizvoda razgradnje korišćenjem semipreparativnih HPLC metoda koje su neophodne pre primene dalje spektroskopske analize za strukturnu karakterizaciju nepoznatih jedinjenja. Dat je pregled osnovnih eksperimenata NMR spektroskopije koji se koriste za potpunu strukturnu karakterizaciju nepoznatih jedinjenja. Pored toga dat je i osvrt na in-silico predviđanje stabilnosti i mehanizma razgradnje aktivnih farmaceutskih supstanci korišćenjem softvera za predviđanje reaktivnosti organskih molekula.

Eksperimentalni deo obuhvata: opis materijala, pripremu uzoraka, detaljni opis urađenih eksperimenata u studiji forsirane razgradnje, opis aparata i uređaja koji su korišćeni, kao i opis upotrebljenih metoda: CV, SWV, HPLC, semipreparativna HPLC, LC-MS i NMR. U delu rezultati i diskusije prikazana su ostvarenja grupisana u 7 celina. Prvi deo se odnosi na razvoj i validaciju HPLC analitičke metode za određivanje donepezil-hidrohlorida kao aktivne supstance i u gotovom proizvodu. U drugom delu prikazani su rezultati studije forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida i komercijalnog proizvoda donepezil tableta pri različitim uslovima forsirane razgradnje (kisele, alkalne, oksidacione, termičke i elektrohemijske) primenom tačne hromatografije. U trećem delu prikazani su rezultati elektrohemijskog ispitivanja donepezil-hidrohlorida primenom ciklične voltetrije i SWV voltetrije i strukturne identifikacije

glavnog proizvoda elektrohemijske oksidacije donepezila na elektrodi od zlata. U četvrtom delu su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida (alkalne, oksidacione i termičke) primenom LC-MS tehnike, kao i rezultati karakterizacije proizvoda razgradnje na osnovu izvedenih molekulskih masa iz preciznih masa dobijenih merenjem primenom tehnike LC-MS visoke rezolucije. U petom delu su prokazani rezultati koji su dobijeni strukturnom analizom semi-preparativno izolovanih odabranih nepoznatih jedinjenja koji su dobijeni kao proizvodi oksidativne razgradnje donepezil-hidrohlorida primenom ESI-LC-TOF analize i NMR spektroskopije. U šestom delu su prikazani rezultati in-silico predviđanja hemijske reaktivnosti donepezil-hidrohlorida prema oksidaciji u prisustvu vodonik-peroksida korišćenjem softvera za predviđanje hemijskih reakcija organskih molekula.

Zaključak sadrži sumirane rezultate dobijene u ovoj disertaciji (podeljene u 13 tačaka) uz naglašavanje pojedinih opisanih rezultata koji predstavljaju određeni naučni doprinos. U prilogu su dati snimljeni NMR spektri donepezil-hidrohlorida i njegovih proizvoda razgradnje. Na kraju je data biografija kandidata i spisak objavljenih i saopštenih rezultata koji čine deo disertacije.

B. OPIS REZULTATA TEZE

U cilju proučavanja stabilnosti donepezil-hidrohlorida, koji na osnovu literaturnih podataka i njegove hemijske strukture, predstavlja relativno stabilan molekul, posebno su proučavani proizvodi razgradnje donepezil-hidrohlorida u uslovima forsirane razgradnje primenom izokratske RP-HPLC metode. U skladu sa ICH Q2B regulativom validirana je “*stability indicating*” RP-HPLC metoda za određivanje srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida u aktivnoj supstanci i gotovom proizvodu. Predložena RP-HPLC metoda je selektivna, tačna i reproduktivna u opsegu metode i može se primeniti za kvantifikaciju srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida u rutinskoj kontroli i za praćenje stabilnosti gotovog proizvoda. Osnovni rastvori donepezil-hidrohlorida u studiji forsirane razgradnje su podvrgnuti kiseloj i alkalnoj hidrolizi, oksidaciji, termičkoj i elektrohemijskoj razgradnji u fosfatnom puferu pH = 3 na elektrodi od zlata, pri čemu su određeni različiti procenti razgradnje. Donepezil-hidrochlorid je pokazao stabilnost prema uslovima hidrolitičke razgradnje, oksidacije i termičke razgradnje, koje predlaže ICH. Značajna razgradnja donepezil-hidrohlorida i donepezil-hidrohlorida u komercijalnom proizvodu je dobijena u primenom drastičnijih uslova alkalne hidrolize i oksidacije u prisustvu vodonik-peroksida. Ispitivanje forsirane razgradnje farmakološki aktivne

supstance donepezil-hidrohlorida i gotovog proizvoda omogućilo je uspostavljanje efikasne, selektivne i osjetljive HPLC analitičke metode koja će omogućiti kvalitativno i kvantitativno određivanje nečistoća i razgradnih proizvoda u rutinskoj kontroli kvaliteta komercijalnog proizvoda i u dugoročnim studijama ispitivanja stabilnosti leka.

Elektrohemijским ispitivanjem ponašanja donepezil-hidrohlorida primenom CV i SWV metoda i paralelnim ispitivanjem HPLC metodom, pokazano je da se ove elektrohemijske metode mogu upotrebljavati kao dopuna oficijalnim analitičkim metodama. Svi dobijeni rezultati pokazuju da se ove elektrohemijske metode, koje su po prvi put izvedene do sada, na elektrodi od zlata, u fosfatnom puferu, mogu koristiti za kvalitativno i kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida. Dobijene su veoma dobre linearne zavisnosti anodnih struja od koncentracija donepezila. Polikristalna elektroda od zlata se pokazala kao optimalna radna elektroda za ispitivanje donepezil-hidrohlorida.

Glavni proizvodi razgradnje koji su dobijeni oksidativnom razgradnjom u prisustvu vodonik-peroksida i u ispitivanjima elektrohemijskog ponašanja donepezil-hidrohlorida u rastvoru elektrolita u elektrohemijskoj ćeliji nakon ciklizacije potencijala su detektovani LC-MS metodom i izvršena je potpuna strukturna karakterizacija proizvoda razgradnje pomoću ESI-LC-TOF merenja i NMR spektroskopije.

Prema dobijenim rezultatima in-silico predviđanja reaktivnosti donepezil-hidrohlorida korišćenjem softvera za predviđanje organskih reakcija potvrđuju činjenicu da je donepezil-hidrohlorid relativno stabilan molekul i da su najverovatnije reakcije donepezil-hidrohlorida sa vodonik-peroksidom posredstvom mehanizma slobodnih radikala.

C. Uporedna analiza rezultata sa rezultatima iz literature

Do objavljivanja rezultata istraživanja predstavljenih u ovoj tezi u naučnoj i stručnoj literaturi nije bilo podataka o elektrohemijском određivanju donepezil-hidrohlorida, na elektrodi od zlata u fosfatnom puferu. Radovi koji opisuju elektrohemijско određivanje donepezil-hidrohlorida, kao aktivne supstance i u različitim farmaceutskim oblicima, kao i u biološkim uzorcima, odnose se na cikličnu i diferencijalnu pulsnu voltometriju, ali se ne pominje elektroanalitički postupak sa primenom radne elektrode od zlata. Donepezil-hidrohlorid se može određivati različitim analitičkim metodama: titrimetrijom, UV-Vis spektrofotometrijom, fluorometrijom, kapilarnom elektroforezom, različitim hromatografskim metodama (tečna

hromatografija, tečna hromatografija sa elektrohemijским detektorom, tečna hromatografija sa masenim detektorom), masenom spektrometrijom i imunohemijским metodama.

U ovom radu su identifikovani i potpuno strukturno okarakterisani proizvodi razgradnje, koji se literaturno ne pominju u ranijim radovima kao proizvodi razgradnje, a proizvodi su transformacije donepezil-hidrohlorida pod uticajem oksidacije u rastvoru u prisustvu vodonik-peroksida i elektrohemijском oksidacijom. Identifikovani proizvodi oksidativne razgradnje u prisustvu vodonik-peroksida predstavljaju i glavne proizvode metabolizma u ljudskom organizmu. Na ovaj način primenom oksidativne razgradnje u studiji forsirane razgradnje in-vitro su generisani neki od glavnih metabolita u ljudskom organizmu.

D. Objavljeni i saopšteni radovi disertacije

Iz disertacije su do sada publikovana 3 rada u međunarodnom časopisima (M21 i M23). Pored toga, jedan rad je saopšten na međunarodnom skupu štampan u izvodu (M34).

M21. Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. **Aleksandar R. Mladenović**, Dušan Ž. Mijin, Saša Z. Drmanić, Vlatka E. Vajs, Vladislava M. Jovanović, Slobodan D. Petrović, Milka L. Avramov-Ivić, Electrochemical oxidation of donepezil and its voltametric determination at gold electrode, *Electroanalysis* (2014), vol. 26, issue 5, 893–897 (IF=2,502), ISSN: 1040-0397.

M23. Rad u međunarodnom časopisu

1. **Aleksandar R. Mladenović**, Milka B. Jadranin, Aleksandar D. Pavlović, Slobodan D. Petrović, Saša Ž. Drmanić, Milka L. Avramov-Ivić, Dušan Ž. Mijin, **Liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of donepezil degradation products**, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* (2015), vol. 21, issue 3, 447-455, (IF=0,892), ISSN: 2217-7434.

2. **Aleksandar R. Mladenović**, Vladislava M. Jovanović, Slobodan D. Petrović, Dušan Ž. Mijin, Saša Ž. Drmanić, Milka L. Avramov-Ivić, Determination of clopidogrel using square wave

voltammetry at gold electrode, *J. Serb. Chem. Soc.* (2013), vol.78 br.12, str. 2131-2140, ISSN 0352-5139.

M34. Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu:

1. Milka L. Avramov Ivić, **Aleksandar R. Mladenović**, Dušan Ž. Mijin, Saša Ž. Drmanić, Vlatka E. Vajs, Vladislava M. Jovanović and Slobodan D. Petrović „Electrochemical Oxidation of Donepezil and Its Voltammetric Determination at Gold Electrode“ 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Lausanne, Switzerland

E. Zaključak komisije

Na osnovu prethodno izloženog Komisija smatra da doktorska disertacija kandidata Aleksandra Mladenovića dipl.inž. tehnologije,, pod naslovom **“Proučavanje stabilnosti donepezil-hidrohlorida različitim analitičkim metodama”** predstavlja originalni naučni doprinos proučavanju stabilnosti i proizvoda razgradnje u raznim studijama forsirane razgradnje, i posebno elektrohemijske razgradnje i kvalitativnom i kvantitativnom analitičkom određivanju donepezil-hidrohlorida. Imajući u vidu postignute rezultate i ostvareni naučni doprinos, Komisija predlaže Nastavno naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i da ga zajedno sa urađenom doktorskom disertacijom **Aleksandra Mladenovića**, dipl. inž.tehnologije, učini dostupnim javnosti, a nakon toga pozove kandidata na usmenu odbranu pred Komisijom u istom sastavu.

U Beogradu, 07.09.2015.godine članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije

1. Dr. Slobodan D. Petrović, redovni profesor, TMF
2. Dr Milka L. Avramov Ivić, naučni savetnik, IHTM
3. Dr Vlatka E. Vajs, redovni profesor, HF
4. Dr Sote Vladimirov, redovni profesor, Farmaceutski fakultet
5. Dr Saša Ž. Drmanić, vanredni profesor, TMF