

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Aleksandar D. Pavlović

TEČNO-HROMATOGRAFSKA I
SPEKTROMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA I
ODREĐIVANJE ESOMEPRAZOLA,
NJEGOVIH NEČISTOĆA I
DEGRADACIONIH PROIZVODA

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Aleksandar D. Pavlović

LIQUID CHROMATOGRAPHIC AND
SPECTROMETRIC CHARACTERISATION
AND DETERMINATION OF
ESOMEPRAZOLE, ITS IMPURITIES AND
DEGRADATION PRODUCTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

1. dr Ljubiša Ignjatović,
Vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu
2. dr Vlatka Vajs,
Redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. dr Ljubiša Ignjatović,
Vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu
2. dr Vlatka Vajs,
Redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beograd
3. dr Miroslav Kuzmanović
Vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu
4. dr Marko Daković
Naučni saradnik na Fakultetu za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu

Ova doktorska teza je urađena kao rezultat saradnje Sektora istraživanja i razvoja, Hemofarm AD, Vršac, Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu i Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu. Započeta je u laboratoriji Odeljenja razvoja analitike, Hemofarm AD, pod rukovodstvom dr Vjere Pejanović u okviru projekta razvoja novog farmaceutskog proizvoda koji u svom sastavu ima za aktioni princip esomeprazol natrijum. Istraživanje je nastavljeno na Fakultetu za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Ljubiše Ignjatovića, kao i u Centaru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Vlatke Vajs. Neke od neophodnih sinteza neophodnih za ovaj rad su urađene ljubaznošću specijalizovane laboratorije Toronto Research Chemicals iz Kanade.

Želeo bih da se zahvalim svima koji su doprinijeli da ovaj rad dobije konacnu formu. Hvala dr Vlatki Vajs, dr Vjeri Pejanović i dr Ljubiši Ignjatović na učešću u izboru teme i celokupnoj pomoci i podršci koju su mi pružili u toku izrade rada; prof. dr Ljubiši Ignjatović i prof. dr Vlatki Vajs što su prihvatili da budu mentori ove teze ; prof. dr Miroslavu Kuzmanoviću i dr Marku Dakoviću na pregledu i ocjeni rada; dr Vlatki Vajs što mi je omogućila da dio eksperimenta bude urađen u Centaru za hemiju. Posebnu zahvalnost dugujem dr Milki Jadranin i dr Dejanu Gođevcu iz Centra za hemiju na nesebičnoj pomoci oko eksperimentalnih mjerenja i tumačenja rezultata, ali pre svega na bezgraničnom strpljenju i istrajnosti u kritičnim trenucima čime je njihov udeo u ovom radu neprocenjiv. Hvala kolegici Dragici Čebzan i svim ostalim koleginicama, kolegama i dragim prijateljima na podršci i pomoci.

Najtoplije se zahvaljujem i mojoj porodici, Mileni, Lani i Lazaru na pokazanom strpljenju i podršci koju su mi pružali tokom izrade ove teze.

I na kraju koristim priliku da se zahvalim mojoj majci, ocu i bratu na bezuslovnoj ljubavi, poverenju i podršci koje mi pružaju svih ovih godina.

A.P.

TEČNO-HROMATOGRAFSKA I SPEKTROMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA I ODREĐIVANJE ESOMEPRAZOLA, NJегоVIH NEČISTOĆA I DEGRADACIONIH PROIZVODA

Rezime:

Esomeprazol je visoko-efikasni antiulkusni lek novije generacije koji se primenjuje u lečenje poremećaja povezanih sa povećanim lučenjem želudačne kiseline. (S) - enantiomer omeprazola, koji je kao takav nazvan „esomeprazol“, je hemijski 6(5)-Metoksi-2-[(S)-[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol.

Kako je definisano u ICH vodičima, nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci je bilo koja hemijska vrsta koja je različita od definisane aktivne farmaceutske supstance i utiče na njen aktivitet i čistoću. Od najvećeg značaja su one hemijske vrste koje su hemijski srodne farmaceutskoj supstanci a mogu da nastanu u toku njenog procesa proizvodnje (polazni materijali, intermedijeri ili sporedni proizvodi, tzv. procesne nečistoće) ili njenog skladištenja i čuvanja (tzv. degradacioni proizvodi). Nezavisno od porekla nečistoća, potencijalnog ili realnog prisustva u farmaceutskoj supstanci, ICH vodiči upućuju na neophodnost njihove identifikacije, kvantifikacije i kvalifikacije. Kvalifikacija je proces prikupljanja i procene podataka kojima se uspostavlja biološka bezbednost unosa pojedinačne nečistoće ili određenog profila nečistoća prisutnih u nivou specifikacije leka. Ovom procesu prethode procesi identifikacije i kvantifikacije svih prisutnih nečistoća u količini većoj od 0,1 % u odnosu na aktivnu farmaceutsku supstancu.

Uspešnim razvojem i međusobnim kombinovanjem više različitih hromatografskih i spektrometrijskih metoda, i teorije, proučeni su putevi degradacije esomeprazola natrijuma u čvrstom stanju, i rastvorima različitih pH vrednosti. Svako od potencijalno prisutnih procesnih nečistoća i značajnih

degradacionih proizvoda koji se javljaju pod ovim uslovima je objašnjeno poreklo. Sve značajne nečistoće esomeprazola su hromatografski (HPLC, hiralno selektivna HPLC), spektrometrijski (^1H NMR, ^{13}C NMR, UV-Vis spektrofotometrija, MS i MS/MS spektrometrija) i strukturno okarakterisane i objašnjen je put njegovog nastanka. Neki od glavnih degradacionih proizvoda esomeprazola su po prvi put literaturno pomenuti. Dosta ranije publikovanih studija bavi se proizvodima transformacije omeprazola u kiseloj i neutralnoj sredini i uglavnom se razlikuju od onih koje se proučavaju u ovoj disertaciji. Prisutne procesne nečistoće i njihovo poreklo, oksidativni proizvodi, razgradni proizvodi supstance u čvrstom stanju i njihove dalje hemijske transformacije u baznim vodenim rastvorima jesu predmet ovog rada.

Ključne reči: Esomeprazol, (S)-omeprazol, nečistoće, razgradni proizvodi, HPLC, NMR, MS/MS, forsirana degradacija, identifikacija

LIQUID CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROMETRIC CHARACTERISATION AND DETERMINATION OF ESOMEPRAZOLE, ITS IMPURITIES AND DEGRADATION PRODUCTS

Abstract:

Esomeprazole is a highly - effective newer generation antiulcer drug that has been applied in the treatment of disorders associated with increased secretion of gastric acid. (S) - enantiomer of omeprazole , which as such is called "esomeprazole" , is chemically 6(5)-methoxy-2-[(S)-(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridinyl)methyl]sulfinyl]-1H-benzimidazole .

As defined by the ICH Guidelines, impurities in an active pharmaceutical substance are any chemical species that is different from the defined active pharmaceutical ingredients and influence its activity and purity. Of the greatest importance are those chemical species that are chemically related to pharmaceutical substance itself, that may arise during its production process (starting materials, intermediates or by-products - so-called process impurities) or its storage (degradation products). Irrespective of the origin of impurities, potential or real presence in the pharmaceutical substances , ICH guidelines point to the necessity of their identification, quantification and qualification. Qualification is the process of acquiring and evaluating data that establishes the biological safety of an individual impurity or a given impurity profile at the level(s) specified. This process is preceded by a process of identification and quantification of impurities present in an amount greater than 0.1 % relative to the active pharmaceutical substance.

The successful development and mutual combination of different chromatographic and spectroscopic methods, and theory, provided the opportunity to studied the pathways of degradation of esomeprazole sodium in the solid state and its solutions at different pH values. The origin of the potentially presented significant process-related impurities and degradation

products that occur under these conditions is fully explained. All significant impurities esomeprazole are chromatographic (HPLC, chiral selective HPLC), spectrometric (^1H NMR, ^{13}C NMR , UV - Vis spectrophotometry , MS and MS / MS spectrometry) and structurally characterized and explained the way of its arising. Some of the major degradation product of esomeprazole were first mentioned in the literature. Many published papers deals with the transformation of omeprazole products in acidic and neutral media, and they are generally, different from those studied in this thesis. Process-related impurities and their origin , oxidative products, degradation products of substance in the solid state and their further chemical transformations in basic aqueous solutions are the subject of this paper.

Keywords: Esomeprazole, (S)-omeprazole, impurities, degradation products, HPLC, NMR, MS/MS, forced degradation, identification

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Esomeprazol.....	1
1.2 Farmakološko ponašanje i mehanizam dejstva esomeprazola	4
1.3 Pregled literature.....	9
1.3.1 Hemijsko ponašanje omeprazola	9
1.3.2 NMR	10
1.3.3 Elektrohemijske analize	10
1.3.4 Hromatografija na tankom sloju	12
1.3.5 Tečna hromatografija	12
1.3.6 Elektroforeza	17
1.3.7 Hiralno selektivna tečna hromatografija.....	18
1.3.8 UV-Vis spektrofotometrija	19
1.3.9 Sprega tečne hromatografije i masene spektrometrije, LC-MS, LC-MS/MS.....	20
1.4 Korišćene fizičko-hemijske metode	21
1.4.1 Tečna hromatografija (HPLC).....	21
1.4.2 Hiralno selektivna tečna hromatografija.....	23
1.4.3 Preparativna hromatografija [97-99].....	27
1.4.4 NMR spektroskopija	30
1.4.4.1 Homonuklearna korelaciona spektroskopija COSY.....	33
1.4.4.2 Heteronuklearna jedno-kvantna korelaciona spektroskopija HSQC	34
1.4.4.3 Heteronuklearna korelaciona spektroskopija preko više hemijskih veza, HMBC	35
1.4.5 Sprega tečne hromatografije i masene spektrometrije, LC-MS, LC-MS/MS.....	36

2.	CILJ RADA	39
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	42
3.1	RP-HPLC metoda za određivanje srodnih supstanci esomeprazola	42
3.1.1	Reagensi i hemikalije.....	42
3.1.2	Aparatura i hromatografski uslovi	42
3.1.3	Priprema rastvora.....	43
3.1.4	Procedura.....	44
3.1.5	Kvantifikacija.....	44
3.1.6	Priprema rastvora potrebnih za validaciju metode.....	45
3.1.7	Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije	50
3.2	Hiralno selektivna RP-HPLC	52
3.2.1	Reagensi i hemikalije.....	52
3.2.2	Aparatura.....	52
3.2.3	Priprema rastvora.....	52
3.2.4	Procedura.....	53
3.2.5	Kvantifikacija.....	54
3.2.6	Priprema rastvora potrebnih za validaciju metode.....	54
3.3	Korišćene semipreparativne HPLC metode.....	57
3.3.1	Reagensi i hemikalije.....	57
3.3.2	Aparatura i hromatografski uslovi	58
3.3.2.1	Semipreparativna HPLC metoda za RRT 0.42, RRT 0.46, RRT 0.81....	58
3.3.2.2	Semipreparativna HPLC metoda za nepoznatu nečistoću RRT 0.27 ..	58
3.4	Korišćene LC/MS i LC/MS/MS metode	59
3.4.1	Reagensi i hemikalije.....	59
3.4.2	Aparatura i hromatografski uslovi	59
3.4.2.1	LC-MS metoda za merenje tačnih molekulskih masa i LC-MS/MS metoda za ispitivanje puteva fragmentacije	59
3.4.2.2	LC-MS metoda za merenje tačne molekulske mase nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0.27.....	63
3.5	NMR spektroskopska merenja	64
3.6	UV-Vis spektrofotometrija.....	65

3.7	Statistička obrada rezultata	65
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1	Razvoj i validacija RP-HPLC metode za određivanje srodnih supstanci esomeprazola.....	66
4.1.1	Razvoj metode.....	66
4.1.2	Validacija metode	67
4.1.2.1	Linearnost	67
4.1.2.2	Limitsi detekcije i kvantifikacije.....	69
4.1.2.3	Preciznost metode	69
4.1.2.4	Tačnost metode	70
4.1.2.5	Stabilnost rastvora	70
4.1.3	Robusnost metode	73
4.2	Razvoj i validacija RP-HPLC hiralno selektivne metode.....	78
4.2.1	Razvoj metode.....	78
4.2.2	Validacija metode	79
4.2.2.1	Linearnost.....	79
4.2.2.2	Limitsi detekcije i kvantifikacije.....	80
4.2.2.3	Tačnost metode	81
4.2.2.4	Preciznost.....	81
4.2.2.5	Stabilnost rastvora.....	82
4.2.3	Robusnost metode	83
4.3	Degradacioni proizvodi esomeprazola pri različitim uslovima forsirane degradacije.....	87
4.4	Studije stabilnosti i glavni razgradni proizvodi	92
4.4.1	Glavni degradacioni proizvodi čvrstog esomeprazol natrijuma.....	92
4.4.2	Glavni degradacioni proizvodi esomeprazol natrijuma u vodenom rastvoru „viših“ koncentracija	96
4.4.3	Glavni degradacioni proizvodi esomeprazol natrijuma u vodenom rastvoru „nižih“ koncentracija	97
4.4.4	Recematizacija.....	100
4.5	Spektrometrijska karakterizacija nečistoća esomeprazola.....	101

4.5.1	UV-Vis spektri esomeprazola i njegovih nečistoća	101
4.5.2	NMR spektri esomeprazola i njegovih nečistoća.....	102
4.5.2.1	Zajedničke NMR spektralne karakteristike esomeprazola i njegovih nečistoća.....	102
4.5.2.2	Esomeprazol Nečistoća A.....	103
4.5.2.3	Esomeprazol nečistoća B	113
4.5.2.4	Esomeprazol nečistoća C.....	113
4.5.2.5	Esomeprazol nečistoća D.....	114
4.5.2.6	Esomeprazol nečistoća E	115
4.5.2.7	Esomeprazol nečistoća F.....	116
4.5.2.8	Esomeprazol nečistoća G.....	116
4.5.2.9	Esomeprazol nečistoća H.....	117
4.5.2.10	Esomeprazol nečistoća I.....	118
4.5.2.11	4-Hidroksi-omeprazol sulfid.....	119
4.5.3	MS/MS spektri i fragmentacioni putevi esomeprazola i njegovih nečistoća.....	120
4.6	Studije izolacije i objašnjenja strukture glavnih degradacionih proizvoda esomeprazola.....	131
4.6.1	Objašnjenje strukture nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 1.16131	
4.6.2	Objašnjenje strukture nepoznatih razgradnih proizvoda RRT 0.46, RRT 0.42, RRT 0.81.....	133
4.6.2.1	NMR spektri 4-hidroksid-omeprazol sulfida.....	140
4.6.2.2	NMR spektri 4- hidroksid -omeprazol sulfoksida.....	141
4.6.2.3	NMR spektri 4- hidroksid -omeprazol sulfona (RRT 0.42).....	143
4.6.3	Izolacija i objašnjenje strukture nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0.27	144
4.7	Putevi degradacije esomeprazola i njegovi glavni degradacioni proizvodi.....	155
5.	ZAKLJUČAK.....	162
6.	REFERENCE.....	164

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U OVOM RADU

2D NMR- *Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy* –

Dvodimenziona nuklearna magnetna rezonancija

AGP - α 1-acid glycoprotein - α 1-kiselina glikoprotein

APCI – *Atmospheric pressure chemical ionization* – Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom

API – *Active pharmaceutical ingredient* –Aktivna farmaceutska supstanca

BSA - *Bovine serum albumin* – Albumin iz goveđeg seruma

Bz – Benzimidazol

^{13}C NMR - ^{13}C *nuclear magnetic resonance* – Nuklearna magnetna rezonancija ugljenikovog izotopa ^{13}C

CE – *Capillary electrophoresis* – Kapilarna elektroforeza

CEC - *Capillary electrochromatography*- Kapilarna elektrohromatografija

CI – *Chemical ionization* – Hemijska jonizacija

CCK2 - Cholecystokinin B receptor –Receptor iz parijetalne ćelije koji reaguje na akciju gastrina

COSY - *Correlated spectroscopy* - Korelaciona spektroskopija

CPMAS/NMR - *Cross-polarization magic angle spinning NMR spectroscopy*

CSPs- *Chiral Stationary Phases* – Hiralne stacionarna faze

CYP2C19 - *Cytochrome P450 2C19* - Oksidaza uključena u metabolizam ksenobiotika

DAD - *Diode-array detector* - Detektor sa nizom fotodioda

DP - *Drug product* - Farmaceutski dozirani oblik

EI - *Electron ionization* - Elektronska jonizacija

ESI - *Electrospray ionization* - Elektrosprej jonizacija

FAB - *Fast atom bombardment* - Bombardovanje brzim atomima

FID - *Free induction decay* - Raspad slobodne indukcije

FT - *Fourier transform* - Furijeova transformacija

GC-MS - *Gas chromatography/Mass spectrometry* - Gasna hromatografija spregnuta

sa masenom spektrometrijom

GPSA - *Guinea pig serum albumin* - Albumin iz seruma zamorca

HAS - *Human serum albumin* - Albumin iz seruma čoveka

H⁺, K⁺-ATPaza - protonska pumpa parijetalnih ćelija

H/D - *Hydrogen-deuterium exchange* - Vodonično- deuterijumska izmena

HETCOR - *HETeronuclear CORrelation* - Heteronuklearna korelaciona spektroskopija

HMBC - *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* - Heteronuklearna korelaciona spektroskopija preko više hemijskih veza

HMQC - *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation* - Heteronuklearna višestruko-kvantna korelaciona spektroskopija

¹H NMR - *¹H nuclear magnetic resonance* - Nuklearna magnetna rezonancija vodonikovog izotopa ¹H

HPLC - *High pressure liquid chromatography* - Tečna hromatografija pod visokim pritiskom

HPTLC - *High performace thin layer chromatography* - Visoko-efikasna tankoslojna Hromatografija

HR/MS - *High Resolution Mass Spectrometry* - Masena spektrometrija visoke rezolucije

HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*- Heteronuklearna jedno-kvantna korealciona spektroskopija

ICH - *International Conference on Harmonization* - Menunarodna Konferencija o Harmonizaciji

LC-MS - *Liquid chromatography/Mass spectrometry* - Tečna hromatografija pod visokim pritiskom spregnuta sa masenom spektrometrijom

LOD - *Limit of detection* - Limit detekcije

LOQ - *Limit of quantification* - Limit kvantifikacije

M3 - Muscarinic acetylcholine receptor - Acetiholinski receptor u parijetalnoj ćeliji

mCPB - meta-hloroperoksibenzoevom kiselino

MRM - *Multiple Reaction Monitoring*- Praćenje višestrukih reakcija

MS - *Mass spectrometry* - Masena spektrometrija

MS/MS ili MSⁿ - *Tandem mass spectrometry* - Tandem masena spektrometrija

m/z - *Mass to charge ratio* - Odnos mase i naelektrisanja

Neč. A - *Nečistoća A* - 5-Metoksi-1H-benzimidazol-2-thiol

Neč. B - *Nečistoća B* - 2-[(RS)-[(3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-5-metoksi-1H-benzimidazol

Neč. C - *Nečistoća C* - 5-Metoksi-2-[[[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)-metil]sulfanil]-1H benzimidazol

Neč. D - *Nečistoća D* - 5-Metoksi-2-[[[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfonil]-1H-benzimidazol

Neč. E - *Nečistoća E* - 4-Metoksi-2-[[[(RS)-(5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il)sulfinil]metil]-3,5-dimetilpiridin 1-oksid

Neč. F - *Nečistoća F* - 8-Metoksi-1,3-dimetil-12-tioksopirido[1',2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-on

Neč. G - *Nečistoća G* - 9-Metoksi-1,3-dimetil-12-tioksopirido[1',2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-on

NMR - *Nuclear magnetic resonance* - Nuklearna magnetna rezonancija

NP-HPLC - *Normal phase high pressure liquid chromatography* - Normalno fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

ODS - *Octadecyl silica* - Silikagel sa vezanim oktadecil grupama

Ome. - Omeprazol

OVM - Ovomuroid - Glikoprotein iz belanceta

pKa - Negativni logaritam konstante disocijacije kiseline

PPIs - *Proton Pump Inhibitors* - inhibitori protonske pumpe

Ph. Eur. - *European Pharmacopoeia* - Evropska farmakopeja

PXRD - *Powder X-ray diffraction* - Difrakcija rentgenskog zračenja kristalnog praha

Pyr - *Pyridine* - Piridin

RH%- *Relative humidity* - Relativna vlažnost vazduha

RSA - *Rabbit Serum Albumin* - Albumin iz seruma zeca

RP-HPLC - *Reverse phase high pressure liquid chromatography* - Reverzno fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom

RRF - *Relative response factor*- Relativni factor odgovora

RRT - *Relative retention time* - Relativno retenciono vreme

RSD - *Relative standard deviation* - Relativna standardna devijacija

SD - *Standard deviation* - Standardna devijacija

SIM - *Selected ion monitoring* - Praćenje izabranog jona

SFC - *Supercritical Fluid Chromatography* - Superkrična hromatografija

TMS - *Tetramethylsilane* - Tetrametilsilan

ToF - *Time-of-flight* - Maseni detector na bazi vremena preleta

UPLC - *Ultra performance liquid chromatography* - Tečna hromatografija ultravisokih

performansi

USP - *United States Pharmacopeia* - Farmakopeja Sjedinjenih američkih država

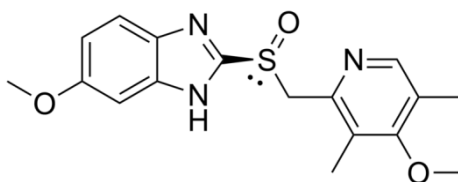
UV/VIS - *Ultraviolet/Visible* - Ultraljubičasta/Vidljiva

XRD - *X-ray diffraction* - Difrakcija rentgenskog zračenja

1. UVOD

1.1 Esomeprazol

Esomeprazol je hemijski 6(5)-Metoksi-2-[(S)-[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol:

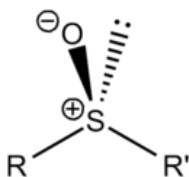


Funkcionalno, glavni deo molecule čini benzimidazol, koji je biciklični heterociklični sistem koji se sastoji od dva azotova atoma i spojenog fenilnog prstena. Generalno, benzimidazolska jedinjenja mogu da poseduju široki spektar biološke aktivnosti poput antisekretornog, antibakterijskog, antigljivičnog, antivirusnog, antiinflamatornog, antikonvulzivnog, antidepresivnog, antihipertenzivnog, anelgetičkog i hipoglikemičkog svojstva [1].

Ispitivana supstanca bila je u obliku natrijumske soli, molekulske formule $C_{17}H_{18}N_3NaO_3S$ i molekulske mase 367.4. Ovo je (S)-enantiomer omeprazola, najstarijeg od poznatih PPIs. Omeprazol je primer hiralne molekule gde atom odgovoran za hiralnost nije ugljenik već sumpor. Elektronski par koji se nalazi na atomu sumpora daje mu tetraedarsku geometriju, poput geometrije sp^3 hibridizovanog ugljenikovog atoma. Kod sulfoksida gde su organske funkcionalne grupe vezane za sumpor međusobno različite, sumpor postaje hiralni centar, kao što je prikazano na Slici 1.1

Omeprazol je supstituisano benzoimidazolsko jedinjenje koje pripada grupi lekova poznatih kao inhibitori protonske pumpe (PPIs). Ovo su hemijska jedinjenja čije se glavno dejstvo ispoljava u naglašenoj i dugotrajnoj redukciji

proizvodnje stomačne kiseline. Omeprazol je prolek što znači da je on sam po sebi farmakološki neaktivan. Međutim, strogo govoreći, on nije prolek u pravom smislu jer ne zahtevaju enzimsku aktivaciju, već se u organizmu hemijski transformiše.



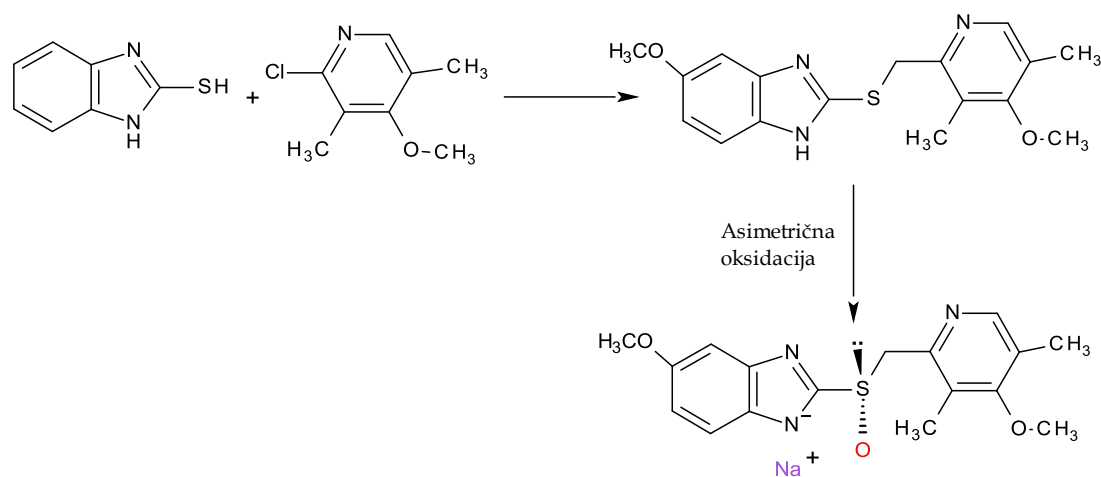
Slika 1.1 Tetraedarska simetrija sulfoksida

Aktivni oblik omeprazola je ahiralni ciklični sufenamid, čime bi se zaključilo da prisustvo hiralnog centra u omeprazolu nema uticaja na njegovu farmakolišku aktivnost. Međutim, utvrđeno je da enantiomeri omeprazola imaju izrazito različitu aktivnost. (S)-enantiomer omeprazola ima višu bioraspoloživost u ljudskom organizmu iz razloga što se (R)-oblik lakše metaboliše u jetri i na taj način uklanja [2,3]. Esomeprazol ispoljava optičku aktivnost okarakterisanu sa $[\alpha]_D^{20} = 42,3^\circ$ ($c = 0,5\%$ u vodi)[4].

Sam omeprazol je vrlo teško rastvoran u vodi, umereno rastvoran u etil i metil alkoholu i metilen hloridu. Omeprazol natrijum je beo ili skoro beo prašak i može biti u kristalnom ili amorfnom obliku[5]. Omeprazol natrijum je lako rastvoran u vodi i etil alkoholu, umereno rastvoran u propilen glikolu, vrlo teško rastvoran u metilen hloridu[6] [6]. Poboljšana rastvorljivost i stabilnost u odnosu na omeprazol bazu čini da se ova so koristi u raznim farmaceutskim doznim oblicima. Dva od tri prisutna azotova atoma su sposobna da prihvate proton, prvi na piridinskom azotu ($pK_{a1} = 4,61$) i drugi na benzimidazolskom azotu na kome je prisutna dvostruka veza ($pK_{a1} = 9,08$) [5].

Postoji veliki broj patentnih rešenja koji se tiče načina sinteze optički čistog esomeprazol natrijuma [7-9]. Generalno, mogu se izdvojiti tri glavna

koraka koji su sadržani u svim predloženim putevima sinteze, Slika 1.2. U prvom koraku omeprazol sulfid, (2-[[[4-(methoksi)-3,5-dimetil-2-piridinil]metil]thio]-1H-benzimidazol) nastaje kondenzacijom 5-methoxy-1H-benzimidazola i 2-hlorometil-4-(metoksi)-3,5-dimetil piridina. Potom, u drugom koraku imamo asimetričnu oksidaciju sulfida, koja se može da se izvede na više načina, i koja vodi sulfoksidu sa značajnim enantiomernim obogaćenjem[10-13]. Ovako dobijeni materijal se dalje može obogaćivati kroz više prekrizalizacionih koraka vodeći optički čistom sulfoksidu. Dalje, u trećem, poslednjem koraku sulfokid se prevodi u farmaceutski pogodniju natrijumovu so uz pomoć natrijum hidroksida u metanolnom rastvoru (drugi i treći korak su redoledno izmenjivi).



Slika 1.2 Osnovni koraci u sintezi esomeprazol natrijuma: kondenzacijom 5-methoxy-1H benzimidazola i 2-hlorometil-4-(metoksi)-3,5-dimetil piridina nastaje omeprazol sulfid koji se dalje asimetričnom oksidacijom prevodi u optički čisti sulfoksid. Nakon ovoga se prevodi u farmaceutski pogodniju natrijumovu so.

1.2 Farmakološko ponašanje i mehanizam dejstva esomeprazola

Parijetalne ćelije su visoko specijalizovane epitelne ćelije locirane u unutrašnjem sloju sluzokože želuca. Parijetalne ćelije poseduju obimni sekretorni membranski sistem i H^+ , K^+ -ATPaza je glavni proteinski sastojak ovih membrana. Upravo dejstvom ovog enzima H^+ , K^+ -ATPaze, poznatijeg kao protonske pumpe, se proizvodi kiselina kroz sekreciju vodonikovog jona koja se kroz izvodne sekretorne kanaliće parijetalnih ćelija vodi u lumen želuca. Najviša koncentracija vodonikovih jona koja se dostiže u sekretu parijetalnih ćelija iz želuca grubo iznosi oko 160 mM što je ekvivalent pH vrednosti od 0,8. Ona se dalje u lumenu želuca razblažuje i u njemu se dostižu pH vrednosti od 1-3. Pri maksimalnoj brzini H^+ sekrecije, H^+ jon se pumpa iz krvi nasuprot koncentracionom gradijent od 3 miliona prema 1 [14-15].

Postoje tri glavna načina podsticanja želučane sekrecije, putem stimulatornih medijatora histamina, gastrina i acetilholina, kroz njihove sinergističke uticaje na nivo aktivnosti H^+ , K^+ -ATPaze. Protonska pumpa je stimulirana na sekreciju kiseline cikličnim adenozin monofosfatom, proizvedenog kroz akciju histamina na H_2 receptor. Ca^{+2} takođe stimuliše sekreciju kiseline i njegova unutrašnje-celijska koncentracija raste kada acetilholin i gastrin deluju na odgovarajuće muskarinske M_3 i CCK_2 receptore parijetalne ćelije [16-20].

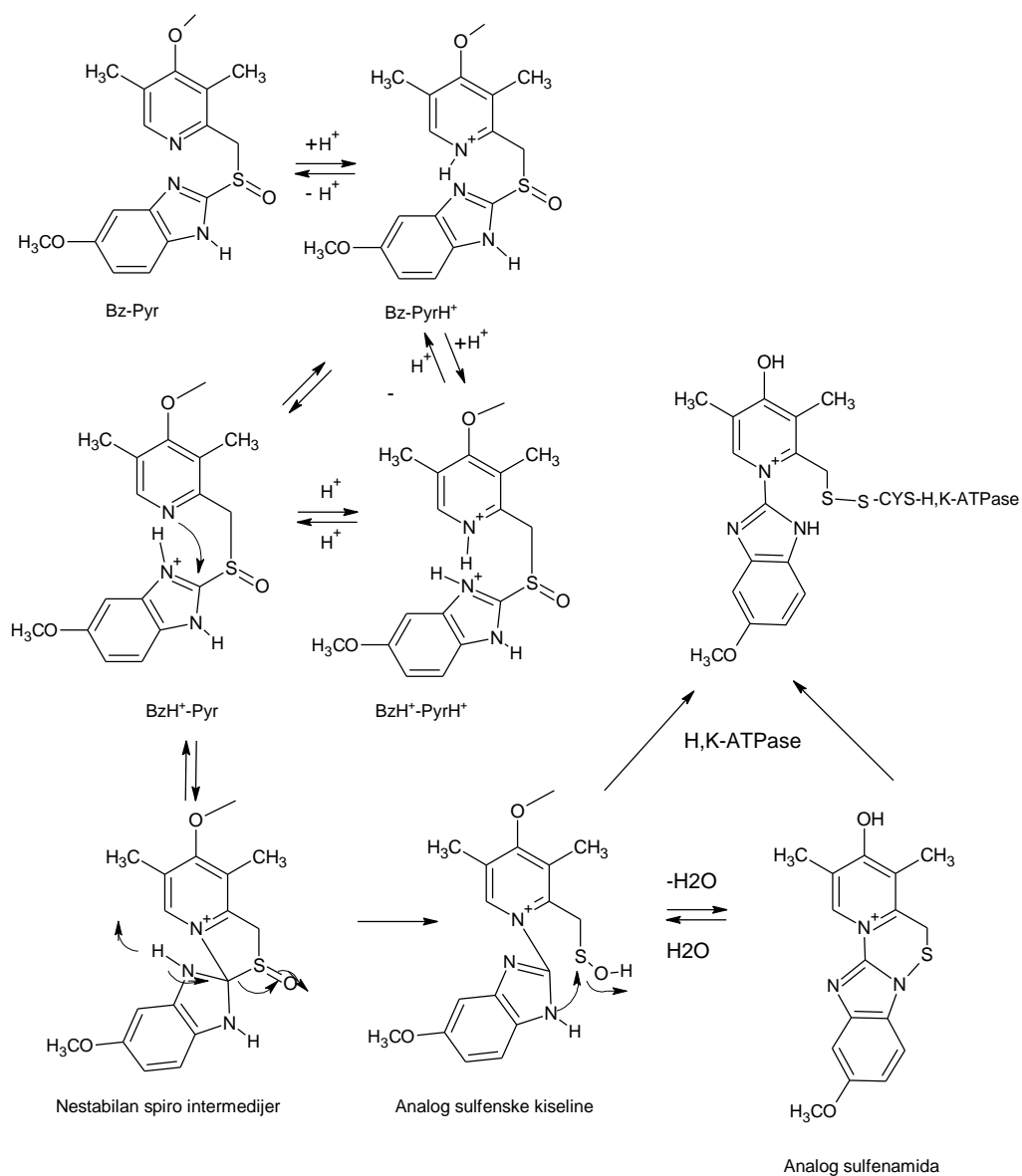
Protonska pumpa je poslednja u lancu regulacije lučenja želudačne kiseline, i direktno je odgovorana za lučenje H^+ jona u lumenu želuca, što je čini idealnom za ciljno mesto inhibicije lučenja kiseline. Za razliku od H_2 blokatora ili antagonista (ranitidin, famotidin, nazatidin, cimetidin...), tj. takvih aktivnih supstanci koje se konkurentno i reverzibilno vežu za H_2 receptore sa površine parijetalnih ćelija, PPIs formiraju kovalentnu disulfidnu vezu sa ATPazom, što dovodi do nepovratne inhibicije protonske pumpe.

Dejstvo na ovaj završni stupanj u regulaciji lučenja kiseline, kao i nepovratni karakter inhibicije, čini ovu klasu lekova daleko efikasnijom od H₂ blokatora smanjujući lučenje želudačne kiseline i do 99%. Termin "nepovratan" se odnosi na dejstvo jedne kopije enzima, dok je efekat na ukupan ljudski probavni sistem reverzibilan, kako se inhibirani enzimi, vremenom, zamenjuju novim primercima. Inhibitori protinske pumpe se primenjuju u neaktivnom obliku, nisu naelektrisani i lipofilni su, pa kao takvi lako prelaze kroz ćelijske membrane u intracelularne pregrade poput kanalikulusa parijetalnih ćelija. Tu u kiseloj sredini, neaktivni lek se protonuje i preuređuje u svoj aktivni oblik. Ovaj aktivni oblik se, potom, nepovratno kovalentno veže za cisteinski ostatak protinske pumpe kovalentnim disulfidnim mostom i nepovratno je dezaktivira. Jedan atom sumpora u disulfidnoj vezi dolazi sa cisteinskog ostatka ATPaze a drugi daje PPI. Kako je inaktivacija ATPaze nepovratna i potpuna, PPI su veoma potentni i dugo - delujući terapijski lekovi. Lučenja kiseline biva potpuno zaustavljeno sve do trenutka ponovne sinteze novog proteina.

Farmakofora, dakle, grupa atoma u molekulu koja je odgovorna za dejstvo leka, kod PPI-a je 2-piridilmetilsulfinilbenzimidazol. Trenutno, na tržištu je prisutno pet prizvoda iz ove klase lekova (omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol i rabeprazol) i svi sadrže ovaj osnovni strukturni okvir, a razlikuju se samo u prirodi supstituenata postavljenih na piridinskim i benzimidazolskim prstenima. Priroda ovih supstituenata, njihov negativni ili pozitivni induktivni efekat ima značajan uticaj na hemijsku reaktivnost molekula i u krajnjoj liniji na efikasnost antisekretorne akcije leka [21].

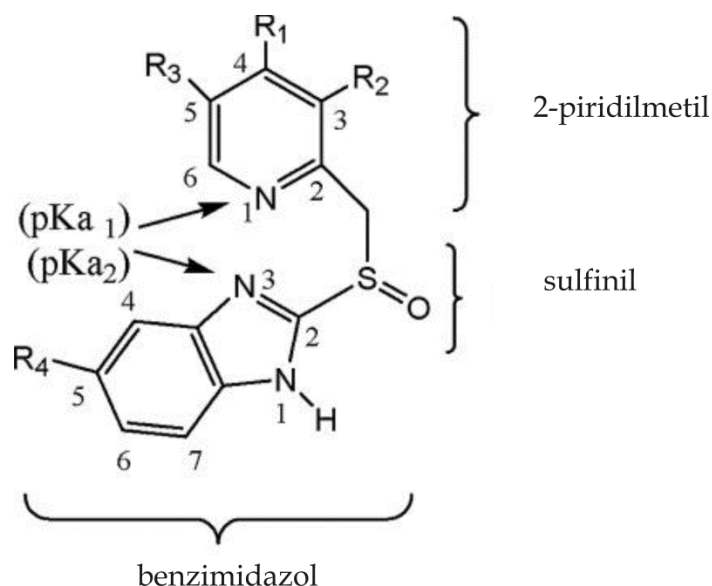
Prisutna sulfinilna grupa sama po sebi nije dovoljno reaktivna da formira disulfidnu vezu sa cisteinskim ostacima protinske pumpe. Ona, najpre, mora biti aktivirana kroz dve protonizacije molekula, i kasnije, spontanom preuređenjem da bi se formirali aktivni analozi sulfenamida ili sulfenske kiseline. Potreba za ovim aktiviranjem znači da su PPI neaktivni kada se administriraju. Međutim, oni nisu prolekovi u pravom smislu jer ne zahtevaju

enzimsku aktivaciju. Cela aktivaciona šema je data na Slika 1.3 i tu su prikazane kritične hemijske transformacije koje su odgovorne za dalje dejstvo leka.



Slika 1.3 Reakcioni i aktivacioni put inhibitora protonske pumpe.

Aktivacija PPI-a počinje sa dve reakcije protonizacije koje se lako dešavaju u veoma kiselj sredini parijetalne ćelije. Dva od tri prisutna azotova atoma su sposobna da prihvate proton, prvi na piridinskom azotu i drugi na benzimidazolskom azotu na kome je prisutna dvostruka veza (Slika 1.4).



Slika 1.4 Piridilmetilsulfinilbenzimidazolska farmakofora inhibitora protonske pumpe sa naznačenim mestima na kojima se dešava protonizacija (pK_{a1} i pK_{a2})

Tabela 1.1 pK_a vrednosti različitih PPIs

Inhibitor protonske pumpe	pK_{a1}	pK_{a2}
Omeprazol/esomeprazol	4.06	0.79
Lansoprazol	3.83	0.62
Pantoprazol	3.83	0.11
Rubeprazol	4.53	0.62

Za piridinski azotov atom pK_a vrednost (pK_{a1} , Tabela 1.1) leži u opsegu izneđu 3.83 (lansoprazol i pantoprazol) i 4.53 (rubeprazol). Omeprazol (i njegov čisti S-izomer esomeprazol), imaju pH_{a1} od 4.06. Ovakve pK_{a1} vrednosti znače da je piridinski azotov atom u svim PPI gotovo potpuno protonizovan pri

niskim pH vrednostima (pH 1.3) koje su prisutne u parijetalnim ćelijama (Bz-PyrH⁺+monokatjon). Strogo katjonska priroda ovog oblika obezbeđuje zadržavanje leka baš na željenom mestu njegovg dejstva. Drugi oblik, BzH⁺-Pyr, koji je u ravnotezi sa Bz-PyrH⁺ monokatjonom je odgovoran za stvaranje aktivirane forme izvođenjem intramolekularnog nukleofilnog napada na C2 poziciju benzimidazola. Iako je, u ravnoteži, prisutano vrlo malo BzH⁺-Pyr oblika, ovo je od ključnog značaja za sposobnost nepovratne inhibicije protonske pumpe, Slika 1.3. Elektron-donorske grupe (posebno na R1 poziciji), pozitivanim induktivnim efektom guraju elektrone na piridinski azot povećavajući procenat u kome postoji Bz-PyrH⁺ oblik. Međutim, što je još važnije, ovim elektronskim obogaćivanjem se povećava nukleofilni karakter piridinskog azota u BzH⁺-Pyr obliku. Ovo je razlog što elektron-donorske grupe povećavaju stepen u kome se formiraju aktivni oblici sulfenamid i sulfenske kiselina, koji nastaju preuređivanjem BzH⁺-Pyr oblika. Elektron-akceptorske grupe će imati obrnuti uticaj. Za benzimidazolski azotov N3 atom pKa vrednost (pKa2 Tabela 1.1) je dosta niža nego za piridinski azot i leži u opsegu između 0.11 (pantoprazol) do 0.79 (omeprazole i esomeprazol). Lansoprazol i rabeprazol imaju identičnu pKa2 vrednost od 0.62. Ovako niske pKa vrednosti znače da benzimidazolski prsten protonizuje tek nakon piridinskog prstena i kod njega je stepen protonizacije značajno niži. Protonizovani N3 azotov atom (ima ga u BzH⁺-PyrH⁺ i BzH⁺-Pyr, je od ključne važnosti za aktivaciju PPI jer povlači elektrone σ veze sa susednog C2 atoma čineći ga veoma siromašnim elektronima. Benzimidazolski C2 biva napadnut od strane neprotonizovanog piridinskog azota i što je on više elektrofilan (δ^+) to će napad biti brži. Kako se aktivni oblik PPI stvara ovim intramolekulskim nukleofilnim napadom, brzina kojom se ovo dešava određuje brzinu aktiviranja leka. [21-22].

1.3 Pregled literature

1.3.1 Hemijsko ponašanje omeprazola

U seriji od šest radova Brändström i sar. opsežno ispituju hemijske reakcije omeprazola i njegovih analoga u odsustvu i prisustvu 2-Merkaptoetanol [23-28]. Eksperimenti su osmišljeni i fokusirani na simulaciju in-vivo ponašanje omeprazola i objašnjenje mehanizma njegovog dejstva gde 2-merkaptoetanol predstavlja model enzima ATPaze (protonska pumpa). Razgradni proizvodi omeprazola koji se pominju u ovom opsežnom istraživanju su proizvodi transformacije omeprazola koji se javljaju u kiselj i neutralnoj sredini i uglavnom razlikuju od onih koje se proučavaju u ovoj disertaciji (prisutne procesne nečistoće i objašnjenje njihovog porekla iz procesa sinteze, oksidativni proizvodi, razgradni proizvodi supstance u čvrstom stanju i njihove dalje hemijske transformacije u baznim vodenim rastvorima). Noch i sar. (1996) [29] u cilju razjašnjenja mehanizma hemijske modifikacije omeprazola koja vodi inhibiciji aktivnosti H⁺, K⁺-ATPaze proučavaju reakciju omeprazole sa 2-merkaptoetanolom u kiselim uslovima (pH 3, 4, 5, 6) i izoluju reakcioni proizvod koristeći preparativnu HPLC da bi ga podvrgli strukturnoj analizi na osnovu UV, ¹H-NMR i maseno spektrometrijskih merenja. Brezeziska [30] je ispitala uticaj temperature i relativne vlažnosti vazduha na stabilnost omeprazola u čvrstom stanju. Promenu koncentracije sa vremenom je praćena HPLC metodom sa UV detekcijom. Izveštena je pojava više degradacionih proizvoda koji su okarakterisani samo retencionim vremenima u pomenutij metodi. Yang i sar. [31] su spektrofotometrijski određivali pKa vredosti omeprazola i njegovog N-metil derivata. U neutralnoj i baznoj oblasti za omeprazol su dobijene pKa vrednosti od 7.1 i 14.7. Ekpe i sar. (1999) [32] u opsežnoj studiji ispituju uticaj pH vrednosti i prisustva različitih soli u rastvorima omeprazola, lansoprazola i pantoprazola. Primetna je razlika u stabilnosti ispitivanih komponenti kao i direktna veza stepena degradacije sa koncentracijom H⁺ jona i vrste soli. Dong i sar. (2013) [33] ispituju

degradaciono ponašanje esomeprazola određujući degradacione proizvode nastale pod uticajem kiselih, baznih oksidativnih fotolitičkih i termalnih stres uslova. Izrazita degradacija se javlja pod uticajem kiselih i oksidativnih stres uslova. Bazirajući se na merenim m/z vrednostima i fragmentacionim putevima degradanata prtpostavljen je degradacioni put esomeprazola.

1.3.2 NMR

Claramunt i sar. (2004) [34] u ^1H i ^{13}C NMR studiji proučavaju ispoljavanje tautomerizma kod omeprazola u rastvorima. Određuju ravnotežni odnos 5-metoksi i 6-metoksi tautomera u THF od $K_T = 0.59$ na 195K, u korist 6-metoksi tautomera. Asignacija NMR signala samog omeprazola je vršena poređenjem sa dva N-metil derivata omeprazola u acetonu- d_6 i kroz teorijske proračune. Takođe, snimajući ^{13}C i ^{15}N CPMAS/NMR spektre (2006) [35] pokazuju i da je u čvrstom stanju prisutan isključivo 6-metoksi tautomer omeprazola. Bhatta i Desiraju, (2007) [36] se, takođe, bave problematikom tautomerizma omeprazola u čvrstom stanju ali koristeći metode PXRD i XRD na monokristalu. Jip i sar. [37] detaljno proučavaju ^{13}C NMR ponašanje nekoliko azotnih heterocikličnih jedinjenja, uključujući Aztreonam, Omeprazol i Schiff bazu.

1.3.3 Elektrohemijske analize

Qaisi i sar. [38] proučavaju kiselu razgradnju omeprazola u odsustvu tiola pomoću diferentne pulsne polarografije na statičnoj živinoj kapljičnoj elektrodi. Korišćenjem ove tehnike praćena je reakcija u rastvorima puferovanim na pH vrednosti od 2 do 8. Diferentno pulsni polarografski signali omeprazola i njegovih degradacionih proizvoda, za koje se veruje da su usled reakcije na sumporu (glavno mesto elektrodne reakcije) pružaju prednost u odnosu na ranije korišćenu UV spektrofotometrijsku metodu. Nakon

identifikacije pikova, rezultujući struja (nA)-vreme (s) profili pokazuju da omeprazol podleže degradaciji i daje dva glavna degradaciona proizvoda. Prvi je ciklični sulfenamid za koji se od ranije pokazalo da je aktivni inhibitor H⁺, K⁺-ATPaze dok je drugi dimer omeprazola. Step en degradacije je jako zavis an od pH vrednosti rastvora. Za razliku od predhodnih studija koje izveštavaju o vremenu života sulfenamida od par sekundi, ovde se pokazuje njegova stabilnost od 5-20 minuta. McClean i sar. [39] koriste fluorometriju i UV spektrofotometriju, tečnu hromatografiju, i diferencijalno pulsnu polarografiju u studiji degradacije omeprazola u 10mM hlorovodoničnoj kiselini, i daljim reakcijama degradacionih proizvoda sa 2-merkaptetanolom. Omeprazol i njegovi degradacioni proizvodi mogu takođe biti određeni u farmaceutskim formulacijama ili biološkim fluidima korišćenjem diferencijalne pulsne polarografije u Britton–Robinson puferском rastvoru od pH 9. Ames and Kovacic [40] proučavali su elektrohemijsko ponašanje omeprazola, njegovih aktivnih metabolita i metabolita vezanih za model enzima proučavajući mehanizam dejstva ovog leka. Aktivni metaboliti ciklični sulfenamid i radikalske sumporne vrste pokazuju redukcion i potencijale od -0.3 i -0.2 V. Redukcion i potencijal metabolita vezog za model enzima bio je -0.7 V, dok je za omeprazol bio >-1.4 V. Dobijeni rezultati daju kredibilitet hipotezi da prenos elektrona obuhvata deo načina delovanja ovog leka. Knoth i sar. [41] proučavali su elektrohemijsko ponašanje omeprazola elektrohemijskim metodama direktne struje i diferencijalno pulsne hromatografije. Omeprazol je određivan u Britton–Robinson puferima pH 7–9 u koncentracijama do 10⁻⁵ M. Objašnjen je mehanizam redukcionog procesa na živinoj kapljičnoj elektrodi. Uz potrošnju dva elektrona i dva protona, omeprazol se redukuje do 5-metoksi-2-[(3,5-dimetil-4-metoxipiridin-2-il)metilthio]-1H-benzimidazola koji se dalje cepa trošeći dodatnih dva elektrona i dva protona na 4-metoksi-2,3,5-trimethyl piridin i 2-merkapt-5-methoksi benzimidazol.

1.3.4 Hromatografija na tankom sloju

Agbaba i sar. [42] razvili su HPTLC metodu za određivanje omeprazola, pantoprazola, i njihovih nečistoća omeprazol sulfona i N-metilpantoprazola u aktivnim farmaceutskim supstancama. Mobilna faza hloroform–2-propanol:25% amonijak–acetonitril (10.8:1.2:0.3:4), omogućuje zadovoljavajuće razdvajanje za potencijalne nečistoće, prisutne u velikom višku pomenutih aktivnih supstanci. Koficijent korelacije ($r > 0.998$), rikaveri (90.7–120.0%), i detekcioni limit (0.025–0.05%) su potvrđeni. Metoda se pokazala pogodnom za kvantitativne analize i kontrolu čistoće ovih supstanci.

1.3.5 Tečna hromatografija

Sluggett i sar.(2001) [43] izveštavaju osetljivu HPLC metodu za određivanje omeprazola i tri slična benzimidazola uz kulometrijsku detekciju. Korišćen je elektrohemijski detektor i kulometrijska detekcija je izvedena na +800 mV koristeći elektrodu od poroznog grafita. Kulometrijska detekcija se pokazala potencijalno selektivnija i osetljivija od UV detekcije i primenjiva je u određivanju niskih koncentracionih nivoa omeprazola i njemu odgovarajućih nečistoća, degradanata i metabolita. Iuga i sar. [44] razvili su i validirali gradijentnu reverzno faznu HPLC metodu za određivanje omeprazola i njegovih procesnih nečistoća (označene kao nečistoće A, B, C, D, G, H). Hromatografsko razdvajanje postignuto je korišćenjem Zorbax Extend C18 kolone (150mm×4.6 mm, 5µm). Mobilna faza A bila je smeša 1% trietilamina u vodi čija pH vrednost je podešena na pH 9.5: acetonitril 90:10, dok je kao mobilna faza B korišćen čisti acetonitril. Gradijentni program bio je: 0min(18%B), 7.2min(18%B), 10.5min(50%B), 12min(50%B), 16min(18%B) and 18min(18%B) pri protoku od 0.8 mL/min. Detekcija je bila spektrofotometrijska na 280 nm. Nije postignuto međusobno razdvajanje nečistoće D i G i ova druga je izbačena iz dalje evaluacije kao razgradni proizvod koji se javlja sa manjom

verovatnoćom. Metoda je dalje validirana za sve pomenute nečistoće izuzev nečistoće G. Metoda se pokazala jednostavnom, brzom, selektivnom i dovoljno tačnom za praćenje stabilnosti omeprazola u farmaceutskim doznim oblicima i samoj aktivnoj supstanci. Nandipati i sar. (2012) [45] razvijaju brzu UPLC metodu za određivanje omeprazola. Hromatografsko odvajanje je postignuto na Zorbax Extend C18, 4.6 x 50mm 1.8 μ m koloni korišćenjem izokratskog eluranja mobilnom fazom u čiji je sastav ulazi 0.02M kalijum dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), 0.003M dikalijum hidrogen fosfat u 60:40 v/v odnosu sa acetonitrilom, pH 7.4 podešen kalijum hidroksidnim rastvorom. Protok je bio podešen na 1.0ml min⁻¹, a detekcija na 302 nm. Dong i sar. (2012) [46] ispitivali su degradaciono ponašanje esomeprazola pod uticajem kiselih, baznih, oksidativnih, fotolitičkih i termalnim stres uslova. U korišćenim HPLC metodama uočili su značajni uticaj hemijskih vrsti korišćenih u pripremi pufera za mobilnu fazu. U odnosu na istovetno gradijentno odvajanje korišćenjem iste pH vrednosti amonijum acetatni pufer/acetonitril mobilna faza pokazala se efikasnijom u odnosu na fosfatni pufer/acetonitril mobilne faze. Nalwade i sar. (2012) [47] izveštavaju o novoj gradijentnoj reverzno-faznoj UPLC metodi za određivanje esomeprazol magnezijuma i sedam njegovih nečistoća. Odvajanje je postignuto na Acquity BEH C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m koloni korišćenjem mobilne faze A (0.04 M glicine pH 9.0 pufer) i mobilne faze B (smeša acetonitrile i vode u odnosu water 90: 10 (v/v)); pri protoku od 0.21 mL min⁻¹ i detekciji na 305nm. Esomeprazol magnezijum je degradiran korišćenjem kiselih, baznih, oksidativnih, fotolitičkih i termalnim stres uslova. Degradacioni proizvodi su bili dobro odvojeni od glavnog pika i njegovih nečistoća dokazujući izuzetnu selektivnost metode. Borges i sar. (2010) [48] razvijaju ultra-brzu HPLC metodu za analizu omeprazola, njegovih metabolita 5-hidroksiomeprazola i omeprazol sulfona. Odvajanje postignuto na monolitnoj Chromolith Fast Gradient RP 18 koloni, 50 mm x 2.0 mm, korišćenjem mobilne faze A: 0.15% (v/v) trifluorosirćetna kiselina u vodi i mobilne faze B: 0.15% (v/v) trifluorosirćetna kiselina acetonitrile uz linearni gradijent od 5 do 90% B u

1 minuti pri protoku od 1.0 mLmin⁻¹ i detekciji na 220 nm. Ribani i sar. [49] bave se problematikom različitih literaturno sugerisanih metodologija za određivanja detekcionih i kvantifikacionih limita analita u hromatografskim metodama. Osnovni cilj ovoga rada bio je da se primene ove različite metodologije u kvantitativnom određivanju omeprazola i njegovih nečistoća (sulfon omeprazola i 5-hidroksi omeprazol). Na ovom primeru pokazali su da je procena LD and LQ bazirana na parametrima izvedenim iz linearne regresije kalibracionih kriva analita mnogo pouzdanija nego standardna metoda odnosa signala i šuma. Razvili su i validirali hromatografsku metodu za određivanje nečistoća omeprazola uz razdvajanje postignuto na Novapak C-18 (150mm×3.9 mm I D) koloni uz mobilnu fazu voda: acetonitril (75:25 v/v) pH 7.0 (podešen fosfornom kiselinom i amonijum hidroksidom) pri protoku od 1.0 ml/min i temperaturi od 30°C. El-Sherif i saradnici (2006) [50] predložili su jednostavnu, selektivnu i osetljivu reverzno-faznu izokrtasku HPLC metodu za kvantitativno određivanje omeprazola, lansoprazola i pantoprazola u prisustvu njihovih degradacionih proizvoda koji se javljaju u kiselim uslovima. Komponente su praćene na 280 nm uz razdvajanje na Waters Nova-Pak C18 koloni uz mobilnu fazu koja je bila 0.05 M kalijum dihidrogen fosfat:metanol:acetonitril (5:3:2 v/v/v). Postignuto je razdvajanje ove tri glavne komponente od sedam glavnih degradacionih proizvoda. Oblas linearnosti za omeprazol bio je 2–36 mg/ml. Rikaveri za omeprazol bio je 100.5 ±0.8% uz limit detekcije od 0.54 mg/ml. Za određivanje omeprazola u prašku za injekcije i peletama Schubert i sar. [51] su razvili i validirali reverzno-faznu HPLC metodu. Korišćena je C18 250 × 4.6 mm id, 5 µm kolona uz metanol:voda (90: 10, v/v) mobilnu fazu pri protoku od 1.5 mL/min uz detekciju na 301 nm. Validacijom je ustanovljena zadovoljavajuća linearnost, preciznost, tačnost i rigidnost metode. Odgovor je bio linearan u opsegu od 32-48 µg/mL. Ekpe i Jacobsen [52] razvili su HPLC metodu za istovremenu kvantifikaciju tri komponente (omeprazol, lansoprazol and pantoprazol) i odredili uticaj različitih soli i pH vrednosti na stabilnost oava tri PPIs. Komponente su praćene na 280nm korišćenjem Zorbax Eclipse

XDBC8 (5 μ m, 150 cm \times 4.6mm i d) i mobilne faze koja se sastojala od 70:30 fosfatnog pufera:acetonitril sa pH vrednošću podešenom na 7.0 fosforom kiselinom. Persson i sar. [53] određuje omeprazol i tri njegova metabolita, sulfon (H 168/66), sulfid (H 168/22) i hidroksi metabolit (H 195/80), u plazmi i urinu tečnom hromatografijom. Komponente su ekstrahovane iz bioloških uzoraka i ekstrakti su analizirani tečnom hromatografijom, direktno ili nakon otparavanja organskog rastvarača i rastvaranja u polarnoj mobilnoj fazi. Eluent iz kolone je praćen UV spektrofotometrijski na 302 nm. Amantea i Narang [54] su koristili reverzno faznu HPLC metodu za kvantifikaciju omeprazola i njegovih metabolita iz krvne plazme. U uzorke krvne plazme je dodavan interni standard (5-methyl analog omeprazola), dihlormetan, heksan, i 0.1M karbonatni pufer (pH 9.8). Nakon centrifugiranja, organski sloj je otparavan do suva i suvi ostatak rastvaran u mobilnoj fazi [metanol-acetonitril-0.025 M fosfatni pufer pH 7.4 (10:2:13)] i injektovan u HPLC sistem sa Beckman Ultrasphere C8, 5 μ m kolonom (150 x 4.6 mm id) . Protok mobilne faze bio je 1.1 ml/min sa detekcijom na 302 nm. Kalibraciona kriva je linearna do 200 ng/ml, a limit detekcije bio je 5, 10, and 7.5 ng/ml za omeprazol, omeprazol sulfon, i omeprazol sulfid. Motevalian i sar. [55] razvili su HPLC metodu za određivanje omeprazola i njegovih glavnih metabolita u krvnoj plazmi uz njihovo koncentrovanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Eluent injektovan u HPLC sistem sa μ Bondapak C18 reverno faznoj koloni (4.6 mm -250 mm, 10 μ m). Mobilna faza se sastojala od 0.05 M fosfatnog pufera (pH 7.5) i acetonitrila (75:25) pri protoku od 0.8 ml/min. UV detekcija na 302 nm. Srednji rikaveri je bio veći od 96% uz linearni opseg od 50 do 2000 ng/ml. Detekcioni limiti su bili 10, 10, i 15 ng/ml za omeprazol, omeprazol sulfon, i hidroksiomeprazol. Garcia-Encina i sar. [56] koristili su automatizovani sistem za ekstrakciju na čvrstoj fazi i HPLC sa UV detekcijom za određivanje omeprazola u krvnoj plazmi. Ekstrakcija je vršena na C18 SPE kolonama, i nakon pročišćavanja omeprazol je eluiran mobilnom fazom na Inertsil ODS-2 kolonu. Ustanovljena je linearnost u opsegu od 5 and 500 ng/ml uz rikaveri veći od 88% uz limit detekcije od 5 ng/ml.

Metoda je korišćena za određivanje omeprazola u krvnoj plazmi u sklopu studije bioekvivalentnosti. Zarghi i sar. [57] razvili su HPLC metodu za kvantifikaciju omeprazola iz krvne plazme u kojoj se koristi monolitna Chromolith Performance (RP-18e, 100 x 4.6 mm) u izokratskom modu sa 0.01 mol/l dinatrijum hidrogen fosfatom : acetonitril (73:27) i pH vrednošću podešenom na 7.1. Detekcija je bila UV na 302 nm. Kalibraciona kriva bila je linearna u opsegu od 20–1500 ng/ml. Murakami i sar. [58] razvili su i validirali osetljivu HPLC metodu za kvantifikaciju omeprazola u tabletama sa kontrolisanim otpuštanjem. Analize su izvedene na RP-C18 koloni sa UV detekcijom na 280 nm. Mobilna faza je bila fosfatni pufer pH 7.4: acetonitril (70:30) pri protoku od .5 ml/min. Ispitivani parametri u validacionom procesu bili su linearnost, kvantifikacioni limit, tačnost, specifičnost i preciznost. Ekscipijensi iz formulacije ne interferiraju sa analitom i rikaveri je bio kvantitativan. Rezk i sar. [59] razvili su i validirali reverzno-faznu HPLC metodu za kvantitativno određivanje omeprazole i njegova tri metabolite iz krvne plazme. U metodi je postignuto razdvajanje četiri komponente, omeprazola, hidroksioimeprazola, omeprazol sulfona, omeprazol sulfida i internog standard u 17 minuta. Metod je validiran za opseg od 2–2000 ng/ml. Korišćena je Zorbax C18 (150 x 3 mm, 5 µm) sa Zorbax C18 (12.5 x 4.6 mm) pretkolonom. Mobilna faza A bila je 22mM fosfatni pufer, sa pH podešenim na 6.0 razblaženim natrijum hidroksidom : metanol (90:10). Mobilna faza B je bila smeša fosfatni pufer : acetonitril : metanol (10:80:10). Protok je bio 0.55 ml/min i detekcija na 302 nm. Shimizu i sar. [60] opisuju HPLC metodu sa kolonskim prebacivanjem za određivanje omeprazola, 5-hidroksioimeprazola, omeprazol sulfona. Omeprazol, njegova dva metabolita i lansoprazol, kao interni standard, su ekstrahovani iz krvne plazme, uz predhodno njeno podizanje pH vrednosti, korišćenjem smeše dietil etar: dihlorometan (45:55). Ekstrakt je injektovan na prvu kolonu (TSK-PW, 10 µm, 35x4.6 mm) za čišćenje uz mobilnu fazu fosfatni pufer:acetonitril (10:80) pH 7.0. Nakon prebacivanja na drugu kolonu (Inertsil ODS-80A, 5 µm, 150x4.6 mm) odvajanje je vršeno

mobilnom fazom fosfatni pufer:acetonitril:methanol (65:30:5) pH 6.5. Detekcija je bila na 302nm. Validirani opseg ove metode bio je 3–2000 ng/ml za omeprazol, 3–50 ng/ml za 5-hidroksioimeprazol, i 3–1000 ng/ml for omeprazol sulfon.

1.3.6 Elektroforeza

Berzas Nevado i sar. (2013) [61] razvijaju novu metodu, kapilarna elektroforeza (CE) sa MS detekcijom koju koriste u praćenju procesa degradacije omeprazola i pojave degradacionih proizvoda u vodenim rastvorima. Korišćenjem elektrosprej jonizacione masene spektrometrije u negativnom modu predložene su strukture nekih od degradacionih prizvoda koji se javljaju pri ispitivanim uslovima. Perez-Ruiz i sar. (2006) [62] opisuju osetljivu metodu koja uključuje automatizovanu SPE proceduru i kapilarnu elektroforezu sa UV detekcijom. Omeprazol, hidroksioimeprazol i omeprazol sulfon mogu biti odvojeni micelarnom elektrokinetičkom hromatografijom koristeći 20 mM boratni pufer i 30mM Natrijum dodecil sulfat, pH 9.5 kao elektrolit. Izolacija OMP i njegovih metabolita iz krvne plazme je automatizovana koristeći originalnu SPE proceduru sa SPE kertridžima sa površinski modifikovanim stendivinilbenzenskim polimerom. Bonato i sar. (2004) [63] razvili su dve metode, HPLC i kapilarnu elektroforezu za enantioselektivnu analizu omeprazola u farmaceutskim formulacijama. (R)- and (S)-omeprazol su egstrakovani iz komercijalno dostupnih tableta korišćenjem metanol: NaOH 2.5M (90:10). Hiralno HPLC odvajanje dobijeno je na Chiralpak AD koloni korišćenjem smeše heksan:etanol (40:60) kao mobilna faza i detekcijom na 302 nm. Procedura za kapilarnu elektrtoforezu je uključivala tri procentni sulfovani ciklodekstrin u 20 mmol/L fosfatnom puferu, pH 4.0 i detecijom na 202 nm.

1.3.7 Hiralno selektivna tečna hromatografija

Balmer i sar. [64] odvajaju dva enantiomera omeprazola na tri različite stacionarne faze sa imobiliziranim proteinom (Chiral- AGP sa α -1 glikoproteinom, Ultron ES-OVM sa ovomucoid proteinom, i BSA koji je bio prikāčen na 3-aminopropil siliku korišćenjem N-sukciniimidil karbonata. Mobilna faza (1 ml/min) bila je fosforni pufer pH 3.0 sa 10% 2-propanola. Takođe, enantiomeri su odvojeni na Chiralpak AD (hiralna faza bazirana na amilozi), sa mobilnom fazom etanol-heksane (1:4) pri 1 ml/min. Enmark i sar. (2012) [65] obimno proučavaju odvajanje enantiomera omeprazola na nekoliko različitih hiralnih stacionarnih faza. Takođe, na tri različite kolone pakovane sa silikom modifikovanom sa amiloza tris 3,5-dimethyl phenil carbamatom (5, 10 and 25 μ m) optimizovali su efikasnu hiralno selektivnu metodu za preparativne namene. Vyas i sar. (2011) [66] razvijaju normalno-faznu hromatografsku metodu za enantioselektivne analize omeprazola u gastro-rezistentnim farmaceutskim formulacijama. Odvajanje je postignuto na Chiralcel OD-H analitičkoj koloni (250mm \times 4.6 mm, 5 μ m) uz mobilnu fazu 85% of n-heksana, 8% metanola i 7% a smeše izopropil alkohola i etil alkohola (85:15, v/v). UV detection je bila na na 301nm. Zanitti i sar. (2010) [67] na hiralno selektivnoj Chiralpak IA koloni uz mobilnu fazu koja se sastojala od smeše methyl tert-butyleter-ethyl acetat-etanol-diethylamin 60:40:5:0.1 (v/v/v/v) kontrolišu enantiomersku čistoću esomeprazola u prisustvu hiralnih i ahiralnih nečistoća. Orlando i Bonato [68] razvili su HPLC metodu za odvajanje i kvantifikaciju omeprazola u krvnoj plazmi. Ekstrakcija analita iz krvne plazme vršena je na C18 SPE kolonama, a hiralno selektivno odvajanje postignuto na a Chiralpak AD koloni uz mobilnu fazu etanol-heksane (70:30) pri protoku od 0.5 ml/min. Detekcija je bila UV na 302nm. Metoda linearna u opsegu 10–1000 ng/ml za svaki od enatiomera, uz kvantifikacioni limit od 5 ng/ml. Preciznost i tačnost je pokazana i bila su sa RSD manjim od 10%. Cass i sar. (2003) [69] koristi direktno injektovanje krvne plazme u HPLC metodi sa hiral-hiral kolonskim

prebacivanjem u određivanju enantiomera omeprazola. BSA na oktil koloni je korišćen za prvu dimenziju razdvajanja analita od biološkog matriksa. Enantiomeri omeprazola su eluirani sa ove kolone na amiloznu tris (3, 4-dimetilfenilkarbamat) hiralnu kolonu koristeći ventil za prebacivanje i dalje odvajanje je postignuto mobilnom fazom acetonitril-voda (60:40 v/v) uz detekciju na 302 nm. Kanazawa i sar. [70] u studiji proučavanja enzima CYP2C19, određuju enantiomere omeprazola iz krvne plazme koristeći Chiralpak AD-RH kolonu i cirkularni dihroizam i UV detekciju nakon njihove ekstrakcije SPE procedurom. Lobenhoffer i sar. (2007) [71] razvili su LC-MS/MS metodu kojom mogu da se kvantifikuju omeprazol i njegova dva glavna metabolita (5-hidroksiomeprazol i omeprazol sulfon) enantioselektivno iz krvne plazme koristeći ekstrakciju na čvrstoj fazi i normalno-fazno HPLC odvajanje uz APPI tandem masenu spektrometriju. Enantioselektivno odvajanje postignuto je na Reprosil Chiral-CA 5 μ M 250 mm x 2 mm koloni. Raniji radovi [72-74] na enantioselektivnosti omeprazola i 5-hidroksiomeprazol sugerišu upotrebu kolona sa hiralnim stacionarnim fazama dizajniranim za karboksilne kiseline i rade u normalno-faznom modu.

1.3.8 UV-Vis spektrofotometrija

Rajic i sar. (2003) [75] koriste UV derivativnu spektrofotometriju u određivanju omeprazola, omeprazol sulfona, pantoprazola i N-metil pantoprazola u 4%(v/v) amonijaku u metanolu, gde je potrebna spektralna rezolucija analita postignuta koristeći 1D304,1D307, 1D291.5 and 1D296.5. Castro i sar. (1999) [76] razvili su spektrofotometrijsku metodu u kojoj se koristi prvi izvod spektara za određivanje omeprazola u vodenim rastvorima u toku studije stabilnosti. Derivativna procedura bazirala se na linearnoj vezi između koncentracije omeprazola i prve amplitude na 313 nm. Opisana metoda se pokazala 2.59 puta osetljivijom od HPLC metode sa kojom su je upoređivali i

dovoljno selektivnom u odnosu na proizvode razgradnje koji su se javljali. Riedel i Leopold (2005) [77] ispituju degradaciju omeprazola u rastvoru sa prisutnim organskim polimerima korišćenjem UV spektroskopije i upoređuju rezultate dobijene u prethodnoj studiji gde je korišćene HPLC metoda. UV-VIS spektri su snimani neposredno nakon pripreme rastvora i posle 180 minuta. Promena apsorbance je praćena kao razlika apsorbivnosti na 305 nm. Degradacija omeprazole usled kiselinskih grupa polimera se manifestovala pomeranjem apsorpcionog maksimuma ka nižim talasnim dužinama a time i smanjenjem apsorbivnosti na 305 nm.

1.3.9 Sprega tečne hromatografije i masene spektrometrije, LC-MS, LC-MS/MS

Hofmann i sar. (2006) [78] izveštavaju o razvoju osetljive HPLC-ESI-MS metode za određivanje omeprazola i njegovih glavnih metabolita 5-hidroksiomeprazola and omeprazol sulfona u krvnoj. Razdvajanje je postignuto na ProntoSil AQ, C18 koloni korišćenjem gradijenta sa 10 mM amonijum acetatom u vodi (pH 7.25) i acetonitrilom. Maseni spektrometar je bio u modu odabranog jona koristeći MH^+ jone, m/z 346 za omeprazol, m/z 362 za 5-hidroksiomeprazol i omeprazol-sulfone i m/z 300 za interni standard (2-((3,5-dimethylpiridine-2-il)methyl]thio}-1*H*-benzimidazol-5-il)metanol. Tolonen i sar. (2006) [79] Izveštavaju o jednostavnoj i efikasnoj metodi za određivanje izmenjivih protona iz metabolita lekova koristeći postkolonsku infuziju deutrijum dioksida u LC/MS eksperimentima sa elektrosprej jonozacijom i spektrometrom na bazi vremena preleta. Lociraju izmenjive protone u velikom broju analita: hidroksilni, amino, tiolski i karboksilni protoni mogu se lako razabrati poređenjem m/z vrednosti posle H/D-izmene koja se dešava između HPLC kolone i elektrosprej jonskog izvora. Metoda je primenjena u studiji metabolita omeprazola zajedno sa preciznim masenim podacima dobijenim

spektrometrijskim eksperimentima masenim detektorom na bazi vremena preleta. Woolf i Matuszewski (1998) [80] razvijaju metodu za istovremeno određivanje omeprazola and 5-hidroxiomeprazola iz krvne plazme. Nakon SPE prečišćavanja analiti su hromatografski analizirani na Zorbax XDB-C8 50 mm x 4.6 mm koloni uz mobilnu fazu koja je bila sačinjena od smeše acetonitril- voda (21:79, v/v) sa 10 mM amonijum hidroksidom. Tandemski instrument Sciex API III+ sa APCI jonski izvorom je korišćen u pozitivnom MRM modu korišćenjem sledeće prekursor-proizvod kombinacije m/z 362-->214, 346-->198 i 316-->147 da bi detektovali 5-hidroxiomeprazol, omeprazol i interni standard. Hultman i sar. [81] razvili su LC- MS/MS metodu za kvantitativno određivanje esomeprazole i njegoa dva glavna metabolite -hidroksiesomeprazola i omeprazol sulfona iz krvne plazme. Analiti i njihov interni standard su egstrakovani iz krvne plazme u smeši metil tert-butil etar:dihlormetan (3:2). Nakon uparavanja i rastvaranja, analiti su odvojeni na reverno-faznom tečnom hromatografijom i mereni masenom spektrometrijom u pozitivnom modu uz jonizaciju pri atmosferskom pritisku.

1.4 Korišćene fizičkohemijske metode

1.4.1 Tečna hromatografija (HPLC)

Tečna hromatografija je hromatografska metoda razdvajanja hemijskih supstanci na osnovu njihove distribucije između čvrste stacionarne i tečne mobilne faze. Utemeljivači moderne hromatografije, Martin i Synge [82] su bili svesni još 1941, u teoriji, da za stacionarnu fazu postoji zahtev za što manjim česticama, i time je neophodan visoki pritisak za upumpavanje mobilne faze kroz kolonu. To je upravo osnova, tečne hromatografije visokih performansi, koja spada u novije analitičke tehnike i nezamenjiva je separaciona metoda.

Korišćenje visokog pritiska povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje, što poboljšava rezoluciju hromatograma.

Kod HPLC na reverznim fazama (RP-HPLC) koriste se nepolarne stacionarne faze uz polarnu mobilnu fazu. Nepolarne stacionarne faze su najčešće od silikatnog materijala, čija je površina modifikovana vezivanjem različitih nepolarnih molekula. Kako je mobilna faza polarna, vreme zadržavanja je duže za nepolarnije supstance. Princip razdvajanja bazira se uglavnom, na hidrofobnim interakcijama, koje su rezultat sile između polarnog rastvarača i relativno nepolarne supstance koja se analizira i nepolarne stacionarne faze. Vreme zadržavanja se povećava dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu a smanjuje se dodatkom hidrofobnih rastvarača. Na brzinu eluiranja utiče i pH, zbog mogućnosti promene polarosti supstance. Zbog toga se često u mobilnu fazu dodaju puferi. Kolone za RP-HPLC ne bi trebalo koristiti sa jakim bazama, zbog mogućnosti razgradnje silikatnih čestica. Moguće je koristiti i gradijentno eluiranje, što podrazumeva promenu sastava mobilne faze u toku eluiranja. Unošenjem male zapremine uzorka u tok mobilne faze, na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenti smeše. Vreme zadržavanja zavisi od prirode supstance koja se analizira, stacionarne faze i sastava mobilne faze. Vreme za koje se supstanca eluira (dođe do kraja kolone) naziva se retenciono vreme i one je karakteristično za određenu supstancu.

RP-HPLC je moćna separaciona metoda kojom je moguće razdvojiti smešu velikog broja međusobno sličnih komponenti. Hromatogram direktno nosi kvalitativnu i kvantitativnu informaciju: svaka komponenta smeše ima sebi svojstveno retenciono vreme, pod datim uslovima hromatografisanja; površina i visina signala su proporcionalne količini odgovarajuće supstance. Ova metoda separacije je vrlo efikasna, tj., vodi odličnom razdvajanju velikog broja komponenti u vrlo kratkom vremenu.

1.4.2 Hiralno selektivna tečna hromatografija

U nekim molekulima, kada su za ugljenikov atom vezane četiri različita atoma ili grupa, ovakav raspored oko centralnog atoma čini celu molekulu asimetričnom. Ovakve molekule mogu postojati u dva oblika koji se međusobno razlikuju u njihovoj trodimenzionoj konfiguraciji i odnose se međusobno kao slika u ogledalu. Oni se nazivaju optičkim izomerima (jer imaju sposobnost rotacije polarizovane svetlosti) ili stereoizomerima ili enantiomerima ili enantiomorfima ili antipodima ili hiralnim molekulama. Jedinjenje sa 50:50 odnosom enantiomera naziva se racematskom smešom. U nehiralnom okruženju, enantiomeri imaju iste hemijske i fizičke osobine. Još tridesetih godina prošlog veka Easson i Stedman [83] postavljaju temelje razumevanju razlika u farmakološkoj aktivnosti hiralnih izomera koje su posledica njihove stereochemije. Autori opisuju razlike u bioafinitetu enantiomera ka receptoru kao posledicu postojanja tri neekvivalentna mesta vezivanja. Enatiomer koji interaguje sa sva tri mesta vezivanja se zove eutomer (aktivni enantiomer), dok drugi koji može interagovati sa manje od tri mesta u isto vreme, zove se distomer (neaktivni enantiomer). Metabolički ili regulacioni procesi vođeni biloškim sistemima su osetljivi na stereochemiju, i različiti odgovori mogu biti uočeni poredeći aktivnosti para enantiomera. Ove razlike mogu biti ispoljene u različitim distribucionim odnosima, metabolizmu i njihovoj eliminaciji, u antagonističkoj akciji jednog u odnosu na drugi, ili toksikološkim osobinama.

Hromatografsko odvajanje enantiomera se bazira na korišćenju hiralnog selktora bilo u mobilnoj fazi (hiralni aditiv dodat u mobilnu fazu) ili u stacionarnoj fazi (CSP). U slučaju hiralnih stacionarnih faza, hiralni selktor je hemijski vezan, presvučen ili apsorbovan na pogodan čvrsti nosač. Rešenje sa hiralnim selktorom u mobilnoj fazi je, generalno, skuplje, uzimajući u obzir

veliku količinu hiralnog selektora potrebnu za pripremu mobilne faze koji na kraju biva nepovratno odbačen.

Hromatografske metode koje se najčešće koriste u hiralno selektivnim analizama jesu gasna i tečna hromatografija. Najvažnije tečno-hromatografske metode kod kojih se postiže hiralna selektivnost jesu tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), sub i superkritična hromatografija (SFC), kapilarna elektrochromatografija (CEC) i hromatografija na tankom sloju (TLC). HPLC je hromatografski mod razdvajanja koji se najčešće koristi (90% aplikacija) u hiralno selektivnim analizama. Gotovo svi poznati hiralni selektori su na raspolaganju u obliku dostupnih HPLC kolona, od kojih su neke kolone predviđene za normalno faznu, neke za reverzno faznu a neke za oba moda tečne hromatografije. Mehanizam hiralnog razdvajanja je međusobno sličan kod svih hiralnih selektora. Bazira se na pružanju hiralne površine enantiomerima, koji sa selektorima formiraju privremene komplekse, koji imaju različite energije vezivanja. Ovi privremeni kompleksi su stabilisani intereakcijama različite prirode, poput vodoničnih veza, π - π , dipol-indukovani dipol, jonskim i steričkim intereakcijama. I slabije sile kao van der Waalove i transfer naelektrisanja mogu igrati ulogu u mehanizmu hiralnog prepoznavanja između hiralnog selektora i enantiomera. Hiralne stacionarne faze mogu se bazirati na hiralnim selektorima koji mogu biti polisaharidi, ciklodekstrini, proteini, makrociklični glikopeptidni antibiotici, ligandni izmenjivači, Pirkeleovi alkoholi ili ciklični etari.

U ovom radu od posebnog interesa su hiralni selektori bazirani na proteinima. Proteini su prirodni polimeri amino kiselina, koje su same hiralne molekule, sa izuzetkom glicina. Glikoproteini sadrže i vezane šećere. Proteinski polimeri javljaju se u uvijenom obliku usled različitih intramolekulskih vezivanja. Ova vrsta uvijene tro-dimenzionalne strukture proteina čini ih enantioselektivnim. Enantioselektivne intereakcije između malih molekula i proteina u biološkim sistemima su poznate i temeljno proučavane [84]. Imajući

na umu enantioselektivnu prirodu proteina, Stewart i Doherty [85] [85][12] punili su hromatografske kolone sa albuminom iz goveđeg seruma (BSA) na sucinilaminoehil agarozu i uspešno odvojili enantiomere DL-triptofana. Kasnije, BSA je vezivan na sefarozi i neki od recemata su odvajani korišćenjem tečne hromatografije pri niskim pritiscima. Ovako pravljene hromatografske kolone rezultovale su dobrom hiralnom rezolucijom, ali efikasnost kolona bila je loša, što je rezultovalo daljim razvojem hiralno selektivnih stacionarnih faza baziranim na proteinima [86-88]. Ovaj razvoj se sastojao u imobilizaciji proteina na čvrstim nosačima poput silika gela. Proteini su kovalentno vezivani za površinu sferičnih pakovanja od silika gela (široko korišćenog nosača u tečnoj hromatografiji) koristeći brojne sintetičke procedure za to. Ovakve kolone su uspešno korišćene za hiralno razdvajanje velikog broja recemata korišćenjem tečne hromatografije pri visokim pritiscima.

Danas se kao hiralni selektori u tečnoj hromatografiji uspešno se koriste albuminski proteini (BSA, HAS, RSA i GPSA), α 1-acid glikcoprotein (AGP), ovomucoid (OVM), ovotransferin, avidin, tripsin (CT), i pojedini enzimi poput himotripsina, riboflavina, lizozima, pepsina, amiloglucosidase, dakle, svi su proteini životinjskog porekla [89]. AGP ili orosomucoid je protein iz krvne plazme čoveka prisutan u koncentraciji od 55-140 mg/mL. On je glikoprotein sa 181 amino kiselina i ima molekulsku masu od 41 000. On je prirodno kisele reakcije, sa izoelektričnom tačkom na pH 2.7. Stabilan je protein sa dva disulfidna mosta. Takođe sadrži 40 ostataka sialične kiseline. Ovi ostaci vežu jedinjenja amonijačnog tipa pri neutralnim pH i ključni su za enantioselektivne procese. Generalno, hiralno prepoznavanje na proteinima je kompleksan proces. Najčešće interakcije uključane u hiralnom prepoznavanju na proteinima jesu nepolarne, dipolne ili kulonovske interakcije, vodonične veze, i sterički efekti [90-91]. Kramer i sar. [92] uočili su i prepoznali hidrofobne džepove kao vezivajuća mesta na AGP proteinu. Haupt i sar. [93] prezentirali su model zadržavanja felodipina na AGP i model assumed pretpostavlja

prisustvo dva različita stereoselektivna mesta za dva različita enatiomera. Postoje i jake indicije da ostaci silicijumske kiseline imaju udela u hiralnom razdvajanju [89, 94-96]. Uprkos svim ovim studijama, tačni mehanizam hiralnog razdvajanja na AGP proteinu nije poznat, pre svega usled nedovoljnog poznavanja tercijalne strukture proteina

Hiralno selektivno razdvajanje na kolonama koje sadrže AGP uspešno se primenjuje pre svega na baznim komponentama ali je moguće i za kisele i neutralne komponente. Najčešće se koriste mobilne faze koje su sačinjene od puferovanih vodenih sistema sa organskim modifikatorima u određenom, pogodnom odnosu. Jedna od glavnih prednosti hiralno selektivnih stacionarnih faza baziranih na proteinima jeste da se hiralna hromatografija izvodi u reverzno-faznom modu, tj da se koriste vodene mobilne faze i ovo pruža široke mogućnosti u optimizaciji razdvajanja. Najvažniji parametri putem kojih se postiže optimizacija jesu vrsta i udeo organskih modifikatora, pH mobilne faze, jonska jačina i temperatura. Najčešće korišćeni puferi su fosfatni i boratni. Koriste se u koncentracijama od 20–100mM u opsegu pH od 2.5–8.0. Kako su u pitanju silika kolone, korišćenje baznijih pufera nije preporučeno. Sa druge strane, niže pH vrednosti pufera dovode do ireverzibilnih promena u samom proteinu i samim tim se ne preporučuju. Najvažniji parametar kojim se utiče na moć razdvajanja ovog tipa kolone jeste pH vrednost mobilne faze, kojim se utiče na stepen jonizovanosti glikoproteina. Sem pH vrednosti na moć razdvajanja imaju uticaj priroda i udeo nejonizovanih organskih modifikatora i jonska jačina korišćenih pufera. Preporučuje se korišćenje organskih rastvarača poput metanola, etanola, 1-propanola, 2-propanola, acetonitrila i tetrahidrofurana. Pri korišćenju ovih organskih modifikatora mora se biti pažljiv (njihov udelo u mobilnoj fazi) jer postoji mogućnost denaturacije samog proteina. Uticaj pH na razdvajanje je mnogo izraženiji na naelektrisane analite. Kod baznih recemata, zadržavanje na koloni je kraće pri nižim pH usled smanjenja raspoloživog broja negativnih naelektrisanja na samom proteinu za

kulonovske intereakcije sa katjonskim analitima. Hiralno razdvajanje na proteinskim hiralno specifičnim stacionarnim fazama zavisi i od promene jonske jačine. Smanjenje jonske jačine rezultuje povećanjem kulonovskih intereakcija između analita i proteina i time povećava vreme zadržavanja enantiomera. Pri visokim jonskim jačinama, hidrofobne intereakcije se favorizuju i ovo rezultuje složenijom zavisnošću, vodeći retencionom minimumu pri određenoj koncentraciji pufera.

1.4.3 Preparativna hromatografija [97-99]

Analitička HPLC metoda služi za dobijanje informacija o kvalitativnom ili kvantitativnom sastavu ispitivanog uzorka. Ona daje informaciju o karakterističanom elucioniom profilu ili otisaku prsta uzorka, o prisustvu ili odsustvu određene komponente, i količini u kojoj je prisutna. Nasuprot tome, preparativna HPLC služi za izvajanje, obogaćivanje i prečišćavanje jedne ili više komponenti prisutnih u datom uzorku. Budući da je preparativna HPLC skupa tehnika, poredeći je sa klasičnim metodama prečišćavanja kao što su destilacija, kristalizacij ili ekstrakcija koristi se jedino u slučajevima kada klasične metode ne daju zadovoljavajuće rezultate.

Detektori u preparativnoj HPLC služe samo za praćenje procesa odvajanja i donošenja odluke kako frakciono hvatati komponente od interesa. Od vremenske pozicije u kojoj se frakciono kolektuje zavisi apsolutna koncentracija i čistoća kolektovane komponente u kolektovanoj frakciji. Faktor razblaženja koncentracije zavisi od zapremine kolone i stepena zadržavanja komponente na njoj i pozicije kolektovanja frakcije. Generalno je bolje kolektovati veći broj manjih frakcija kojima se osigurava veća čistoća i koncentracija kolektovane komponente.

Za namene identifikacije i elucidacije strukture potrebno je dobiti čistu komponentu u količinama od jednog do nekoliko miligrama. U analitičkoj hromatografiji količina uzorka koja se nanosi na hromatografsku kolonu se kreće oko 1 μ g. Odnos masa između komponente i stacionarne faze kolone je manji 1:100000. Injektovana zapremina uzorka je, takođe, značajno manja od zapremine kolone (< 1:100). U ovakvim uslovima lako je dobiti zadovoljavajuće odvajanje zahvaljujući oštrini i simetričnosti dobijenih pikova. Glavna razlika u preparativnoj HPLC je da se ovde stacionarna faza opterećuje značajno većim količinama uzorka. Kada se na kolonu injektuje količina uzorka koja je veća od neke granične koncentracije ulazi se u oblast nelinearnosti adsorpcione izoterme. To znači da pik postaje asimetričan, pokazujući izrazito tegljenje, dok se faktor kapaciteta (k') smanjuje. Faktor kapaciteta (k') je vreme zadržavanja komponente (t) izraženo relativno u odnosu na vreme zadržavanja komponente koja ne intereaguje sa stacionarnom fazom (t_0). U preparativnoj HPLC ove posledice ulaska u oblast nelinearnosti adsorpcione izoterme nazivaju se koncentraciono preopterećenje (concentration overloading). U nekim slučajevima, zavisno od prirode komponente, faktor kapaciteta može se povećavati sa povećanjem preopterećanja, i ovo daje piku fronting. Budući da adsorpciona izoterma zavisi od prirode date supstance opterećenje kolone mora biti određena za svaki preparativni HPLC eksperiment.

Za prečišćavanje veće količine uzorka stoje nam na raspolaganju dva pristupa: uvećavanje samog analitičkog sistema ili preopterećivanje postojeće analitičke kolone. Obično se u cilju veće efikasnosti ova dva pristupa međusobno kombinuju. Ovo je osnova semipreparativne hromatografije čija je glavna prednost da se može izvoditi na postojećoj, analitičkoj HPLC instrumentaciji. Povećanje analitičkog sistema znači korišćenje kolona većih prečnika, uz veći protok mobilne faze i povećanje injektovane zapremine, a uz nepromenjenu dužinu kolone i koncentraciju uzorka. Ovim se zadržava oštrina i simetrija hromatografskih pikova. Drugi pristup je preopterećenje kolone, tj.,

povećanje količine uzorka uz zadržane analitičke uslove. Preopterećenje kolone se može postići na dva načina-koncentriciono (ukoliko rastvorljivost dozvoljava) ili zapreminsko preopterećenje, koji svaki za sebe ima kao posledicu specifičan oblik pikova.

Pre početka izolacije, bitno je osigurati sledljivost po pitanju identiteta nečistoće od interesa. Obično se neka analitička hromatografska metoda proglašava za referentnu, i nepoznoj nečistoći dodeljuje ime na osnovu njenog relativnog retencionog vremena u toj referentnoj metodi. Od koristi je praćenje kroz spektralno slaganje, korišćenjem diode-array UV detektora u toku snimanja hromatograma. Obično se snimanje hromatograma u referentnoj (analitičkoj) i preparativnoj metodi izvodi detekcijom na istoj talasnoj dužini. Na ovaj način udeo površine pika komponente od interesa u ukupnoj površini svih pikova sa hromatograma dobijenog analitičkom metodom i onog dobijenog semipreparativnom metodom pri manjim injekcionim zapreminama može da pomogne u prepoznavanju pika .

Cilj je izolacija što čistije nečistoće, za dalja MS ili NMR ispitivnja. Uzorak izolovne nečistoće ne sme da sadrži druge komponente, ni aditive iz mobilne faze koja se koristi u njenom HPLC odvajanju, zato što bi ovo predstavljalo ometajući faktor u elucidaciji strukture ili je činilo potpuno nemogućom. Dok se preparativnom hromatografijom otklanja jedan problem, izolacija čiste komponente, stvara se drugi. Komponenta koja je na taj način izolovana je čista ali je još uvek u mobilnoj fazi i to u koncentraciji koja je značajno niža od one u kojoj je bila injektovana. Iz ovog razloga najbolji izbor bi bio razvoj semipreparativne HPLC metode u kojoj se koristi mobilna faza bez aditiva. Ako ovo nije moguće, biraju se aditivi koji se lako uklanjaju. Mogu se koristiti lako isparljivi puferski reagensi poput sirćetne, trifluorsirćetne ili mravlje kiseline, amonijak, amonijum hidrogen karbonat, trietilamin, etanolamin i piridin [100] [27]. Najjednostavniji i najčešće korišćen postupak je otparvanje, koji je pogodan kako za normalno- tako i reverzno-fazno odvajanje. Drugi aspekt je

da nakon izdvajanja nečistoće, dakle, njenog izdvajanja i kolektovanja, prečišćena nečistoća mora biti izdvojena iz mobilne faze bez njene degradacije. U cilju izbegavanja degradacije, otparavanje treba vršiti pri blagim uslovima (visoki vakum, sobna temperatura).

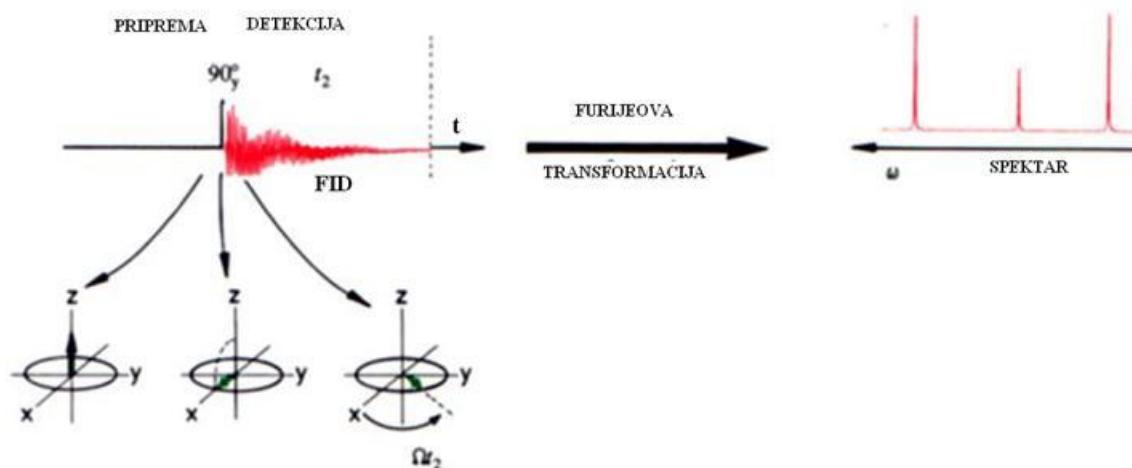
Drugi važniji postupci koji se mogu koristiti u izdvajanju željene komponente iz mobilne faze jesu tečno-tečna ekstrakcija, kristalizacija, precipitacija, liofilizacija, kolonsko odsoljavnje i dijaliza. U mnogim slučajevima izvesne kombinacije ovih postupaka su neophodne u rešavnju ovog zadatka.

Tokom kolektovanja, pre i nakon izdvajanja iz mobilne faze i pre i nakon daljih spektroskopskih snimanja savetuje se provera izolovanog materijala na identitet i čistoću referentnom analitičkom HPLC metodom. Test čistoće pika, koji se izvodi korišćenjem diode-array detektora daje dalju verifikaciju da uzorak ne sadrži druge komponente sa različitim UV spektrima. Dodatno, preporučuje se korišćenje pogodno razvijene LCMS metode za ovu namenu.

1.4.4 NMR spektroskopija

Savremena NMR spektroskopija je istaknuti predstavnik Furijeove spektroskopije gde se signal detektuje u vremenskom domenu a iz njega spektar rekonstruiše Furijeovom transformacijom. Tipičan jednodimenzionalni (1D) eksperiment odvija se tako što se prvo u periodu pripreme dopusti longitudinalnoj nuklearnoj magnetizaciji da dostigne toplotnu ravnotežu (ili se magnetizacija uvodi u željeno stacionarno stanje) nakon čega se jednim, ili serijom radiofrekventnih pulseva, ta magnetizacija prevodi u trasverzalnu koju odgovarajući detektor može da registruje. U periodu detekcije trasverzalna magnetizacija je najčešće ostavljena da se slobodno relaksira zbog čega se detektovani signal naziva FID (od engleskog free induction decay - raspad slobodne indukcije). Registrovani FID zapravo predstavlja slobodnu precesiju i relaksaciju makroskopske nuklearne magnetizacije u detekcionom periodu, t_2 ,

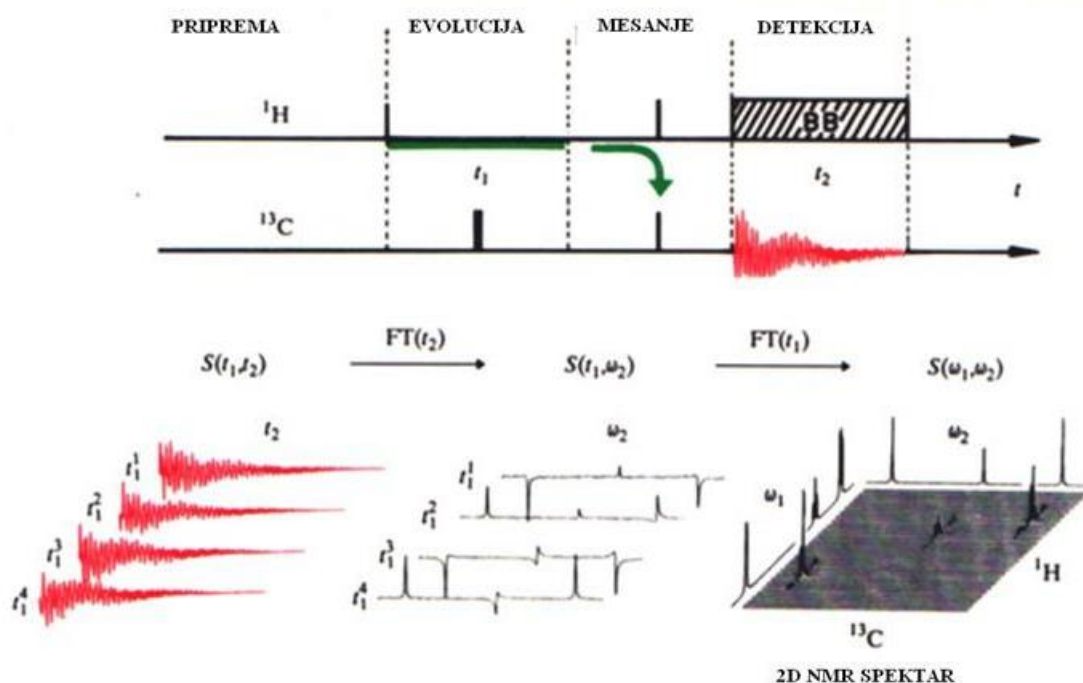
dakle signal u funkciji vremena, $s(t_2)$, čijom se Furijeovom transformacijom (FT) dobija spektar, $S(F_2)$. Dakle, 1D eksperiment se sastoji od perioda pripreme i perioda detekcije, Slika 1.5.



Slika 1.5 Princip 1D NMR spektroskopije. Evolucija magnetizacije je prikazana vektorskim opisom. Preuzeto iz [101].

Dvodimenzionalni eksperiment (2D) izveden je iz 1D umetanjem perioda razvoja (evolucije) i perioda mešanja, između perioda pripreme i detekcije. Dakle, kao u 1D eksperimentu u periodu pripreme, jednim ili serijom radiofrekventnih pulseva stvara se stacionarno stanje, kojem je u 2D eksperimentu dopušteno da se razvija tokom vremena evolucije, t_1 . To stacionarno stanje obično ima značajnu transverzalnu komponentu što znači da se tokom evolucije to stanje razvija po rezonantnim frekvencijama transverzalne komponente. Evolucija se zaustavlja novim radiofrekventnim pulsem (ili serijom pulseva) pri čemu dolazi do mešanja magnetizacija koje su postojale za vreme evolucije. Na kraju, opet primenom jednog ili više pulseva obrazuje se transverzalna magnetizacija koja se registruje tokom perioda detekcije, t_2 , kao u 1D slučaju. Kao i pre, Furijeovom transformacijom registrovanog signala, $s'(t_2)$ dobija se spektar, $S'(F_2)$. Ovaj spektar nije potpuno isti kao onaj dobijen u 1D metodi ($S' \neq S$) jer su u ovom slučaju detektovane komponente transverzalne

magnetizacije modulirane frekvencijama u evolucionom periodu. Dakle, detektovani signal je funkcija i vremena evolucije, t_1 , i detekcije, t_2 , $s'(t_2) = s-t_1(t_2)$. Kada se isti eksperiment ponovi uz sistematsko povećavanje evolucionog perioda, i dobijeni $s_1(t_2)$ vektori uredi po t_1 vremenima, dobija se matrica $s(t_1, t_2)$ iz koje 2D Furijeovom transformacijom nastaje 2D spektar, $S(F_1, F_2)$. U 2D spektru spektralna linija na položaju (F_1, F_2) označava da između frekvencija F_1 i F_2 postoji korelacija čija priroda zavisi od toga šta se dešavalo sa tim frekvencijama u toku perioda mešanja, Slika 1.6. U ovom radu nas zanimaju korelacije uspostavljene kroz hemijske veze jer se iz njih najlakše utvrđuje struktura nepoznatih jedinjenja.

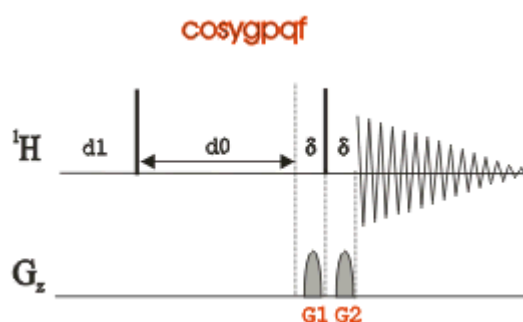


Slika 1.6 Princip 2D NMR spektroskopije, dat na primeru HETCOR (^1H - ^{13}C COSY). Dole u sredini je prikazana promena signala, koji potiče od ^{13}C jezgara nakon prve Furijeove transformacije, $S(t_1, \omega_2)$, preinačena razvojem ^1H magnetizacije tokom t_1 . Preuzeto iz [101].

1.4.4.1 Homonuklearna korelaciona spektroskopija COSY

COSY (COrrelation SpectroscopY) je homonuklearni 2D NMR eksperiment u kojem su povezana (korelisana) hemijska pomeranja svih ^1H jezgara koji su međusobno skalarno spregnuti. Ovim NMR eksperimentm mogu se dobiti korelacije između jezgra (H_a) i jezgra (H_b) koji su skalarno spregnuti preko dve veze (geminalno sprežanje), preko tri veze (vicinalno sprežanje) ili u ređim slučajevima preko četiri ili pet veza (daljinsko sprežanje).

Postoji nekoliko metoda da se dobije COSY spektar a ovde će biti ukratko opisana ona sa gradijentima pomoću kojih se bira željena magnetna koherencija, Slika 1.7 Osnovu svake COSY metode čine je dva pulsa, najčešće od 90° koji u ovom slučaju imaju istu konstantnu fazu. Međusobno su razdvojeni periodom evolucije, t_1 , koji se tokom eksperimenta sistematski uvećava sa konstantnim inkrementom d_0 . Dva gradijentna pulsa postavljena su neposredno ispred i iza drugog 90° pulsa. Odmah zatim uključuje se prijemnik koji tokom vremena detekcije, t_2 , registruje signal raspada slobodne magnetne indukcije.

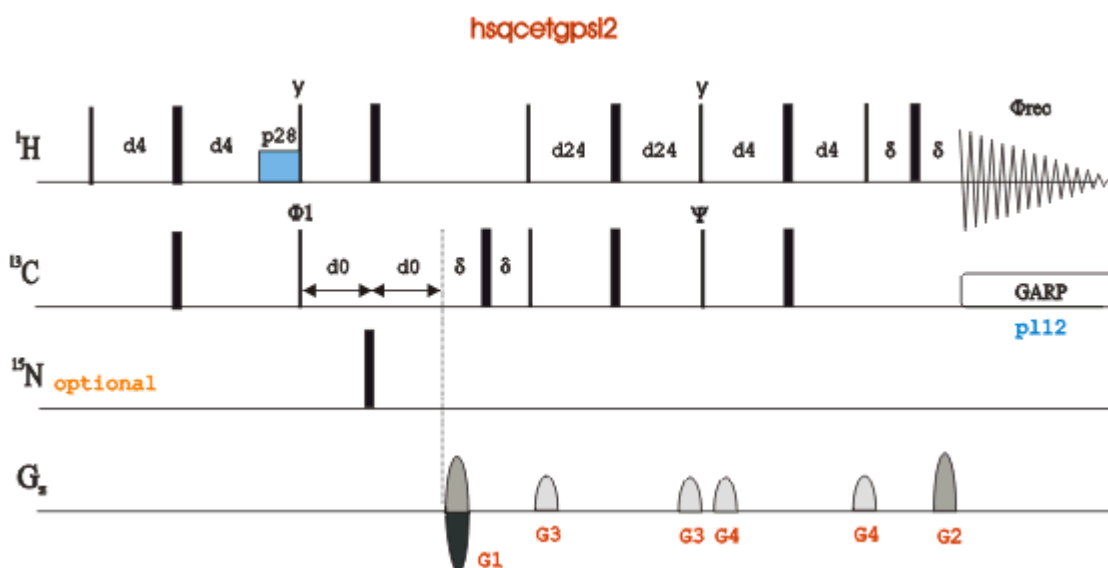


Slika 1.7 COSY sa gradijentima (Bruker: „cosygpqf“ [102])

Opisana metoda pruža mogućnost za brzo snimanje niskorezolutivnih COSY spektara koji se mogu koristiti za pouzdano ustanovljavanje ^1H - ^1H korelacija međusobno spregnutih vodonika.

1.4.4.2 Heteronuklearna jedno-kvantna korelaciona spektroskopija HSQC

U HSQC eksperimentu dva različita jezgra (ovde ^1H i ^{13}C) se dovode u međusobnu vezu putem razvoja i prenosa jednostruko-kvantne koherencije (Slika 1.8). Za razliku od HETCOR (^1H - ^{13}C COSY) eksperimenta, gde se ^1H magnetizacija indirektno detektuje (F1) i prevodi u ^{13}C magnetizaciju koja se direktno detektuje (F2), u ovakvim „premetnutim“ eksperimentima u F1 dimenziji su hemijska pomeranja ^{13}C a u F2 hemijska pomeranja ^1H . Ovo pruža brojne prednosti u odnosu na HETCOR eksperiment, pre svega u povećanju osetljivosti (0.5 mg uzorka može biti dovoljno za snimanje kvalitetnog spektra).

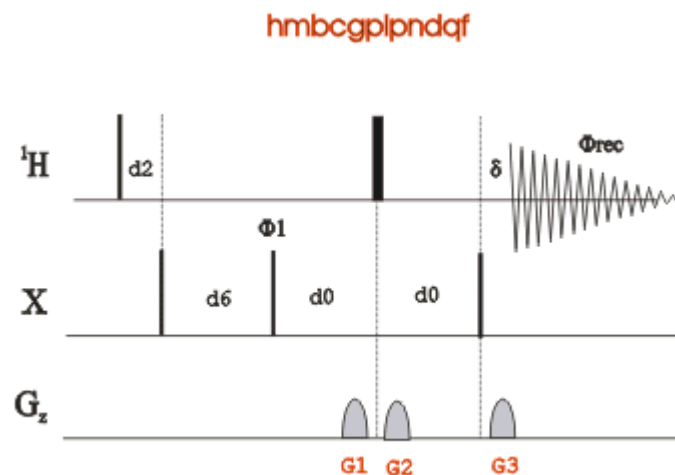


Slika 1.8 HSQC sa gradijentima uz poboljšanu osetljivost (Bruker: „hsqcetgpsi2“ [102])

Svaki od korelacionih signala na HSQC spektru ukazuje na postojanje sprežanja preko jedne hemijske veze između protona i ugljenika. Na ovaj način moguće je saznati koji protoni su direktno vezani za koji ugljenik. Ovo je, takođe, brzi način da se snimi spektar ugljenika, kao je osetljivost znatno veća no pri snimanju običnog 1D ^{13}C spektra. Međutim, treba naglasiti da se kvarternarni ugljenici na ovaj način ne detektuju.

1.4.4.3 Heteronuklearna korelaciona spektroskopija preko više hemijskih veza, HMBC

HMBC eksperiment je suštinski sličan Heteronuklearnoj višestruko-kvantnoj korelacionoj spektroskopiji, HMQC. Međutim, ovde se bira prenos koherencije za skalarna sprežanja koja su mnogo manjih vrednosti J_{CH} (10Hz za HMBC, naspram 150Hz za HMQC) tako da se detektuju međusobna povezanost jezgara koja su dve ili tri hemijske veze međusobno udaljena ($2,3J_{CH} \sim 10$ Hz) a odbacuju se koherencija koja potiče od direktno povezanih jezgara ($1J_{CH} \sim 150$ Hz). Na ovaj način HMBC spektar sadrži podatke i o ^{13}C jezgrima za koje nisu direktno vezani vodonici (karbonilna grupa ili kvarternarni ugljenici) ili o međusobnoj vezanosti jezgara preko azota ili kiseonika. Prisustvo signala u HMBC spektru koji potiču od korelacija na velika rastojanja zavisi od mnogih faktora, koji su vezani za eksperimentalne uslove i samu strukturu jedinjenja. Ovoga treba da budemo svesni pri korišćenju i interpretaciji ovog eksperimenta. Intenziteti korelacionih pikova pored ostalog zavise i od odnosa veličine konstanti sprežanja na duga rastojanja i odabrane vrednosti za vremenski period Δ_{LR} , koji treba da je optimalno postavljen na $1/2nJ_{CH}$ ($2nJ_{CH}$ od 5-25Hz). Može desiti da konstante sprežanja preko tri hemijske veze budu veće nego preko dve veze, tako da postoji izvesna nemogućnost njihovog razlikovanja. Uprkos ovom nedostatku, protoni mogu potencijalno biti korelisani sa velikim brojem ugljenika koji su njegovi susedi udaljeni dve ili tri veze, pružajući dosta strukturalnih podataka o nepoznatoj molekuli. Na Slici 1.9 prikazana je HMBC serija radiofrekventnih pulseva sa pogodno postavljenim gradijentnim pulsevima i detekcijom na 1H kanalu bez ^{13}C rasprežanja.



Slika 1.9 HMBC sa gradijentima bez ^{13}C raspresanja (Bruker: „hmbcgp1pndqf“ [102])

1.4.5 Sprega tačne hromatografije i masene spektrometrije, LC-MS, LC-MS/MS

Zahvaljujući njenim jedinstvenim analitičkim karakteristikama, masena spektrometrija postala je važna alatka u elucidaciji struktura nepoznatih nečistoća i razgradnih supstanci farmaceutskih supstanci, koje su prisutne u niskim koncentracionim nivoima [103-104]. Prvi korak u analitičkoj strategiji za analizu nečistoća i razgradnih proizvoda je merenje njihove što tačnije molekulske mase, korišćenjem za to pogodnih jonizacionih metoda, najčešće elektrosprej jonizacije (ESI) [105,106] ili hemijske jonizacije pod atmosferskim pritiskom (APCI) [107]. Određivanje elementalnog sastava molekuskog jona nepoznatog jedinjenja vrši se MS eksperimentom visoke rezolucije (HR/MS) koristeći visoko rezolutivne masene nalizatore, pre svega one na bazi vremena preleta (TOF) [108-109], maseni analizator jon ciklotronske rezonancije sa furijeovom transformacijom (FT-ICR) [110,111] ili orbitrap sa furijeovom transformacijom (FT-orbitrap) [112-115]. Tandem MS eksperimenti (MS/MS) se izvode da bi se utvrdili fragmentacioni putevi same aktivne farmaceutske

supstance i njenih nepoznatih, srodnih supstanci [116,117]. U slučaju određivanja kompleksnih smeša jedinjenja, spregnute analitičke tehnike poput tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) / MS (LC/MS) i gasne hromatografije / MS (GC/MS) mogu biti korišćene da bi se dobila informacija o molekulskoj masi svake od pojedinačnih komponenti i njihov elementarni sastav u HR/MS modu, kao i fragmentacione informacije iz LC/MS/MS eksperimenata. Odgovarajuća HPLC metoda treba da pruži dovoljno selektivno odvajanje uz korišćenje mobilnih faza čiji je sastav kompatibilan sa MS instrumentacijom [118]. LC-HR/MS and LC-HR/ MS/MS metode su ključne u dobijanju tačnih masenih podataka za sam molekulski jon ali i fragmentacione jone koji su neophodni za pretpostavljanje strukture. ESI i APCI spektri su jednostavniji od EI spektara tako da pružaju manje strukturnih informacija. Korišćenje ovih mekših jonizacionih tehnika za temeljnija strukturna ispitivanja je moguće jedino putem tandem masena spektrometrije (MS/MS) kojom se omogućava praćenje daljeg puta fragmentacije izabranog molekuskog jona ili jonskog fragmenta. Na ovaj način dobijamo masene spektre koji su senzitivni na male izmene u strukturi. Proučavanje načina fragmentacije malih molekula korišćenjem tandem masena spektrometrije u pozitivnom jonskom modu je jedno od osnovnih alatki u strukturnoj elucidaciji. Strukturne informacije su sadržane u uočenim fragmentacionim obrazcima, koji se dobijaju objašnjenjem mehanizmima u puteva fragmentacije. Često se javlja potreba da se u završnoj fazi utvrđivanja predložene strukture jedinjenja izvode i hemijske derivatizacije koje uključuju pre svega eksperimente sa vodonik/deuterijum izmenama [119-128]. Pristup koji se sastoji u on-line H/D izmenama u LC/MS merenjima može pružiti dosta korisnih informacija u studijama elucidacije strukture. Ovom metodom se mere razlike u molekulskim masama komponenti pre i posle deuterijumske izmene da bi se odredio broj izmenjivih vodonikovih atoma u molekuli što daje dodatne strukturne podatke. Generalno, izmenjivi vodonikovi atomi su vezani za N, O, ili S atome u funkcionalnim grupama kao što su OH-, NH-, NH₂-, COOH-. Mobilne faze sa deuterio hemikalijama lako mogu biti

iskorišćene u ovom smislu za on-line LC/MS analizu smeša. Kombinacija HR/MS/MS i online H/D izmene pruža jako korisni način za brzu strukturnu karakterizaciju nepoznatih. Konačna struktura se potvrđuje NMR eksperimentima na izolovanom uzorku ili sintetičkom standardu.

2. CILJ RADA

Cilj predložene doktorske disertacije je objašnjenje i naučno-fundamentalno razumevanje puteva degradacije esomeprazol natrijuma u čvrstom stanju i u rastvorima. Ovo zahteva karakterizaciju svih od potencijalno prisutnih degradacionih komponenti baziranu na HPLC metodama, UV-Vis spektrometriji, HR LC-MS merenjima i 1D i 2D NMR metodama. Osnovu istraživanja doktorske disertacije činila bi ciljno osmišljena ispitivanja stabilnosti ispitivanog jedinjenja, esomeprazol natrijuma, određivanje i karakterizacija njegovih nečistoća, potencijalnih i realnih degradacionih proizvoda.

Izuzetna hemijska osetljivost esomeprazola, čini neophodnim stvaranje jasne slike o njegovim nečistoćama i putevima razgradnje. Ova problematika bi bila obrađena na sveobuhvatan način, uz doprinos naročito u metodološkom pristupu rešavanja ovakvih problematika. U vrlo ranoj fazi ispitivanja esomeprazol natrijuma uočeno je da je on izrazito nestabilan, osetljiv na toplotu, oksidaciju i jako podložn kiselj hidrolizi uz pojavu velikog broja degradacionih proizvoda. Interesantno je da jedna ovakva mala molekula pokazuje izrazitu mnogovrsnost u mogućim reakcionim putevima njene razgradnje. Kako je bezbednost leka određena neželjenim farmakološkim-toksikološkim profilom kao i alergijskim efektima izazvanih upravo nečistoćama prisutnim u njemu [129-132], farmaceutske proizvod namenjen za ljudsku upotrebu mora se po ovom pitanju okarakterisati što kompletnije. Na osnovu ICH vodiča, svaki degradacioni proizvod leka prisutan u količini koja je iznad tzv. identifikacione granice mora biti strukturno objašnjen [133]. U ovom slučaju identifikaciona granica je bila u nivou prisutnosti od 0.20 % izraženo na glavnu komponentu.

Najpre, literaturno nedostupna, bila bi razvijena visokoselektivna, osetljiva i efikasna reverzno-fazna HPLC metoda koja je omogućila kvalitativno

i kvantitativno određivanje više od deset identifikovanih razgradnih supstanci esomeprazola uz prisustvo velikog broja drugih razgradnih supstanci koje su od manjeg značaja. Primenjivost ove metode za tu namenu bila bi potvrđena opsežnim validacionim ispitivanjima.

Uz potencijalnu mogućnost neželjene recematizacije esomeprazola javila se potreba i za razvojem pogodne hiralno selektivne HPLC metode. Cilj je razvoj i validaciona potvrda primenljivosti, hiralno selektivne HPLC metoda koja bi bila u reverzno faznom modu razdvajanja što bi predstavljalo retki izuzetak u velikom broju ranije publikovanih normalno faznih HPLC metoda korišćenih u ovoj problematici.

U većini slučajeva postupak identifikacije se svodi na slaganje HPLC retencionih vremena degradacionog proizvoda i neke od nečistoća čiji je referentni standard dostupan. Međutim, kako je pojava i koncentracioni nivoi u kojima se javljaju degradacionih proizvodi usko vezana i uslovljeni načinima čuvanja leka, za neke od njihne postoje komercijalno dostupani referentni standardi. Jedini put za identifikaciju takvih degradacionih proizvoda, bila bi njihova izolacija i potom određivanje njihove strukture korišćenjem za to pogodnih metoda. Ovo bi najpre zahtevalo traženje pogodnih uslova forsirane degradacije kojima bi se skupila dovoljna količina potrebnog materijala. Potom, javila bi se potreba za razvojem semipreparativnih HPLC metoda kojim bi se ciljna komponenta izolovala. Kod razvoja semipreparativnih hromatografskih metoda bi se izbegavala upotreba neisparljivih modifajera u mobilnoj fazi jer bi predstavljali nepotrebnu smetnju pri NMR merenjima. Kako je referentna HPLC metoda takva da se u njoj koriste neisparljivi pufer, kao takva nije bila kompatibilna ni sa masenim detektorima. Takođe, bilo bi potrebno razviti i dovoljno selektivnu, LCMS kompatibilnu, metodu kojom se je vršilo merenje tačne molekulske mase ispitivanih jedinjenja.

Generalno, strukturalna određivanja bila bi rađena na osnovu NMR spektara snimljenih različitim 1D i 2D NMR metodama. Mada u današnje vreme postoji veliki broj 1D i 2D NMR metoda od kojih svaki daje spektre sa specifičnim podacima, cilj je ustanoviti proceduru koja bi uključivala standardizovani minimalni skup odabranih NMR eksperimenata. Kao što se očekuje, ispitivane supstance bile bi dostupna u malim količinama pa je potrebno birati pogodne NMR eksperimente koji su dovoljno osetljivi a daju kvalitetne i dovoljno uputne spektre u što kraćem vremenu. U slučaju ovakvih malih molekula, za potrebe rešavanja njihovih struktura, u većini slučajeva, bilo bi dovoljno je imati ^1H , ^{13}C , i i dvodimenzione ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC spektre. Ukrštanjem, međusobnim potvrđivanjem i udopunjavanjima strukturalnih podataka koji nosi svaki od ovih NMR spektara dolazilo bi se do zadovoljavajućeg rešenja strukture nepoznatog jedinjenja. Konačno, identifikacije nekih komponenti mogle bi biti potvrđene i putem njihove sinteze.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 RP-HPLC metoda za određivanje srodnih supstanci esomeprazola

3.1.1 Reagensi i hemikalije

Sve korišćene hemikalije su bile p. a. ili HPLC čistoće. Acetonitril (gradient grade for HPLC), metanol (gradient grade for HPLC), etil alkohol, natrijum borat dekahidrat, dinatrijum edetat kupljeni su od Merck KgaA, Darmstadt, Germany, glicin od Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Sweden, natrijum hidroksid od J.T. Baker, Deventer Holland. Voda korišćena za pripremu mobilne faze bila je iz MilliQ sistema, Millipore (Miltford, Mass, USA). Mobilna faza je filtrirana kroz Schleicher & Schuell RC 55 membranski filter (dijametar 47 mm, veličina pora 0.45 µm).

Uzorci esomeprazol natrijuma i referentni standardi esomeprazola i njegovih srodnih supstanci dobijeni su od Union Quimica Farmaceutica (Španija).

3.1.2 Aparatura i hromatografski uslovi

HPLC analize rađene su na Agilent Technologies 1100 Series HPLC Sistemu (Santa Clara, CA) koji je opremljen sa odeljkom za kolonu sa temperaturskom kontrolom, autosamplerom sa mogućnošću hlađenja, DAD UV-Vis detektorom i online degazerom mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Phenomenex Luna® C18 kolone (5.0 µm particle size, 250 × 4,6 mm id) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (glicinski pufer pH 9.0) i mobilnom fazom B (smeša acetonitrila i methanola u odnosu 85:15) uz radnu temperaturu od 35°C i protok mobilne faze od 1,0 ml/min.

Gradijentni program:

t (min)	%A	%B
0	88.0	12.0
35	32.0	68.0
36	88.0	12.0
40	88.0	12.0

Detekcija je vršena spektrofotometrijski na 280nm uz korišćenje diode array detektora. Snimanje hromatogramskih podataka njihova i analiza vršena je korišćenjem EZChrom Elite hromatografskog softvera u sklopu OpenLab softverske platforme.

3.1.3 Priprema rastvora

Glicinski pufer pravljen je rastvaranjem 3,0 g glicina u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na $9,00 \pm 0,05$ korišćenjem 50% natrijum hidroksida. Rastvarač za uzorke pravljen je rastvaranjem 3,8 g natrijum borata dekahirata i 1.0 g dinatrijum edetata u 800 ml vode, podešavanjem pH vrednosti na $11,0 \pm 0,1$ uz korišćenje 50 % natrijum hidroksida i dodatkom 200 ml elil alkohola.

Referentni rastvor je pravljen u koncentracionom nivou od 3,2 $\mu\text{g/ml}$ esomeprazola, što odgovara 0,2 % od koncentracije esomeprazola u test rastvoru: Mereno je tačno oko 17,00 mg esomeprazol natrijuma, in-house standarda, i prenošeno u 50 ml volumetrijski sud, rastvoreno u 30 ml rastvarača za uzorke i istim dopunjavano do crte. 1,0 ml ovog rastvora prenošeno je u 100 ml sud i razblaživano do crte rastvaračem. Test rastvor je pravljen u koncentracionom nivou od 1,6 mg/ml esomeprazola. Mereno je tačno oko 42,5

mg ispitivane supstance i prenošeno u 25 ml volumetrijski sud. Nakon rastvaranja u 15ml rastvarača za uzorke sud je dopunjavao do crte. Svi rastvori su pre injektovanja u HPLC sistem filtrirani kroz Sartorius, Minisart RC 25, 0,45 µm membranski filter.

3.1.4 Procedura

Nakon injektovanja 20 µl test i poredbenih rastvora snimani su hromatogrami sa UV detekcijom na 280 nm. Pogodnost HPLC sistema ispitivana je na osnovu ispunjavanja dva uslova: faktor simetrije (EP 2.2.46) pika esomeprazola u hromatogramu referentnog rastvora je između 0,8 i 1,5; relativna standardna devijacija površina pikova esomeprazola dobijenih u tri injektovanja referentnog rastvora nije veća 3,0%. Dalje analize su rađene nakon što je pokazana pogodnost HPLC sistema. Kalibracija instrumenta je izvršena korišćenjem aktuelne koncentracije esomeprazola referentnog rastvora i usrednjenih površina pikova esomeprazola dobijenih njegovim tri puta ponovljenim injektovanjima. Sledeći pikovi na hromatogramu test rastvora su isključeni iz dalje evaluacije: pikovi koji potiču od rastvarača za uzorke i pik esomeprazola. Nakon identifikacije pikova nečistoća (na osnovu relativnih retencionih vremena) svaki pik je kvantikovano korišćenjem postojeće kalibracije na osnovu pika esomeprazola. Za poznate nečistoće korišćeni su u okviru validacionih ispitivanja linearnosti metode ustanovljeni relativni faktori odgovora (prikazani u Tabela 3.1), dok se za nepoznate nečistoće i identifikovane koje nisu mogle biti dobijene u čvrstom stanju koristio pretpostavljeni faktor odgovora vrednosti 1,0.

3.1.5 Kvantifikacija

Kvantifikacija je bazirana na linearnoj kalibracionoj funkciji koja uključuje kodinadni početak formiranoj na osnovu eksternog standarda. Za proračun sadržaja nečistoća izraženo na procenat sadržaja glavne komponente, esomeprazola korišćena je sledeća formula:

$$\% \text{ nečistoće} = \frac{P_a \times W_{st} \times c \times 1 \times 25 \times 100 \times 0.937 \times CF}{P_{st} \times w_{uz} \times 100 \times 50 \times RRF} = \frac{P_a \times W_{st} \times c \times 0.937 \times CF}{2 \times P_{st} \times w_{uz} \times RRF}$$

gde je P_a , površina pika nečistoće u test rastvoru; P_{st} , površina pika esomeprazola u poredbenom rastvoru; W_{st} , masa odmerenog in-house standarda u poredbenom rastvoru (mg); c , jačina in-house standarda, as is (mg/mg); w_{uz} , masa odmerene ispitivane supstnce; 0,937, faktor konverzije esomeprazol natrijum u esomeprazol; RRF, relativni faktor odgovora date nečistoće.

3.1.6 Priprema rastvora potrebnih za validaciju metode

Pravljen je stok rastvor koji je sadržavao sve relevantne analite u nivou od 2.5 % (40 µg/ml) odnosu na koncentraciju esomeprazola u test rastvoru (1.6 mg/ml). Ovaj rastvor je pravljen odmeravanjem u odmerni sud od 100 ml tačno oko 4,25 mg referentnog standarda esomeprazol natrijuma i po tačno oko 4.00 mg referentnih standarda sledećih nečistoća Neč. A, Neč. B, Neč. C, Neč. D, Neč. E, Neč. F+G, Neč. H, Neč. I, N-Metil Omeprazola i 4-Hidroksi omeprazol sulfida. Ova smeša je rastvorena u acetonitrilu i istim rastvaračem dopunjena do crte.

Razblaženjem različitih zapremina gornjeg štok rastvora u rastvaraču za uzorke, pravljeni rastvori sa analitima u sedam različitih koncentracionih nivoa kao što je dato u Tabela 3.2. Svaki od ovih rastvora je filtriran kroz RC membranski filter 0,45 µm pre injektovanja u hromatografski sistem. Pri daljim statističkim analizama rezultata u preračune su ulazile stvarne koncentracije analita na osnovu tačne odmerene mase svakog od njih i jačine korišćenih referentnih supstanci.

Tabela 3.1 Skraćeni naziv, hemijsko ime i relativna retenciona vremena (RRT) i relativni faktori odgovora (RRF) dobijeni referentnom RP-HPLC metodom. Redosled po RRT vrednostima.

Komp:	Hemijsko ime	RRT (λ)	RRF (λ)
Ciklični sulfenamid Ome.	2,4-dimetil-3,9- O-dimetoksi-5H-pirido[1',2':4,5[] 1 ,2,3]-tiadiazino[2,3-a] benzimidazol-13-ium i 2,4-dimethyl-3,l O-dimethoksi-5H-pirido[1',2':4,5[] 1 ,2,3]-tiadiazino[2,3-] benzimidazol-13-ium	0.27	1.00
Nečistoća F+G	8-Metoksi-1,3-dimetil-12-tioksopirido[1',2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-one i 9-Metoksi-1,3-dimethyl-12-thioksopirido [1',2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-one	0.33	0.54
4-Hidroksi Ome. Sulfon	2-[[[(5-Metoksi-1H-benzimidazol-2-il)sulfonil]metil] -3,5-dimetil-4-piridinol;	0.42	1.00
4-Hydroxy Ome.	2-[[[(5-Metoksi-1H-benzimidazol-2-il)sulfinil]metil]-3,5- dimetil-4-piridinol	0.46	1.00
Nečistoća I	4-Metoksi-2-[[[(5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il) sulfonil] methyl] -3,5- dimetilpiridin 1-oksid	0.56	1.54
Nečistoća A	5-Metoksi-1H-benzimidazol-2-thiol	0.63	0.64
Nečistoća E	4-Metoksi-2-[[[(RS)-(5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il)sulfinil]metil]-3,5-dimetilpiridin 1-oksid	0.72	1.45

Tabela 3.1 nastavak

Komp:	Hemijsko ime	RRT	RRF
		(<i>l</i>)	(<i>l</i>)
Nečistoća D	5-Metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfonyl]-1H-benzimidazol	0.78	0.97
4-Hidroksi Ome. sulfid	2-[[[5-Metoksi-1H-benzimidazol-2-il)thio]methyl]-3,5-dimethyl-4-pyridinol	0.81	1.86
Nečistoća B	2-[(RS)-[(3,5-dimethylpyridin-2-il)metil]sulfonyl]-5-metoksi-1H-benzimidazol	0.96	1.55
Esomeprazol	6-Metoksi-2-[(S)-[(4-metoksi-3,5-dimethyl-2-pyridinil)metil]sulfonyl]-1H-benzimidazol	1.00	1.00
N-Metil Ome.	5-Metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimethyl-2-pyridinil)metil]sulfonyl]-1-methyl-1H-benzimidazol	1.16	0.96
Nečistoća H	2-[(RS)-[(4-hloro-3,5-dimethylpyridin-2-il)metil]sulfonyl]-5-metoksi-1H-benzimidazol	1.19	1.13
Nečistoća C	5-Metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimethylpyridin-2-il)-metil]sulfanyl]-1H benzimidazol	1.36	0.87

Tabela 3.2 Priprema rastvora za validaciono ispitivanje linearnosti

Koncentracioni nivo	V (ml)	Rastvor	V suda	Očekivana koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)
1,0 %	10,0	2,5% Štok rastvor	25	16,0
0,5 %	5,0	2,5% Štok rastvor	25	8,0
0,3 %	3,0	2,5% Štok rastvor	25	4,8
0,2 %	2,0	2,5% Štok rastvor	25	3,2
0,15%	1,5	2,5% Štok rastvor	25	2,4
0,1 %	1,0	2,5% Štok rastvor	25	1,6
0,05%	2,0	0,5 % rastvor	20	0,8
0,02%	2,0	0,2% rastvor	20	0,32

Radni rastvori za ispitivanje tačnosti su pripremani u devet odmernih sudova od po 25 ml. U svaki od njih je odmeravano tačno oko 42,5 mg esomeprazole natrijuma i prenošeno V ml (Tabela 3.3) štok rastvora nečistoća koji je korišćen za ispitivanje linearnosti. Na ovaj način su dobijeni rastvori esomeprazole koji su opterećeni svakim od analita u tri različita poznata koncentraciona nivoa (tačno oko 0,10, 0,15 i 0,20 %) svaki u triplikatu. Nakon rastvaranja u rastvaračem za uzorke sudovi su dopunjavani do crte i filtrirani kroz kroz 0,45 μm RC membranski filter (korišćen je Sartorius, Minisart RC 25, 0,45 μm) uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata. U daljim kvantifikacionim preračunima su ulazile stvarne koncentracije analita na osnovu tačne odmerene mase svakog od njih i jačine korišćenih referentnih supstanci.

Tabela 3.3 Način pripreme rastvora za validaciono ispitivanje tačnosti

Oznaka	V(ml)	V suda	C (µg/ml)
A 1-1	1,0	25	1,6
A 1-1	1,0	25	1,6
A 1-1	1,0	25	1,6
A 2-1	1,5	25	2,4
A 2-2	1,5	25	2,4
A 2-3	1,5	25	2,4
A 3-1	2,0	25	3,2
A 3-2	2,0	25	3,2
A 3-3	2,0	25	3,2

Radni rastvori za ispitivanje preciznosti su pripremani u šest odmernih suda od po 25 ml. U svaki od njih je odmeravano tačno oko 42,5 mg esomeprazole natrijuma i prenošeno 1,5 ml štok rastvora nečistoća koji je korišćen za ispitivanje linearnosti. Na ovaj način su dobijeni rastvori esomeprazole koji su opterećeni svakim od analita u koncentracionim nivou 0,15 % od koncentracije esomeprazole u test rastvoru ili 2,4 µg/ml.

Za namenu ispitivanja stabilnosti poredbenog i test rastvora svaki od ovih rastvora su čuvani pod različitim uslovima (sobna temperatura izloženo i zaštićeno od svetlosti i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti) i svaki od rastvora kvantifikovan u odnosu na sveže napravljene poredbeni rastvor.

Za namenu ispitivanja robustnosti metode pravljene su glicinski puferi (mobilna faza A) različitih jonskih jačina i pH vrednosti:

- Glicinski pufer pH 9,0, pravljen je rastvaranjem 3,0 g glicina u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na $9,00 \pm 0,05$ korišćenjem 50% natrijum hidroksida.
- Glicinski pufer pH 9,2 sa višom koncentracijom glicina pravljen je rastvaranjem 3,3 g glicina u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na $9,20 \pm 0,05$ korišćenjem 50% natrijum hidroksida.

- Glicinski pufer pH 9,2 sa nižom koncentracijom glicina pravljen je rastvaranjem 2,7 g glicina u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na $9,20 \pm 0,05$ korišćenjem 50% natrijum hidroksida.
- Glicinski pufer pH 8,8 sa višom koncentracijom glicina pravljen je rastvaranjem 3,3 g glicina u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na $8,80 \pm 0,05$ korišćenjem 50% natrijum hidroksida.
- Glicinski pufer pH 8,8 sa nižom koncentracijom glicina pravljen je rastvaranjem 2,7 g glicina u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na $8,80 \pm 0,05$ korišćenjem 50% natrijum hidroksida.

Za ispitivanja robustnosti metode pravljen je test rastvor esomeprazola opterećen Nečistoćam D, 4-hidoksi omeprazol sulfidom i N-metil omeprazolom, svaki u nivou od oko 0,3% u odnosu na koncentraciju esomeprazola u test rastvoru. Ovaj rastvor je pravljen odmeravanjem po tačno oko 4,00 mg Neč. D, 4-Hidroksi omeprazol sulfida i N-Metil Omeprazola referentnih standarda u odmerni sud od 25 ml i rastvoranjem u acetonitrilu pravljen je štok rastvor ovih nečistoća. 3,0 ml ovog štok rastvora je preneseno u odmerni sud od 20 ml sa već odmerenih 34 mg esomeprazol natrijuma i rastvoreno u rastvaraču za uzorke.

Svi gore navedeni rastvori koji su bili namenjeni za iniciranje u hromatografski sistem su pre injektovanja filtrirani kroz 0,45 μm RC membranski filter (korišćen je Sartorius, Minisart RC 25, 0.45 μm) uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

3.1.7 Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije

Ispitivanja fotodegradacije ($>1,2$ milion lux sati, $\text{UV}>200$ Wh/ m^2) i termodegradacije (110 °C) vršena su na čvrstom esomeprazol natrijumu. Test rastvori koji su sadržavali netretirani, termalno tretiran i fotodegradiran

esomeprazol natrijum pripremani su za hromatografsku analizu na već opisan način za pripremu test rastvora ispitivane supstance do finalnih koncentracija esomeprazola u koncentracionom nivou od 1,6 mg/ml esomeprazola. Mereno je tačno oko 42,5 mg ispitivane supstnce i prenošeno u 25 ml volumetrijski sud. Nakon rastvaranja u 15ml rastvarača za uzorke sud je dopunjavan do crte.

Rastvor za ispitivanje stabilnosti esomeprazola u uslovima kisele hidrolize pravljen je u odmernom sudu od 25 ml gde je rastvarano oko 42,5 mg esomeprazol natrijuma u 1 ml acetonitrila. Nakon dodavanja 2 ml 0.1 M rastvora hlorovodonične kiseline je brzo (4 min) neutralozovan sa 2.5 ml 0.1M rastvora natrijum hidroksida i sud je dopunjavan rastvaračem za uzorke do crte.

Rastvor za ispitivanje stabilnosti esomeprazola u uslovima bazne hidrolize pravljen je u odmernom sudu od 25 ml gde je rastvarano oko 42,5 mg esomeprazol natrijuma u 1 ml acetonitrila. Nakon dodavanja 2 ml 5 M rastvora natrijum hidroksida je grejan na 90°C u trajanju od 90 minuta. Nakon neutralizacije sa sa 1,5 ml rastvora hlorovodonične kiseline i sud je dopunjavan rastvaračem za uzorke do crte.

Rastvori u kome je esomeprazol natrijum podvrgnuti oksidativnoj stres studiji je pravljen u odmernom sudu od 25 ml gde je rastvarano oko 42,5 mg esomeprazol natrijuma u 1 ml acetonitrila. Nakon dodavanja 1 ml 0,5 % vodonik peroksida reakcija je termalno pospešena grejanjem na 80°C u trajanju od 30, odnosno i 60 minuta. Sud je nakon ovoga dopunjavan rastvaračem za uzorke do crte.

Pre iniciranja svi rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter (korišćen je Sartorius, Minisart RC 25, 0,45 µm) uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

3.2 Hiralno selektivna RP-HPLC

3.2.1 Reagensi i hemikalije

Sve korišćene hemikalije su bile p. a. ili HPLC čistoće. Metanol (isocratic grade), Dinatrijum hidrogen fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), Trinatrijum fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) kupljeni su od Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Natrijum dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) od Fluka, Buchs, Switzerland, natrijum hidroksid od J.T. Baker, Deventer Holland. Voda korišćena za pripremu mobilne faze bila je iz MilliQ sistema, Millipore (Miltford, Mass, USA). Mobilna faza je filtrirana kroz Schleicher & Schuell RC 55 membranski filter (dijametar 47 mm, veličina pora 0,45 μm).

Referenti standard (R)- omeprazola dobijen je od Union Quimica Farmaceutica (Španija), a recemat omeprazola kupljen je kao Omeprazol CRS od European Pharmacopoeia.

3.2.2 Aparatura

HPLC analize rađene su na Agilent Technologies 1100 Series HPLC Sistemu (Santa Clara, CA) koji je opremljen sa odeljkom za kolonu sa temperaturskom kontrolom, autosamplerom sa mogućnošću hlađenja, DAD UV-Vis detektorom i online degazerom mobilne faze. Hiralno selektivno hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem CHIRAL AGP C18 kolone (5 μm particle size, 150 \times 4,0 mm id) korišćenjem izokratskih uslova sa mobilnom fazom koja se sastojala od smeše fosfatnog pufera pH 6,0 Metanola u odnosu 75:25, pri protoku od 0,4 ml/min, na temperaturi od 25°C.

3.2.3 Priprema rastvora

Fosfatni pufer pH 6,0 pravljen je rastvaranjem 2,730 g Natrijum dihidrogen fosfata, dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrenosti na $6,00 \pm 0,05$ korišćenjem 1M vodenog rastvora natrijum hidroksida.

Kao rastvarač za uzorke korišćena je smeša fosfatnog pufera pH 11,0 i metanola u odnosu 75:25. Fosfatni pufer pH 11,0 je pravljen rastvaranjem 1,045 g Trinatrijum fosfat dodekahidrata ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) i 3.940 g dinatrijum hidrogem fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$).

Rastvor za ispitivanje pogodnosti sistema je pravljen odmeravanjem oko 3.40 mg omeprazole, CRS EP (recemat), i prenošenjem u 100 ml volumetrijski sud. Nakon rastvaranja u 70 ml sud je dopunjavan do crte. Poredbeni rastvor je pravljen u koncentracionom nivou od 1,28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ esomeprazola, što odgovara 0,2 % od koncentracije esomeprazola u test rastvoru: Mereno je tačno oko 17,00 mg esomeprazol natrijuma, in-house standarda, i prenošeno u 100 ml volumetrijski sud, rastvoreno u 70 ml rastvarača za uzorke i istim dopunjavano do crte. 4,0 ml ovog rastvora prenošeno je u 50 ml sud i razblaživano do crte rastvaračem. Potom, 5,0 ml ovog rastvora prenošeno je u 50 ml sud i razblaživano do crte rastvaračem. Test rastvor je pravljen u koncentracionom nivou od 640 $\mu\text{g}/\text{ml}$ esomeprazola. Mereno je tačno oko 34,00 mg ispitivane supstnce i prenošeno u 50 ml volumetrijski sud. Nakon rastvaranja u 30 ml rastvarača za uzorke sud je dopunjavan do crte. Svi rastvori su pre injektovanja u HPLC sistem filtrirani kroz Sartorius, Minisart RC 25, 0,45 μm membranski filter.

3.2.4 Procedura

Nakon injektovanja 10 μl test i referentnih rastvora snimani su hromatogrami UV detekcijom na 302 nm. Pogodnost HPLC sistema ispitivana je na osnovu ispunjavanja dva uslova: relativna standardna devijacija površina pikova esomeprazola dobijenih u tri injektovanja referentnog rastvora nije veća 3,0 %; na hromatogramu rastvora za ispitivanje pogodnosti sistema rezolucija između pika (R)-omeprazola i esomeprazolanije manja od 2,0.

Dalje analize su rađene nakon što je pokazana pogodnost HPLC sistema. Kalibracija instrumenta je izvršena korišćenjem aktuelne koncentracije

esomeprazola u referentnom rastvoru i usrednjenih površina pikova esomeprazola dobijenih njegovim tri puta ponovljenim injektovanjima. Nakon identifikacije pika (R)-omeprazola (na osnovu hromatograma rastvora za ispitivanje pogodnosti sistema) pik je kvantikovano korišćenjem postojeće kalibracije na osnovu pika esomeprazola. Korišćen je ustanovljeni relativni faktori odgovora, vrednosti 1,0.

3.2.5 Kvantifikacija

Kvantifikacija je bazirana na linearnoj kalibracionoj funkciji koja uključuje kodinatti početak formiranoj na osnovu eksternog standarda. Za proračun sadržaja (R)-omeprazola izraženo na procenat sadržaja glavne komponente, esomeprazola korišćena je sledeća formula:

$$\% \text{ (R)-omeprazola} = \frac{P_a \times W_{st} \times c \times 0.937 \times 4 \times 5 \times 50 \times 100}{P_{st} \times w_{uz} \times 100 \times 50 \times 50} = \frac{P_a \times W_{st} \times c \times 0.937 \times 2}{P_{st} \times w_{uz} \times 5}$$

Gde je P_a , površina pika (R)-omeprazola u test rastvoru; P_{st} , površina pika esomeprazola u poredbenom rastvoru; W_{st} , masa odmerenog in-house standarda u poredbenom rastvoru (mg); c , jačina in-house standarda, as is (mg/mg); w_{uz} , masa odmerene ispitivane supstnce; 0,937, faktor konverzije esomeprazol natrijum u esomeprazol.

3.2.6 Priprema rastvora potrebnih za validaciju metode

Pravljen je štok rastvor koji je sadržavao analite u nivou od oko 10 % (64 µg/ml) odnosu na koncentraciju esomeprazola koja je u test rastvoru (640 µg/ml). Ovaj rastvor je pravljen odmeravanjem u odmerni sud od 100 ml po tačno oko 13,5 mg referentnog standarda esomeprazol natrijuma i referentnog standarda (R)-omeprazol natrijuma. Ova smeša je rastvorena u rastvaraču za uzorke i istim rastvaračem dopunjena do crte.

Za namenu ispitivanja linearnosti metode pravljeni su rastvori opisani u daljem tekstu. Razblaženjem različitih zapremina gornjeg štok rastvora u

rastvaraču za uzorke, pravljene rastvori sa analitima u sedam različitih koncentracionih nivoa kao što je dato u Tabeli 3.4. Svaki od ovih rastvora je filtriran kroz RC membranski filter 0,45 μm pre injektovanja u hromatografski sistem. Pri daljim statističkim analizama rezultata u preračune su ulazile stvarne koncentracije analita na osnovu tačne odmerene mase svakog od njih i jačine korišćenih referentnih supstanci.

Tabela 3.4 Priprema rastvora za validaciono ispitivanje linearnosti

Koncentracioni nivo	V (ml)	Rastvor	V suda	Očekivana koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)
1.0 %	5.0	10% Štok rastvor	50	16.0
0.5 %	5.0	10% Štok rastvor	100	8.0
0.3 %	3.0	10% Štok rastvor	100	4.8
0.2 %	2.0	10% Štok rastvor	100	3.2
0.15%	3.0	10% Štok rastvor	200	2.4
0.1 %	5.0	1.0 % rastvor	50	1.6
0.05%	5.0	0.5 % rastvor	50	0.8
0.02%	5.0	0.2% rastvor	50	0.32

Za ispitivanje tačnosti metode najpre je pravljene štok rastvor (R)-omeprazol natrijuma. On je pripremljen odmeravanjem tačno oko 17,0 mg (R)-omeprazol natrijuma u 50,0 ml, rastvaranjem u rastvaraču za uzorke i potom daljim razblaživanjem 10.0 ml u odmerni sud od 50,0 ml (5%). Radni rastvori za ispitivanje tačnosti su pripremani u petnaest odmernih sudova od po 50,0 ml. U svaki od njih je odmeravano oko 34,0 mg esomeprazole natrijuma i prenošeno V ml (Tabela 3.5) štok rastvora (R)-omeprazol natrijuma. Na ovaj način su dobijeni rastvori esomeprazola koji su opterećeni svakim od analita u tri različita poznata koncentraciona nivoa (oko 0,03, 0,10, 0,30, 0,50 i 0,70 %) svaki u triplikatu. Nakon rastvaranja u rastvaračem za uzorke sudovi su dopunjavani

do crte i filtrirani kroz kroz 0.45 μm RC membranski filter (korišćen je Sartorius, Minisart RC 25, 0.45 μm) uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata. U daljim kvantifikacionim preračunima su ulazile stvarne koncentracije analita na osnovu tačne odmerene mase i jačine korišćene referentne supstance.

Tabela 3.5 Način pripreme rastvora za validaciono ispitivanje tačnosti

Oznaka	V(ml)	V suda	C ($\mu\text{g/ml}$)
A 1-1	0,30	50	0,192
A 1-1	0,30	50	0,192
A 1-1	0,30	50	0,192
A 2-1	1,0	50	0,64
A 2-2	1,0	50	0,64
A 2-3	1,0	50	0,64
A 3-1	3,0	50	1,92
A 3-2	3,0	50	1,92
A 3-3	3,0	50	1,92
A 4-1	5,0	50	3,2
A 4-2	5,0	50	3,2
A 4-3	5,0	50	3,2
A 5-1	7,0	50	4,48
A 5-2	7,0	50	4,48
A 5-3	7,0	50	4,48

Test rastvori za ispitivanje preciznosti su pripremani u šest odmernih suda od po 50 ml. U svaki od njih je odmeravano tačno oko 34,0 mg esomeprazole natrijuma i prenošeno 2,0 ml štok rastvora nečistoća koji je korišćen za ispitivanje tačnosti. Na ovaj način su dobijeni rastvori esomeprazole koji su opterećeni svakim od analita u koncentracionim nivou 0,20 % od koncentracije esomeprazole u test rastvoru.

Za namenu ispitivanja stabilnosti poredbenog i test rastvora svaki od ovih rastvora je čuvan pod različitim uslovima (sobna temperatura izloženo i zaštićeno od svetlosti i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti) i svaki od rastvora kvantifikovan u odnosu na sveže pripremljeni poredbeni rastvor.

Za namenu ispitivanja robustnosti metode pravljene su mobilne faze različitih jonskih jačina, pH vrednosti i udela metanola kao organskog modifikatora. Sastav ovih mobilnih faza dat je u Tabeli 3.6. Fosfatni pufer pravljene je rastvaranjem sugerisane količine natrijum dihidrogen fosfata, dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) u 1000 ml vode i podešavanjem pH vrednosti na željenu vrednost korišćenjem 1 M vodenog rastvora natrijum hidroksida. Nakon ovoga svaki od pufera je mešan u dva različita odnosa sa metanolom kao što je naznačeno u Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Priprema mobilnih faza potrebnih za ispitivanje robusnosti metode.

	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	pH (/)	MeOH (%)
1	2,63	5,9	24
2	2,63	5,9	26
3	2,63	6,1	24
4	2,63	6,1	26
5	2,83	5,9	24
6	2,83	5,9	26
7	2,83	6,1	24
8	2,83	6,1	26

3.3 Korišćene semipreparativne HPLC metode

3.3.1 Reagensi i hemikalije

Sve korišćene hemikalije su bile p. a. ili HPLC čistoće. Acetonitril (gradient grade for HPLC), Metanol (gradient grade for HPLC) kupljeni su od Merck KgaA, Darmstadt, Germany. Amonijum formijat, p.a. kupljen od Fluka, Buchs, Switzerland.

Acetonitril-d₃ 99,8 % atoma D, Deuterium oksid 99,9 % atoma D, Mravlja kiselina-d₂ 95 wt. % u D₂O, 98 % atoma D, Amonijak-d₄

deuterooksidni rastvor, 25 wt. % u D₂O, 99 % atoma D kupljeni su od Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany.

3.3.2 Aparatura i hromatografski uslovi

3.3.2.1 Semipreparativna HPLC metoda za RRT 0.42, RRT 0.46, RRT 0.81

Hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Zorbax Eclipse XDB semipreparativne kolone (1,8 µm particle size, 250 × 9,4mm id) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (0,64g/l Amonijum formijat pH= 8,5 sa NH₄OH) i mobilnom fazom B (acetonitrila) uz radnu temperaturu od 35°C i protok mobilne faze od 4,0 ml/min.

Gradijentni program:

t (min)	%A	%B
0	90,0	10,0
15	85,0	50,0
15,01	30,0	10,0
18	30,0	10,0

3.3.2.2 Semipreparativna HPLC metoda za nepoznatu nečistoću RRT 0.27

Hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Zorbax Eclipse XDB semipreparativne kolone (1,8 µm particle size, 250 × 9,4mm id) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (0,64g/l Amonijum formijat pH= 8,5 sa NH₄OH) i mobilnom fazom B (acetonitrila) uz radnu temperaturu od 35°C i protok mobilne faze od 4,0 ml/min.

U slučaju korišćenja mobilne faze sa deuterijumskim rastvaračima mobilna faza A pravljena je rastvaranjem 0,4875 g mravlje kiseline-d₂ u 1000 ml deuterium oksida i podešavanjem pH vrednosti na 8,5 sa Amonijak-d₄

deuterooksidnim rastvorm, 25 wt. %. Kao mobilna faza B korišćen je Acetonitril-d₃.

Gradijentni program:

t (min)	%A	%B
0	90,0	10,0
7,5	85,0	15,0
7,6	30,0	70,0
12	30,0	70,0
12,1	90,0	10,0
15	90,0	10,0

3.4 Korišćene LC/MS i LC/MS/MS metode

3.4.1 Reagensi i hemikalije

Sve korišćene hemikalije su bile p. a. ili HPLC čistoće. Acetonitril (gradient grade for HPLC), Metanol (gradient grade for HPLC) kupljeni su od Merck KgaA, Darmstadt, Germany. Amonijum formijat, p.a. kupljen od Fluka, Buchs, Switzerland.

3.4.2 Aparatura i hromatografski uslovi

3.4.2.1 LC-MS metoda za merenje tačnih molekulskih masa i LC-MS/MS metoda za ispitivanje puteva fragmentacije

Za obe metode (LC–MS i LC-MS/MS) hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HT kolone (1,8 µm particle size, 50 × 4,6 mm id) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (0,64g/l Amonijum formijat pH= 7,0 sa NH₄OH) i

mobilnom fazom B (smeša acetonitril:metanol 50:50) uz radnu temperaturu od 35°C i protok mobilne faze od 1,0 ml/min.

Korišćeni gradijentni program je bio:

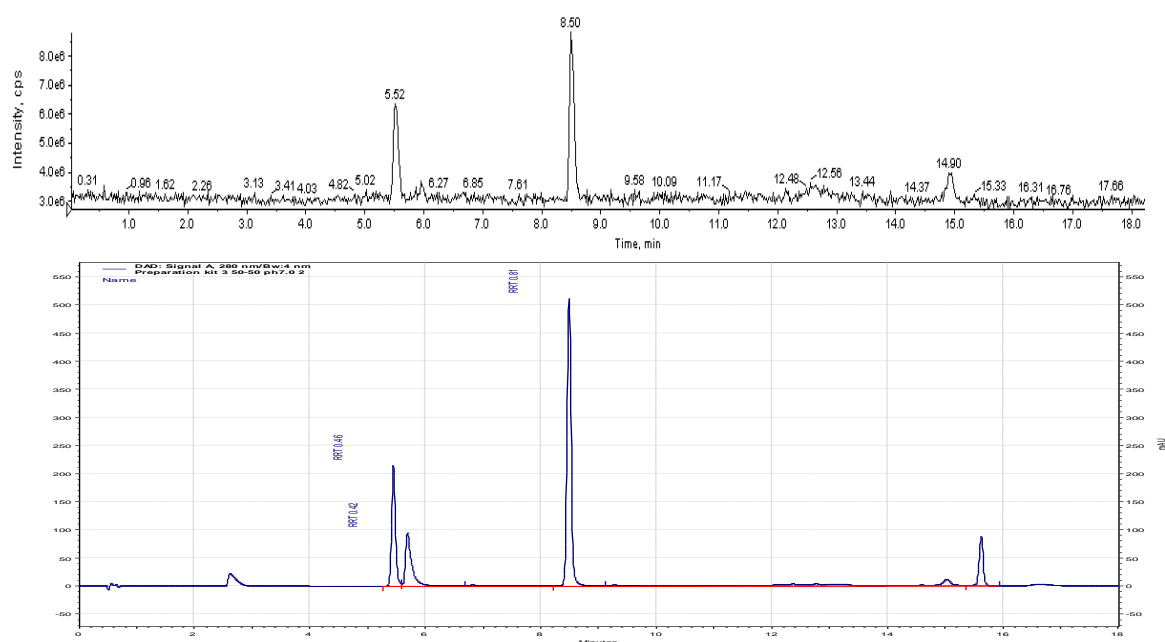
t (min)	%A	%B
0	90,0	10,0
15	50,0	50,0
15,01	90,0	10,0
18	90,0	10,0

Hromatogram rastvora u kome se odvijala reakcija 4-OH-omeprazol sulfida sa meta-hloroperoksibenzoevom kiselinom (mCPBA) prikazan je na Slici 3.1. U zasićen rastvor 4-OH-omeprazol sulfida u metanolu (oko 5 mg u 450 µl rastvarača) koji se nalazio u NMR kivetu dodata je ekvimolarna količina mCPBA. Na ovaj način su merene tačne molekulske mase 4-OH-omeprazol sulfoksida i 4-OH-omeprazol sulfona potrebne za njihovu identifikaciju.

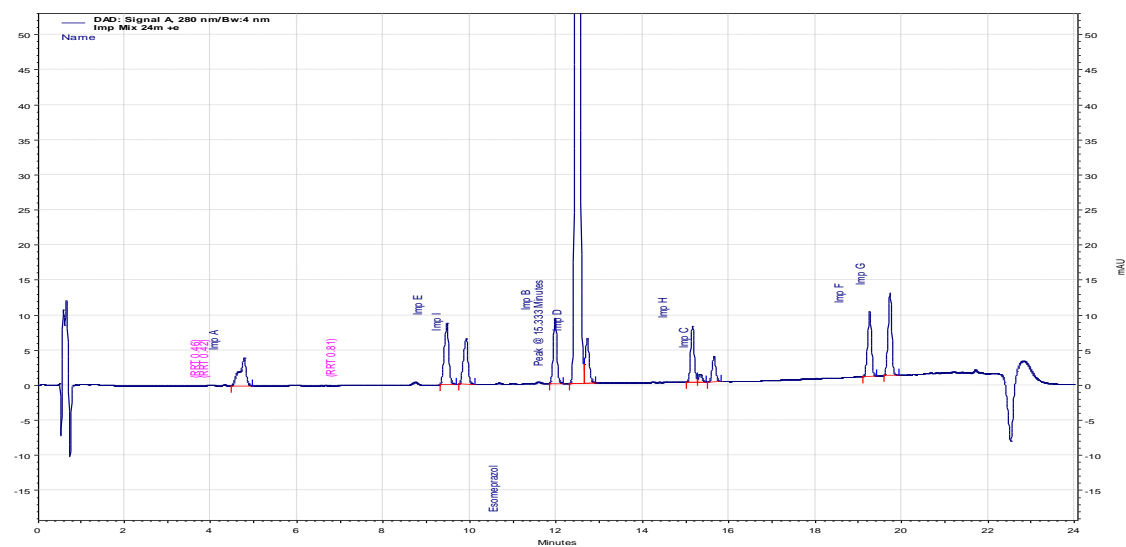
Hromatogrami koji se dobijaju ovom metodom kojom su merene tačne molekulske mase poznatih nečistioća esomeprazola dat je na Slici 3.2. Takođe, ova hromatografska metoda je korišćena u MS/MS eksperimentima u cilju ispitivanja puteva fragmentacije esomeprazola i njegovih nečistioća. Tečno-hromatografsko odvajanje je izvedeno na Acquity H-Class® UPLC sistemu (Waters Corporation, Milford, USA) opremljenim sa kvarternom pumpom. LC-ESI/APCI/QqQ snimanja rađena su na masenom spektrometru Xevo TQD (Waters, Milford, Massachusetts). ESI jonski izvor je bio na 150 °C sa desolvacionom temperaturom od 450°C, desolvacionim gasom (azot) pri protoku od 500 L/h i naponom kapilare postavljenim na 3.2 kV. Napon konusa je bio 50 V, za sve ispitivane analite. Argon je korišćen kao kolizioni

gas, i kolizijska energija je varirana od 12–55 eV zavisno od analita. Skeniranje fragmentiranih jona je primenjeno u pozitivnom modu (Q1 podešen na propuštanje samo odabranog molekularnog jona, SIM, CID kolizijska ćelija uključena, Q3 – skeniranje),

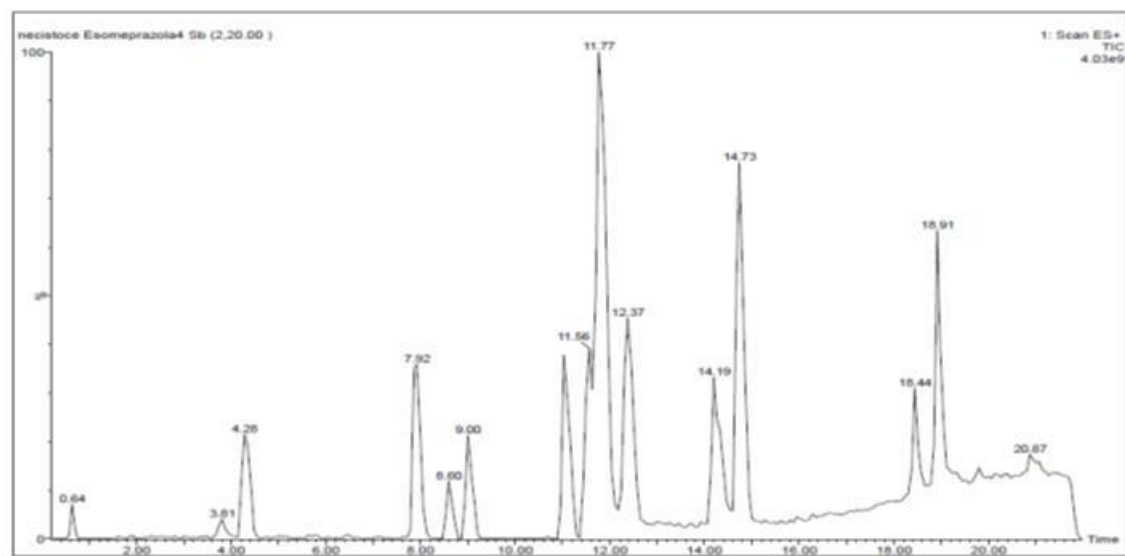
Uzorak koji je sadržavao smešu esomeprazola i njegovih nečistoća u koncentracionom nivou od oko 1 µg/ml za svaku komponentu je uveden u sistem nakon hromatografskog razdvajanja ispitivanih komponenti. ESI +ve jonizacioni sprektar svake od komponente pokazivao je protonovane molekulske jone (M+1). Fragmentacioni put molekularnih jona je praćen skeniranjem produkta jona nakon CID izazvane fragmentacije sa argonom kao nosećim gasom.



Slika 3.1 ESI/ToF MS (gore) i UV-Vis 280 nm (dole) hromatogrami reakcione smeše uz hromatografske uslove opisane LC/MS metode. Korišćeno za određivanje tačnih molekularnih težina nepoznatih razgradnih proizvoda RRT 0.42, RRT 0.46 kasnije identifikovanih kao 4-OH-omeprazol sulfoksid i 4-OH-omeprazol sulfon.



Slika 3.2 Hromatogram UV-Vis detekcijom na 280 nm uz hromatogramske uslove opisane LC/MS/MS metode. Korišćeno za određivanje tačnih molekulskih težina poznatih nečistoća.



Slika 3.3 Hromatogram ukupne jonske struje uz hromatogramske uslove opisane LC/MS/MS metode pri naponu konusa ESI izvora od 50V . Korišćeno za izdvajanje molekulskih jona i njihovu dalju fragmentaciju.

3.4.2.2 LC-MS metoda za merenje tačne molekulske mase nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0.27

Hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HT kolone (1,8 µm particle size, 50 × 4,6 mm id) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (0,64g/l Amonijum formijat pH= 8,5 sa NH₄OH) i mobilnom fazom B (acetonitrila) uz radnu temperaturu od 35°C i protok mobilne faze od 1,0 ml/min.

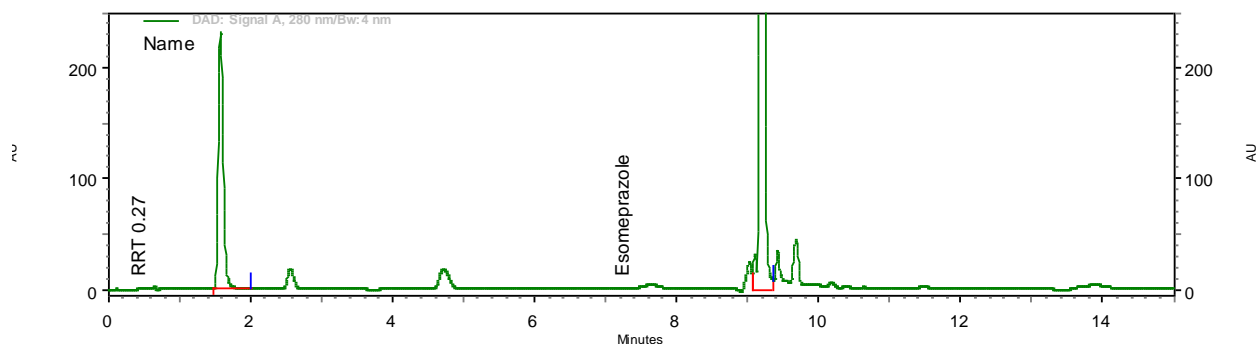
Korišćeni gradijentni program je bio:

t (min)	%A	%B
0	90,0	10,0
7,5	85,0	15,0
7,6	30,0	70,0
12	30,0	70,0
12,1	90,0	10,0
15	90,0	10,0

Hromatogram rastvora u kome su proizvodi razgradnje esomeprazola nastali u vodenom rastvoru koncentracije esomeprazola u koncentraciji 8 mg/ml podešena pH = 9,4 sa 0,5M HCl) tokom 12 sati na 50°C dat je na Slici 3.4.

LC-ESI/ToF snimanja su rađene na masenom spektrometru 6210 Time-of-Flight LC-MS system (Agilent Technologies) i u maseni spektrometar unošeni nakon hromatografskog razdvajanja korišćenjem Agilent Technologies 1200 Series HPLC instrumenta (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) sa binarnom pumpom, autosamplerom, kolonskim kompartmentom (sa Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonom) i DAD detektorom (spektralni opseg 190-450 nm) na

280nm. Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassHunter Workstation software.



Slika 3.4 Hromatogram UV-Vis detekcijom na 280 nm uz hromatogramske uslove opisane LC-MS metode. Nepoznata nečistoća RRT 0.27 esomeprazola na $t_r=1,65$ min.

LC-ESI/APCI/QqQ snimanja rađena su na masenom spektrometru Xevo TQD (Waters, Milford, Massachusetts) i u maseni spektrometar unošeni pomoću ACQUITY H-Class UPLC instrumenta (Waters, Milford, Massachusetts) sa kvaternarnom pumpom, autosamplerom, kolonskim kompartmentom (sa Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonom) i DAD detektorom (spektralni opseg 190 - 450 nm). Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassLynx Mass Spectrometry softver.

3.5 NMR spektroskopska merenja

NMR spektri (^1H , COSY, NOESY, HSQC i HMBC) su snimani na Bruker Avance III instrumentu sa 5mm BBO BB-1H probom na 500 MHz u u DMSO- d_6 (sem nečistoća F i G koje su rastvarane u CDCl_3 uz dodatak DMSO- d_6). HMBC eksperimenti su optimizovani za $^n\text{J}_{\text{CH}} = 8$ Hz and $^1\text{J}_{\text{CH}} = 145$ Hz. ^{13}C NMR spektri su snimani na istom instrumentu na 125 MHz. Korišćeni rastvarači za

svaku od ispitivanih komponenti su navedeni u odgovarajućim tabelama u delu 4.5.2.

3.6 UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektri esomeprazola i njegovih nečistoća snimani su na Agilent 8453 UV-Visible PDA spektrofotometru, vođenim *UV-Visible ChemStation* softverom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Ispitivane komponente su rastvarane u acetonitrilu (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) u koncentraciji oko 7 µg/ml. Korišćena spektrofotometrijska kvarcna kiveta omogućavala je optički put od 10mm i spektri snimani u opsegu 190-1100 nm. Kao blank rastvarač korišćen je čist acetonitril.

3.7 Statistička obrada rezultata

U ovom radu statistička obrada rezultata rađena je korišćenjem STATGRAPHICS 5, StatPoint Technologies Inc., Warrenton, USA i Excel, Microsoft softvera. In silico simulacija fragmentacionih puteva molekulskih jona ispitivanih jedinjenja rađena je korišćenjem softvera ACD/MS Fragmenter Version 10.08 Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, Ontario, Canada.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

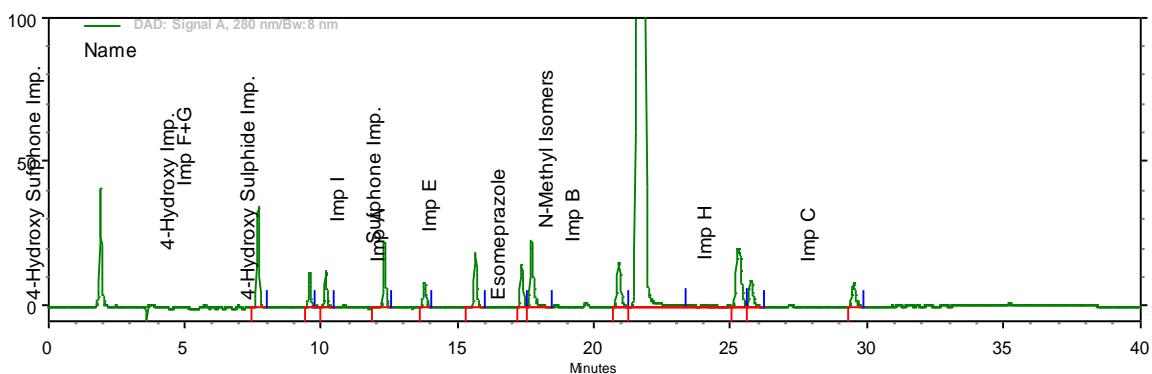
4.1 Razvoj i validacija RP-HPLC metode za određivanje srodnih supstanci esomeprazola

4.1.1 Razvoj metode

U preliminarnim eksperimentima sa kiselim mobilnim fazama primećena je vrlo brza razgradnja esomeprazola već u toku samog hromatografisanja. To je razumljivo jer esomeprazol, biva podvrgnut kiseloj razgradnji pri pH vrednostima manjim 8,5, a brzina razgradnje postaje značajno brža ispod pH 7,8 i sve je veća što je pH vrednost rastvora niža [134].

Kako su esomeprazol i većina njegovih srodnih supstanci slabo bazna jedinjenja, odabirana je pH mobilne faze takva da omogući njihovo najefikasnije razdvajanje. Na taj način, logičan izbor pH vrednosti mobilne faze bio je što viši pH, uz konačni odabir pH vrednosti 9,0, što odgovara gornjoj granici preporučenog pH opsega odabrane hromatografske kolone. U cilju dugotrajnosti hromatografske kolone odabran je najmanje agresivan glicinski pufer od svih koji su preporučeni za efikasno puferovanje u okolini ove pH vrednosti. Nakon preliminarnog širokog linearnog gradijentnog programa, uz korišćenje acetonitrila kao mobilne faze B, optimizovan je gradijentni program koji je omogućavao izvesno zadržavanje najpolarnijih komponenti i efikasno eluiranje najnepolarnijih nečistoća uz prihvatljivu selektivnost na ostale komponente. Finalna optimizacija gradijentnog programa je vršena uz mobilnu fazu B koja je bila smeša acetonitrila i metanola u odnosu 85:15, kojom je omogućeno dodatno poboljšanje razdvajanja kritičnog para pikova, pika 4- hidroksi omeprazol sulfida i pika omeprazol sulfona. Finalno optimizovana gradijentna metoda je omogućila potpuno razdvajanje svih komponenti od interesa u 40 minuta računajući tu i vreme potrebno za fazu ispiranja kolone i njenog ponovnog uravnotežavanja na početne uslove (Slika 4.1). Rastvarač za uzorke je odabran tako da omogući potpuno rastvaranje esomeprazola i

njegovih nečistoća i što veću stabilnost test rastvora (što viša pH vrednost, odabrana pH=11,0).



Slika 4.1 Hromatogram test rastvora sa dodatim svim poznatim nečistoćama (sa izuzetkom cikličnog sulfenamida): Nečistoća F+G 4-Hidroksi Ome Sulfon, , 4-Hidroksi Ome, Nečistoća I, Nečistoća. A, Nečistoća E, Ome Sulfon, 4-Hidroksi Ome Sulfid, Nečistoća B, N-Metil Ome, Nečistoća H i Nečistoća C u nivou oko 0.2%. Puna hemijska imena data su u Tabeli 3.1.

4.1.2 Validacija metode

Detaljna validacija metode je rađena u skladu sa ICH preporukama [135-137]. Validacijom je demonstrirana specifičnost, linearnost, tačnost, ponovljivost i preciznost, limiti detekcija i kvantifikacija, stabilnost korišćenih referentnih i test rastvora i robusnost metode] za sve relevantne nečistoće esomeprazola. Detaljni validacioni rezultati su prezentirani tabelarno.

4.1.2.1 Linearnost

Linearnost metode je potvrđena injektovanjem standardnih rastvora koji su bili u osam koncentraciona nivoa, u koncentracionom opsegu od 0,02 % - a 1,0 % za esomeprazola i deset njegovih nečistoća. Linearnost je uspostavljena linearnom regresionom analizom, na osnovu metode najmanjih kvadrata. Za površinu hromatografskih pikova u funkciji koncentracije svakog od analita na osnovu ove linearne regresione analize su izračunati statistički parametri

nagiba pravih, njihovih preseka sa y osom, rezidualne standardne devijacije i korelacioni koeficijenti. Dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 4.1

Tabela 4.1 Parametri linearne regresione analiuze: $y = ax+b$, gde je x koncentracija analita ($\mu\text{g/ml}$), y je površina hromatografskog pika (mAU s), R2 je kvadrat korelacionog koeficijenta; RRSD je rezidualna standardna devijacija ($S\Delta y/y, n-2$). RRF vrednosti uspostavljene kao odnos nagiba prave posmatrane nečistoće i esomeprazola.

	R2	Regresiona jednačina $y = b + ax$	Nagip mAU s ml/ μg	Odsečak (mAU s)	RRS D, (%)	RRF (/)
Eso.	0,999935	$y = 1454 + 62487x$	62487 ± 499	1454 ± 3311	0,98	$1,00 \pm 0,02$
Neč A	0,999815	$y = -1260 + 40470x$	40470 ± 543	-1260 ± 3727	1,65	$0,65 \pm 0,01$
Neč B	0,999926	$y = 2858 + 97112x$	97112 ± 826	2858 ± 5389	1,04	$1,55 \pm 0,03$
Neč C	0,999981	$y = 465 + 53892x$	53892 ± 234	465 ± 1587	0,53	$0,86 \pm 0,01$
Neč D	0,999961	$y = 814 + 60420x$	60420 ± 376	814 ± 2609	0,76	$0,97 \pm 0,01$
Neč E	0,999943	$y = 1529 + 90548x$	90548 ± 678	1529 ± 4628	0,92	$1,45 \pm 0,02$
Neč F	0,999429	$y = 5007 + 34549x$	34549 ± 805	5007 ± 5289	2,90	$0,55 \pm 0,02$
Neč H	0,999965	$y = 1076 + 70722x$	70722 ± 414	1076 ± 2410	0,72	$1,13 \pm 0,02$
Neč I	0,999979	$y = 669 + 95812x$	95812 ± 433	669 ± 2983	0,55	$1,53 \pm 0,02$
I*	0,999924	$y = 2398 + 116312x$	116312 ± 1000	2398 ± 6757	1,06	$1,86 \pm 0,03$
II**	0,999967	$y = 1082 + 60120x$	60120 ± 344	1082 ± 2255	0,70	$0,96 \pm 0,01$

*I = 4-Hidroksi omeprazol sulfid, **II = N-Metil Omeprazol

Za ovu seriju standradnih smeša esomeprazola i njegovih nečistoća u različitim koncentraciom nivoima je pokazana linearnost u celom ispitivanom koncentracionom opsegu. Površine pikova se pokoravaju jednačinama oblika $y = ax + b$, gde je b presek sa y osom nije bio statistički značajno različit od nule u limitima pouzdanosti od 95 %. Kvadrat korelacionog koeficijenta (R2) je bio u svim slučajevima ne manje od 0,99994. Na osnovu odnosa nagiba dobijenih pravih za ispitivane nečistoće i esomeprazol utvrđeni su relativni faktori

odgovora (prikazani u Tabeli 3.1) čija upotreba omogućava tačnu kvantifikaciju nečistoća bez dalje upotrebe njihovih referentnih standarda.

4.1.2.2 Limiti detekcije i kvantifikacije.

Za procenu koncentracionih nivoa limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) svakog od analita pravljen je standardni rastvor sa svim analitima u nivou od tačno oko 0,05 % od koncentracijeesomeprazola u test rastvoru (0, 8 µg/ml u odnosu na 1,6 mg/ml). Ovaj standadni rastvor je injektovan u hromatografski sistem, i LOD i LOQ vrednosti su procenjene na osnovu odnosa signala (visine hromatografskih pikova) i šuma bazne linije hromatograma. LOD i LOQ vrednosti odgovaraju koncentraciji analita koji daje signal 3, odnosno 10 puta viši od nivoa šuma, Tabela 4.2

Tabela 4.2 Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ)

Komponenta	C (ug/ml)	s/n ratio 6 sigma	LoQ (ug/ml)	LoD (ug/ml)
Esomeprazol	0,7887	27,9	0,283	0,085
Neč A	0,8147	37,9	0,215	0,064
Neč B	0,7745	42,1	0,184	0,055
Neč C	0,8068	39,1	0,206	0,062
Neč D	0,8247	59,7	0,138	0,041
Neč E	0,8112	97,8	0,083	0,025
Neč F	0,7806	30,2	0,258	0,078
Neč H	0,6925	67,6	0,102	0,031
Neč I	0,8195	118,9	0,069	0,021
4-Hidroksi omeprazol	0,8016	104,4	0,077	0,023
N-Metil Omeprazol	0,7801	42,7	0,183	0,055

4.1.2.3 Preciznost metode

Ponovljivost metode (preciznost metode) je ispitana analiziranjem šest test rastvora (esomeprazol u koncentracionom nivou 1600 ug/ml), koji su opterećeni nečistoćama u nivou od 0,15 % (oko 2,4 ug/ml) na koncentraciju esomeprazola u test rastvoru. Rezultati, srednje vrednosti i izračunate relativne standardne devijacije date su Tabeli 4.3 .

Tabela 4.3 Rezultati ispitivanja preciznosti metode

	C (ug/ml)									
	Neč A	Neč B	Neč C	Neč D	Neč E	Neč F	Neč H	Neč I	I	II
1	2,59	2,44	2,50	2,70	2,53	2,73	2,16	2,54	2,46	3,84
2	2,56	2,45	2,45	2,80	2,513	2,66	2,07	2,53	2,44	3,81
3	2,59	2,46	2,52	2,70	2,53	2,64	2,07	2,53	2,40	3,81
4	2,55	2,44	2,52	2,99	2,54	2,81	2,07	2,54	2,43	3,81
5	2,58	2,45	2,50	2,67	2,52	2,72	2,04	2,55	2,39	3,83
6	2,54	2,43	2,51	2,81	2,50	2,77	2,16	2,525	2,44	3,81
Av.	2,57	2,44	2,51	2,78	2,52	2,72	2,10	2,54	2,43	3,82
RSD%	0,81	0,44	0,33	4,23	0,48	2,33	2,61	0,29	1,16	0,36

*I = 4-Hidroksi omeprazol sulfid, II = N-Metil Omeprazol

4.1.2.4 Tačnost metode

Tačnost metode je utvrđena rikaveri eksperimentom, dodavanjem i potom određivanjem ove poznate količine analita. Rikaveri vrednosti određene su na osnovu analize uzoraka koji su opterećeni svakim od analita u tri različita poznata koncentraciona nivoa (tačno oko 0,10, 0,15 i 0,20 %) koji su pripremljeni svaki u triplicatu. Dobijene rikaveri vrednosti, srednje vrednosti i odgovarajuće relativne standardne devijacije za svaki od ova tri nivoa date su u Tabeli 4.4

4.1.2.5 Stabilnost rastvora

Poredbeni rastvor je čuvan pod različitim uslovima (sobna temperatura i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti) i svaki od rastvora kvantifikovan u odnosu na sveže napravljeni poredbeni rastvor. Kao što se vidi iz Tabele 4.5 koncentracijaesomeprazola je u ± 2 % od početne koncentracije pri svim uslovima čuvanja pa je izveden zaključak je da se poredbeni rastvor može koristiti na sobnoj temperaturi u toku dva dana. Test rastvor je čuvan pod različitim uslovima (sobna temperatura i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti) i za svaki od test rastvora su kvantifikovane prisutne nečistoćeesomeprazola.

Tabela 4.4 Rezultati ispitivanja tačnosti metode

		Neč A	Neč B	Neč C	Neč D	Neč E	Neč F	Neč H	Neč I	*I	II
		% recovery									
Level 0,1%	1	102,8	105,0	103,6	101,9	104,0	100,3	107,7	103,4	11,08	103,4
	2	103,7	106,0	104,3	106,7	103,1	99,7	110,2	103,5	107,9	101,8
	3	105,7	103,9	102,4	97,2	103,2	99,0	99,2	103,0	100,6	98,9
	Average	104,1	105,0	103,4	101,9	103,4	99,7	105,7	103,3	106,8	101,4
	%RSD	1,43	1,00	0,93	4,66	0,48	0,65	6,05	0,28	5,33	2,25
Level 0,15 %	1	105,9	104,1	103,4	101,7	102,9	108,7	104,2	103,2	101,8	102,6
	2	104,6	104,6	103,3	105,5	103,9	105,8	99,7	103,0	100,5	101,1
	3	106,0	105,0	104,1	101,6	103,8	105,0	99,5	103,1	102,2	102,6
	Average	105,5	104,6	103,6	102,9	103,5	106,5	101,1	103,1	101,5	102,1
	%RSD	0,74	0,43	0,42	2,16	0,53	1,83	2,63	0,10	0,88	0,85
Level 0,2 %	1	103,7	102,6	102,4	99,1	102,7	95,3	101,7	101,8	98,9	102,4
	2	102,8	104,0	102,2	100,2	102,5	107,3	103,7	102,2	101,7	108,1
	3	103,0	102,9	102,4	100,2	102,5	101,2	98,3	102,1	100,3	102,3
	Average	103,2	103,2	102,3	99,8	102,6	101,3	101,2	102,0	100,3	104,3
	%RSD	0,46	0,71	0,11	0,64	0,11	5,93	2,70	0,20	1,40	3,18

*I = 4-Hidroksi omeprazol sulfid, II = N-Metil Omeprazol

Tabela 4.5 Stabilnost poredbenog rastvora pri različitim uslovima čuvanja

Vreme čuvanja	Uslovi čuvanja	Zaštićeno od svetlosti		Izloženo svetlosti	
		+4°C	+22°C	+4°C	+22°C
Sveže napravljen	Površina pika	/	/	/	196 633
	%	/	/	/	100,0
6 sati	Površina pika	197 980	196 702	198 266	194 687
	%	100,7	100,0	100,8	99,0
12 sati	Površina pika	200 147	195 544	196 169	193 339
	%	101,8	99,5	99,8	98,3
1 dan	Površina pika	199 982	198 106	198 329	192 673
	%	101,7	100,7	100,9	98,0
2 dana	Površina pika	200 797	199 190	197 849	193 377
	%	102,1	101,3	100,6	98,3

Tabela 4.6 Stabilnost test rastvora pri različitim uslovima čuvanja

Vreme čuvanja	Uslovi čuvanja	Zaštićeno od svetlosti		Izloženo svetlosti	
		+4°C	+22°C	+4°C	+22°C
Sveže napravljen	4-Hidroksi ome. sulfon	/	/	(%) /	0,06
	4-Hidroksi omeprazol	/	/	/	0,30
1 sat	4-Hidroksi ome. sulfon	0,06	0,10	0,07	0,10
	4-Hidroksi omeprazol	0,29	0,21	0,29	0,22
2 sata	4-Hidroksi ome. sulfon	0,07	0,13	0,08	0,13
	4-Hidroksi omeprazol	0,28	0,14	0,28	0,14
3 sata	4-Hidroksi ome. sulfon	0,08	0,15	0,09	0,14
	4-Hidroksi omeprazol	0,27	0,11	0,27	0,13

Kao što je prikazano u Tabeli 4.6 glavna razlika u profilu nečistoća svežeg test rastvora u odnosu na one koji su čuvani pod različitim uslovima jeste prelazak 4-Hidroksi omeprazola, jednog od glavnih degradacionih proizvodaesomeprazola u čvrstom stanju, u 4-Hidroksi omeprazol sulfon. Na osnovu ovih merenja izveden je zaključak da je najbolje hromatografski analizirati sveže pripremljeni test rastvor. U slučaju nemogućnosti injektovanja sveže pripremljenog test rastvora isti se može injektovati najviše nakon jednog sata pod uslovom daje čuvan u frižideru na +4°C.

4.1.3 Robusnost metode

Robusnost neke analitičke metode mera je njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u parametrima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode koju možemo da očekujemo tokom njene rutinske primene. U cilju ispitivanja robusnosti metode, da bi se ispitaio njihov uticaj na odgovore hromatografskog sistema, odabrani su određeni parametara metode, kao što su: talasna dužina detektora, temeprtarura hromatografske kolone, protok mobilne faze, pH pufera mobilne faze, količina glicerina u puferu mobilne faze i procenti organskog dela mobilne faze na početku i kraju gradijenta. Uz korišćenje statističkog softvera *STATGRAPHICS®Plus Version 5.1* kreiran je Plackett-Burman eksperiment dizajn N=12, pružajući neophodni broj kombinacija odabranih eksperimentalnih faktora. Variranjem ovih faktora u dva nivoa, nižem i višem u odnosu na propisane vrednosti, pri njihovim različitim kombinacijama ispitivan je njihov uticaj na odgovor hromatografskog sistema, Tabela 4.7 . Za potrebe kasnije analize eksperiment dizajna, uveden je i određeni broj „dummy“, imaginarnih faktora koji se takođe variraju u dva nivoa, ali nemaju nikakvo fizičko značenje.

U hromatograski sistem, podešen na hromatografske uslove koji su pedviđeni eksperiment dizajnom (dvanaest kombinacija plus dva eksperimenta pri nominalnim uslovima) injektovani su test rastvor spajkovan omeprazol

sulfonom, 4-hidoksi omeprazol sulfidom i N-metil omeprazolom, svaki u nivou od 0.3% u odnosu na koncentraciju esomeprazola i poredbeni rastvor. Uz variranje ovih hromatografskih parametara, praćeni su odgovori hromatografskih sistema kroz relevantne hromatografske parametre (retenciona vremena hromatografskih pikova i rezolucije između njih) i kvanitifikovane nečistoće esomeprazola. Rezultati su prezentirani u Tabeli 4.8

Tabela 4.7 Korišćeni Plackett-Burman eksperiment dizajn N=12 za ispitivanje robustnosti metode.

	λ [nm]	Temp [°C]	Protok [ml/min]	Glici n [g]	p H [μ]	Gradijent početak [%]	Gradije nt kraj [%]	Dummy 1 [μ]	Dummy 2 [μ]
Exp 1	280	35,0	1,0	3,0	9,0	12,0	68,0	0,0	0,0
Exp 2	282	32,0	1,1	2,7	8,8	10,0	70,0	1,0	1,0
Exp 3	282	38,0	0,9	3,3	8,8	10,0	66,0	1,0	1,0
Exp 4	278	38,0	1,1	2,7	9,2	10,0	66,0	-1,0	1,0
Exp 5	282	32,0	1,1	3,3	8,8	14,0	66,0	-1,0	-1,0
Exp 6	282	38,0	0,9	3,3	9,2	10,0	70,0	-1,0	-1,0
Exp 7	282	38,0	1,1	2,7	9,2	14,0	66,0	1,0	-1,0
Exp 8	278	38,0	1,1	3,3	8,8	14,0	70,0	-1,0	1,0
Exp 9	278	32,0	1,1	3,3	9,2	10,0	70,0	1,0	-1,0
Exp 10	278	32,0	0,9	3,3	9,2	14,0	66,0	1,0	1,0
Exp 11	282	32,0	0,9	2,7	9,2	14,0	70,0	-1,0	1,0
Exp 12	278	38,0	0,9	2,7	8,8	14,0	70,0	1,0	-1,0
Exp 13	278	32,0	0,9	2,7	8,8	10,0	66,0	-1,0	-1,0
Exp 14	280	35,0	1,0	3,0	9,0	12,0	68,0	0,0	0,0

Prepoznavanje statistički značajnih efekta za svaki od ispitivanih hromatografskih parametara metode vršeno je korišćenjem grafičke prezentacije "Pareto Chart" i "Half-Normal Probability Plot" nakon obrade rezultata u STATGRAPHICS®Plus softveru. U Tabela 4.9 su prezentirani rezultati te statističke analize kojom se izdvajaju statistički značajni uticaji promene ispitivnih hromatografskih parametara na odgovore hromatografskog sistema.

Tabela 4.8 Odgovori hromatografskih sistema, vrednosti određenih koncentracija ispitivanih supstanci, rezolucije između njihovih hromatografskih pikova i odgovarajuća retenciona vremena.

	Ome sulfon [%]	4-OH ome. sulfid [%]	N-Methyl ome. [%]	Rez 1-2 [/]	Rez 2-3 [/]	Rez 3-4 [/]	Rt Ome. sulfon [min]	Rt 4-OH ome. sulfid [min]	Rt Esome. [min]	Rt N-Methyl ome. [min]
Exp 1	0,296	0,296	0,289	3,32	14,58	11,81	16,72	17,53	21,27	25,06
Exp 2	0,296	0,293	0,294	-1,82	14,38	9,68	17,95	17,51	21,53	24,46
Exp 3	0,291	0,299	0,293	-5,02	13,73	9,75	20,75	19,55	24,21	27,33
Exp 4	0,285	0,306	0,298	6,07	13,68	13,21	16,15	17,58	21,02	25,31
Exp 5	0,296	0,302	0,301	-3,80	15,54	10,59	17,17	16,28	20,90	24,20
Exp 6	0,291	0,302	0,258	4,01	14,39	9,95	17,82	18,72	22,11	26,11
Exp 7	0,290	0,288	0,296	7,00	13,50	14,10	14,33	15,97	19,37	23,97
Exp 8	0,287	0,312	0,301	-4,66	15,12	10,39	16,45	16,45	19,89	22,93
Exp 9	0,292	0,298	0,301	6,12	13,15	15,09	16,14	17,41	20,33	24,50
Exp 10	0,290	0,303	0,296	6,69	13,27	15,45	16,37	17,93	21,26	26,13
Exp 11	0,288	0,301	0,294	7,95	11,58	14,02	15,42	17,33	20,36	24,95
Exp 12	0,280	0,297	0,301	-2,80	13,79	9,29	17,87	17,13	21,63	24,75
Exp 13	0,281	0,299	0,302	-2,24	13,84	9,50	20,41	19,83	24,23	27,40
Exp 14	0,294	0,297	0,294	3,39	14,53	11,70	16,65	17,48	21,23	25,00

Res 1-2 je rezolucija između hromatografskih pikova Omeprazol sulfona i 4-Hidroksi omeprazole sulfida; Res 2-3 je rezolucija između hromatografskih pikova 4-Hidroksi omeprazol sulfida i esomeprazole; Res 3-4 rezolucija između hromatografskih pikova esomeprazole and N-methyl omeprazole; Rt OMP sulfon, Rt 4-OH OMP sulfid, Rt Esomeprazole and Rt N-Methyl OMP su retenciona vremena Omeprazol sulfona i 4-Hidroksi omeprazole sulfida, esomeprazole i N-methyl omeprazole.

Tabela 4.9 Izdvojeni statistički značajni efekti (pozitivni ili negativni) ispitivanih hromatografskih parametara na odgovore hromatografskog sistema.

	Ome. sulfon [%]	4-OH ome. sulfid [%]	N-Methyl ome. [%]	Rez 1-2 [/]	Rez 2-3 [/]	Rez 3-4 [/]	Rt OMP sulfon [/]	Rt 4-OH ome. sulfid [/]	Rt Esomep. [/]	Rt N-Methyl om [/]
Talasna dužina	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Temp.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Protok	/	/	/	/	/	/	N	N	N	N
Konc. glicina	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
pH	/	/	/	P*	N*	P	N	N	N	N
Gradijent početak	/	/	/	/	/	/	N	N	N	N
Gradijent kraj	/	/	/	/	/	/	/	/	N	N
Dummy 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Dummy 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Res 1-2 = rezolucija između omeprazol sulfona i 4-hidroksi omeprazol sulfida; Res 2-3 = rezolucija između 4-hidroksi omeprazol sulfida and esomeprazola; Res 3-4 = rezolucija između esomeprazola i N-methyl omeprazola; Rt Ome. sulfon, Rt 4-OH ome. sulfid, Rt Esomeprazol, Rt N-Methyl ome su retencionna vremena omeprazol sulfona i 4-hidroksi omeprazol sulfida esomeprazola i N-methyl omeprazola. *, "P" znači da povećanje određenog hromatografskog parametra utiče na povećanje vrednosti posmatranog odgovora sistema. **, "N" znači da povećanje određenog hromatografskog parametra utiče na smanjenje vrednosti posmatranog odgovora sistema

Dodatno, budući da je mešani parametar i kao takav nije mogao biti ispitan kroz eksperiment dizajn, zasebno je ispitivana uticaj udela acetonitrila i metanola u organskom delu mobilne faze (mobilna faza B). Rezultati su prezentirani u Tabeli 4.10.

Tabela 4.10 Uticaj sastava organskog dela mobilne faze na odabrane odgovore hromatogramskog sistema

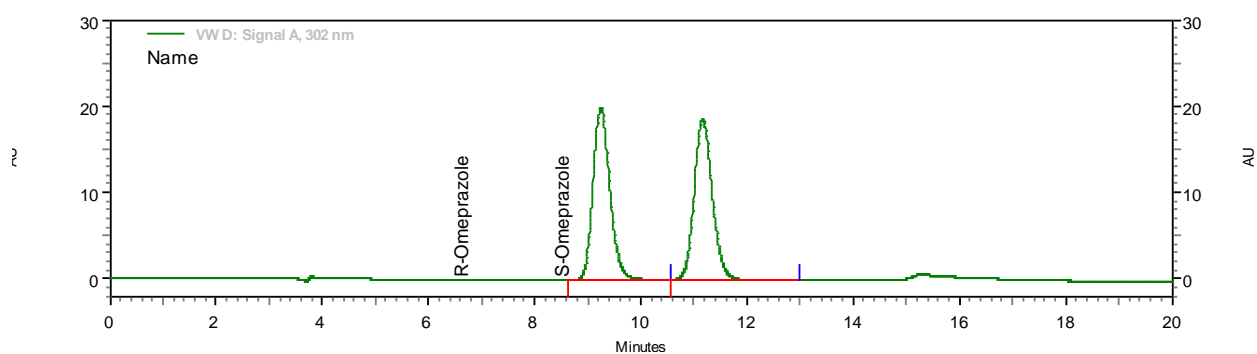
	Ome. sulfon [%]	4-OH OMP sulfid [%]	N- Methyl OMP [%]	Rez 1-2 [']	Rez 2-3 [']	Rez 3-4 [']	Rt OMP sulfon [min]	Rt 4- OH OMP sulfid [min]	Rt Esomeprazol [min]	Rt N- Methyl OMP [min]
AcN:MeOH /83:17	0.305	0.302	0.296	2.95	14.55	11.64	16.63	17.35	21.06	24.75
AcN:MeOH /85:15	0.294	0.297	0.294	3.39	14.53	11.70	16.65	17.48	21.23	25.00
AcN:MeOH /87:13	0.298	0.302	0.289	2.93	13.64	10.21	17.11	17.83	21.81	25.45

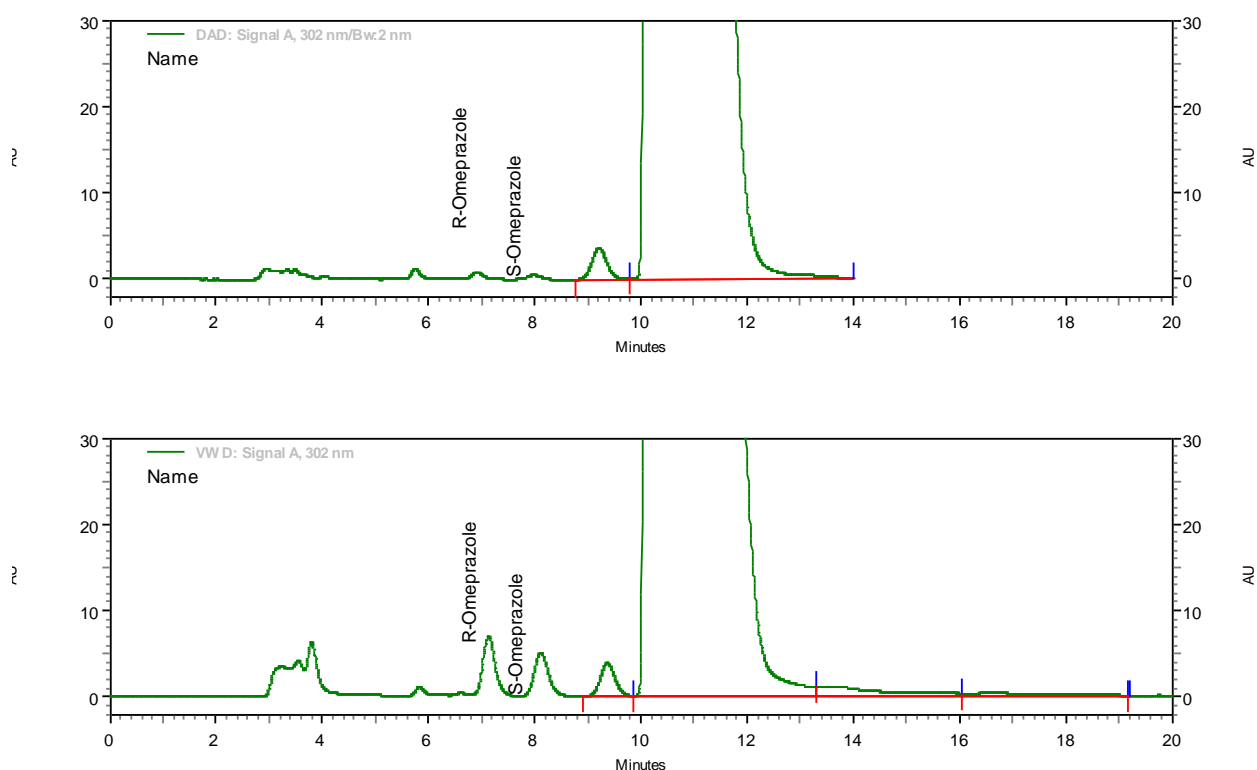
Na osnovu ovih ispitivanja može se izvući generalni zaključak da pH pufera mobilne faze ima glavni uticaj na hromatografsko ponašanje, tako da, najviše pažnje treba posvetiti kontroli ovog hromatografskog parametra. Kritična rezolucija nije manja od 1,5 (granica za potpuno odvajanje pikova) u nijednom od eksperimenata, garantujući zadovoljavajuće odvajanje pikova u variranoj oblasti parametara. Takođe, nema statistički značajnih efekata na kvantifikaciju nečistoća esomeprazola, ukazujući na to da je ispitivana hromatografska metoda zadovoljavajuće robusna.

4.2 Razvoj i validacija RP-HPLC hiralno selektivne metode

4.2.1 Razvoj metode

Razvijena je hiralno selektivna HPLC metoda u reverzno-faznom modu razdvajanja što predstavlja retki izuzetak u velikom broju ranije publikovanih normalno faznih HPLC metoda korišćenih u ovoj problematici. Korišćena kolona predstavlja najnoviju generaciju hiralno selektivnih kolona gde se α 1-acid glikoprotein (AGP) vezan za 5,0 μ m silika sverne čestice koristi kao hiralni selektor. Kovalentno vezan glikoprotein za površinu hemijski stabilnih čestica silike omogućuje njenu hemijsku kompatibilnost sa vodenim mobilnim fazama. Dakle, njena glavna prednost u odnosu na kolone starije generacije jeste mogućnost u razdvajanju enantiomera u reverzno faznom modu, uz željenu stabilnost kolone u vodenim mobilnim fazama. Hromatografsko razdvajanje je optimizovano tako da sem zadovoljavajućeg odvajanja pika (R)-omeprazole od znatno većeg pika esomeprazole (koji je u 500 puta većoj koncentraciji), postoji zadovoljavajuće odvajanje i od drugih razgradnih proizvoda esomeprazole. Karakteristični hromatogrami, rastvora za ispitivanje pogodnosti sistema, netretiranog i tretiranog uzorka esomeprazol natrijuma dati su na Slici 4.2.





Slika 4.2 Hromatogrami dobijeni RP-HPLC hiralno selektivnom metodom: rastvor za ispitivanje pogodnosti sistema (gore); test rastvora netetiranog uzorka (sredina); test rastvora termalno tretiranog uzorka (dole).

4.2.2 Validacija metode

Validacija metode je rađena u skladu sa preporukama iz ICH vodiča [135-137]. Validacijom je demonstrirana specifičnost, linearnost, tačnost, ponovljivost i preciznost, limiti detekcija i kvantifikacija, i robusnost metode za (R)-omeprazol. Detaljni validacioni rezultati su prezentirani tabelarno.

4.2.2.1 Linearnost.

Linearnost metode je potvrđena injektovanjem rastvora koji su bili u osam koncentraciona nivoa, u koncentracionom opsegu od 0,02 % - a 1,0 % za R-omeprazol i S-omeprazol. Linearnost je uspostavljena linearnom regresionom analizom, na osnovu metode najmanjih kvadrata. Za površinu hromatografskih pikova u funkciji koncentracije svakog od analita na osnovu

ove linearne regresione analize su izračunati statistički parametri nagiba pravih, njihovih preseka sa y osom, rezidualne standardne devijacije i korelacioni koeficijenti. Dobijene vrednosti su prikazane u Tabela 4.11

Tabela 4.11 Parametri linearne regresione analize: $y = ax+b$, gde je x koncentracija analita (ug/ml), y je površina hromatografskog pika (mAU s), R² je kvadrat korelacionog koeficijenta; RRSD je rezidualna standardna devijacija ($S\Delta y/y$, n-2). RRF vrednosti uspostavljene kao odnos nagiba prave posmatrane nečistoće i esomeprazola.

<i>Komponenta</i>	<i>Jednačina:</i>	<i>R²</i>
(R)-omeprazol	$y = -3223 + 122663x$	0,99997
(S)-omeprazol	$y = 707 + 126349x$	0,99997

Za seriju standardnih smeša R-omeprazol i S-omeprazola u različitim koncentracijom nivoima je pokazana linearnost u celom ispitivanom koncentracionom opsegu. Površine pikova se pokoravaju jednačinama oblika $y = ax + b$, gde je b presek sa y osom nije bio statistički značajno različit od nule u limitima pouzdanosti od 95 %. Kvadrat korelacionog koeficijenta (R²) je bio u svim slučajevima ne manji od 0,99997.

4.2.2.2 Limiti detekcije i kvantifikacije.

Za procenu koncentracionih nivoa limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) za R-omeprazol pravljen je standardni rastvor R-omeprazol u nivou od tačno oko 0,10 % od koncentracije esomeprazola u test rastvoru (0.64 µg/ml u odnosu na 640 µg/ml). Ovaj standardni rastvor je injektovan u hromatografski sistem, i LOD i LOQ vrednosti su procenjene na osnovu odnosa signala (visine hromatografskih pikova) i šuma bazne linije hromatograma. LOD i LOQ vrednosti odgovaraju koncentraciji R-omeprazola koji daje signal 3, odnosno 10 puta viši od nivoa šuma, Tabela 4.12

Tabela 4.12 Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) za R-omeprazol

Komponenta:	c (ug/ml)	s/n odnos	LoQ (ug/ml)	LoD (ug/ml)
R-omeprazol	0,64	70,0	0,091	0,027

4.2.2.3 Tačnost metode

Tačnost metode je utvrđena rikaveri eksperimentom dodavanjem i određivanjem poznate količine R-omeprazola. Rikaveri vrednosti odedene su na osnovu analize uzoraka S-omeprazola koji su spajkovani R-omeprazolom u pet različitih koncentracionih nivoa (tačno oko 0,03, 0,10, 0,30, 0,50 i 0,70 %) koji su pripremljeni svaki u triplikatu. Opterećenje rastvora analitima, određene koncentracije analita, dobijene rikaveri vrednosti, srednje vrednosti i odgovarajuće relativne standardne devijacije za svaki od ova tri nivoa date su u Tabeli 4.13

4.2.2.4 Preciznost.

Preciznost metode je ispitivana kao ponovljivost metode (u toku dana) i rigidnost (u toku različitih dana) analiziranjem šest test rastvora (S-omeprazol u koncentracionom nivou 640 ug/ml), koji su opterećeni R-omeprazolom u nivou od oko 0,20% (oko 1,28 ug/ml) na koncentraciju S-omeprazola u test rastvoru. Stepen ponovljivosti metode, poznat kao rigidnost je dobijena analizom istog broja uzoraka (kao za ponovljivost) ali u toku drugog dana, korišćenjem hromatografske kolone druge serije od strane drugog analitičara. Rezultati, srednje vrednosti i izračunate relativne standardne devijacije date su u Tabeli 4.14 .

Tabela 4.13 Rezultati ispitivanja tačnosti metode.

Određivanje br.	Nivo (aroksim, %)	Odmereno esome. (mg/50 ml)	Dodato R-ome. (µg/50 ml)	Određeno R-ome. (µg/50 ml)	Rikaveri (%)
1	0,03	34,32	16,48	17,02	103,3
2	0,03	34,03	16,48	17,30	105,0
3	0,03	34,00	16,48	16,71	101,4
4	0,10	34,06	37,57	37,63	100,2
5	0,10	34,27	37,57	37,91	100,9
6	0,10	34,20	37,57	38,13	101,5
7	0,30	34,25	97,83	95,95	98,1
8	0,30	34,17	97,83	95,79	97,9
9	0,30	33,99	97,83	95,34	97,5
10	0,50	34,34	158,1	154,0	97,4
11	0,50	34,19	158,1	154,7	97,8
12	0,50	34,11	158,1	153,0	96,8
13	0,70	34,07	218,3	213,3	97,7
14	0,70	33,73	218,3	212,8	97,5
15	0,70	34,18	218,3	216,6	99,2
Srednja vrednost (%)					99,47
RSD (%)					2,47

Tabela 4.14 Rezultati ispitivanja preciznosti metode

Određivanje br,	1, dan	2, dan	
1	0,200	0,194	
2	0,197	0,191	
3	0,195	0,192	
4	0,195	0,192	
5	0,194	0,191	
6	0,193	0,201	ukupno
Srednja vrednost (%)	0,196	0,194	0,195
RSD (%)	1,3	2,0	2,5

4.2.2.5 Stabilnost rastvora.

Test i poredbeni rastvori čuvani su pod različitim uslovima (sobna temperatura i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti) i u pogodnim

vremenskim intervalima je kvantifikovan prisutni (R)-omeprazol. Rezultati prikazani u tabelama 4.15 i 4.16. Iako je primećena pojava sekundarnih pikova, selektivnost metode nije njima ugrožena i moguće je hromatografski analizirati test rastvor čuvan nakon dva dana na sobnoj temperaturi. Usled prisutne razgradnje esomeprazola poredbeni rastvor može čuvati zaštićen od svetlosti najduže jedan dan.

Tabela 4.15 Stabilnost test rastvora pri različitim uslovima čuvanja. U tabeli su date rezultati za kvantifikovani (R)-omeprazol u odnosu na sveže pripremljeni poredbeni rastvor

Vreme čuvanja	Uslovi čuvanja	Zaštićeno od svetlosti		Izloženo svetlosti	
		+4°C	+22°C	+4°C	+22°C
(%)					
Sveži		/	/	/	0,200
1 dan		0,196	0,197	0,202	0,207
2 dan		0,194	0,195	0,197	0,208

Tabela 4.16 Stabilnost poredbenog rastvora pri različitim uslovima čuvanja. U tabeli su date rezultati za kvantifikovani esomeprazol u odnosu na sveže pripremljeni poredbeni rastvor

Vreme čuvanja	Uslovi čuvanja	Zaštićeno od svetlosti		Izloženo svetlosti	
		+4°C	+22°C	+4°C	+22°C
(%)					
Sveži		/	/	/	100,0
1 dan		99,8	99,9	100,3	97,1
2 dan		98,8	97,5	97,1	94,5

4.2.3 Robusnost metode

U cilju ispitivanja robusnosti metode, da bi se ispitao njihov uticaj na odgovore hromatografskog sistema, odabrani su sledeći hromatografski parametri: talasna dužina detektora, temperatura hromatografske kolone, protok mobilne faze, pH pufera mobilne faze, količina natrijum dihidrogen

sulfata u puferu mobilne faze i procenat metanola u mobilnoj fazi. Uz korišćenje statističkog softvera *STATGRAPHICS®Plus* Version 5.1 kreiran je Plackett-Burman eksperiment dizajn N=12, pružajući neophodni broj kombinacija odabranih eksperimentalnih faktora. Variranjem ovih faktora u dva nivoa, nižem i višem u odnosu na propisane vrednosti, pri njihovim različitim kombinacijama ispitivan je njihov uticaj na odgovor hromatografskog sistema, Tabela 4.17 . Za potrebe kasnije analize eksperiment dizajna, uveden je i određeni broj „lažnih“, imaginarnih faktora (D1, D2 i D3) koji se takođe variraju u dva nivoa, ali nemaju nikakvo fizičko značenje.

Tabela 4.17 Korišćeni Plackett-Burman eksperiment dizajn N=12 za ispitivanje robustnosti hiralno selektivne RP-HPLC metode.

	Talasna dužina (nm)	Temp, (°C)	Protok (ml/min)	MeOH	pH	Pufer (%)	D 1	D 2	D 3
Exp 1	302	25	0,40	25	6,00	2,730	0	0	0
Exp 2	300	24	0,44	26	6,10	2,630	1	1	-1
Exp 3	300	26	0,44	26	5,90	2,830	1	-1	1
Exp 4	304	24	0,36	24	6,10	2,830	1	-1	1
Exp 5	300	26	0,36	24	5,90	2,830	1	1	-1
Exp 6	304	26	0,36	26	6,10	2,630	1	-1	-1
Exp 7	300	26	0,44	24	6,10	2,630	-1	-1	1
Exp 8	304	24	0,44	24	5,90	2,630	1	1	1
Exp 9	304	26	0,44	24	6,10	2,830	-1	1	-1
Exp 10	304	24	0,44	26	5,90	2,830	-1	-1	-1
Exp 11	300	24	0,36	24	5,90	2,630	-1	-1	-1
Exp 12	304	26	0,36	26	5,90	2,630	-1	1	1
Exp 13	300	24	0,36	26	6,01	2,830	-1	1	1
Exp 14	302	25	0,40	25	6,00	2,730	0	0	0

U hromatograski sistem, podešen na hromatografske uslove koji su predviđeni eksperiment dizajnom (N=12 plus dva eksperimenta pri nominalnim uslovima) injektovani su test rastvor S-omeprazola spajkovani R-omeprazolom u nivou od 0,15% u odnosu na koncentraciju esomeprazola i limit rastvor na

osnovu koga je kvantifikovan R-omeprazol. Uz variranje ovih hromatografskih parametara, praćeni su odgovori hromatografskih sistema kroz relevantne hromatografske parametre (retenciona vremena hromatografskih pikova i rezolucije između njih) i kvantifikovan R-omeprazol. Rezultati su prezentirani u Tabeli 4.18

Tabela 4.18 Odgovori hromatografskog sistema, vrednosti određenih koncentracija ispitivanih supstanci, rezolucije između njihovih hromatografskih pikova i odgovarajuća retenciona vremena.

	(R)- Omeprazol [%]	(R)-(S)- Omeprazol rezolucija [/]	Retenciono vreme (R)- Omeprazol [min]	Retenciono vreme (S)- Omeprazol [min]	Površina pika (R)- Omeprazol	Površina pika (S)- Omeprazol
Exp 1	0,160	3,555	9,547	11,980	1038607	1048595
Exp 2	0,161	3,190	8,360	10,320	940809	948769
Exp 3	0,159	3,032	7,867	9,527	941464	946612
Exp 4	0,160	4,249	12,300	16,000	1108741	1128180
Exp 5	0,163	3,959	11,280	12,773	1131314	1139674
Exp 6	0,159	3,284	9,707	11,800	1131799	1142230
Exp 7	0,159	3,749	9,533	12,207	933262	935099
Exp 8	0,161	3,827	9,920	12,833	916586	922203
Exp 9	0,155	3,788	9,560	12,287	908289	927760
Exp 10	0,157	3,179	8,293	10,220	927120	933376
Exp 11	0,165	4,103	12,067	15,580	1131650	1141637
Exp 12	0,160	3,205	9,560	11,547	1132839	1139980
Exp 13	0,155	4,244	12,287	15,973	1130292	1145797
Exp 14	0,156	3,602	9,753	12,247	1023828	1041788

Prepoznavanje statistički zanačajnih efekta za svaki od ispitivanih hromatografskih parametara metode vršeno je korišćenjem grafičke prezentacije "Pareto Chart" i "Half-Normal Probability Plot" nakon obrade

rezultata u STATGRAPHICS®Plus softveru. U Tabeli 4.19 su prezentirani rezultati pokazujući uticaj promene ispitivnih hromatografskih parametara na odgovore hromatografskog sistema.

Tabela 4.19 Izdvojeni statistički značajni efekti (pozitivni ili negativni) ispitivanih hromatografskih parametara na odgovore hromatografskog sistema.

	(R)- Omeprazo I [%]	(R)-(S)- Omeprazo I rezolucija [/]	Retencion o vreme (R)- Omeprazo I [min]	Retencion o vreme (S)- Omeprazo I [min]	Površina pika (R)- Omeprazo I	Površina pika (S)- Omeprazo I
Talasna dužina	/	/	/	/	N	N
Temp.	/	N	N	N	/	/
Protok	/	N	N	N	N	N
MeOH	/	N	N	N	P	P
pH	/	/	/	/	/	/
Konc. pufer.	/	/	/	/	/	/
Dummy 1	/	/	/	/	/	/
Dummy 2	/	/	/	/	/	/
Dummy 3	/	/	/	/	/	/

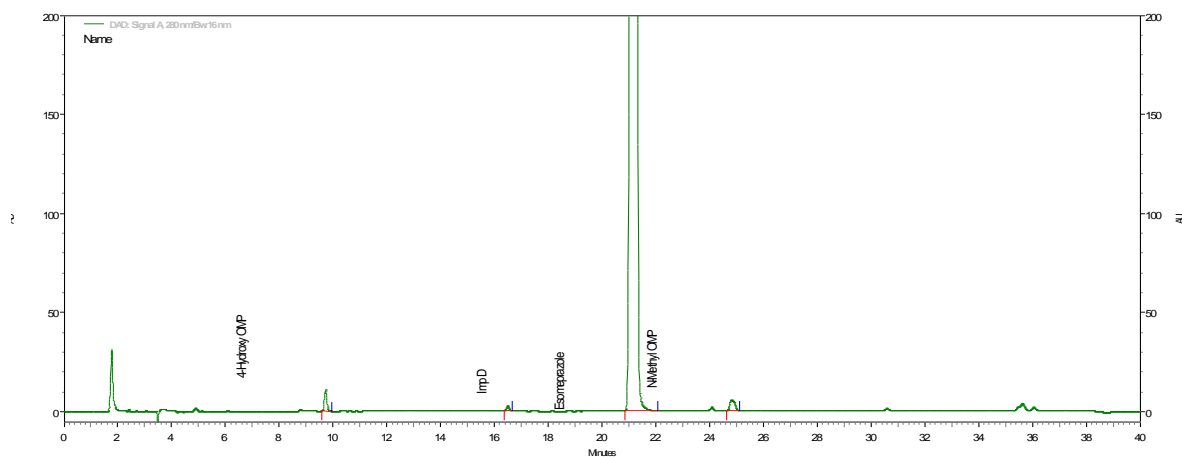
„P” znači da povećanje određenog hromatografskog parametra utiče na povećanje vrednosti posmatranog odgovora sistema.

„N” znači da povećanje određenog hromatografskog parametra utiče na smanjenje vrednosti posmatranog odgovora sistema

Generalni zaključak je da procenat metanola u mobilnoj fazi (jedini ispitivani, statistički značajni parametara koji zavisi od operatera) ima glavni uticaj na hromatografsko ponašanje. Kritična rezolucija nije manja od 3,0 u nijednom od eksperimenata, garantujući zadovoljavajuće odvajanje pikova u ispitivanoj oblasti hromatografskih parametara. Takođe, nema statistički značajnih efekata na kvantifikaciju R-omeprazola, ukazujući na to da je ispitivana hromatografska metoda zadovoljavajuće robusna za ovu namenu.

4.3 Degradacioni proizvodi esomeprazola pri različitim uslovima forsirane degradacije

Studija forsirane degradacije izvedena je u cilju ispitivanja suštinske stabilnosti esomeprazola tj. prepoznavanja mogućih puteva degradacije leka i identifikacije potencijalnih degradacionih proizvoda, kao i u cilju potvrđivanja specifičnosti korišćene hromatografske metode. Koristeći mogućnost hromatografskog softvera za proveru spektrohemijske čistoće hromatografskih pikova, čistoća pika esomeprazola je proveravana za svaki od primenjenih načina razgradnje. Zadovoljavajuće vrednosti za čistoću pika esomeprazola ukazuju na postojanje homogenog pika, bez koeluirajućih pikova, čime je uspostavljen dokaz za potpunu selektivnost metode (rezultati prikazani u Tabeli 4.20). Stepenn međusobnog odvajanja ostalih pikova, koji su poredivih visina, a koji potiču od nečistoća i razgradnih proizvoda, moguće je bilo utvrditi vizuelnim pregledom hromatograma. Za rezultate pogledati priložene hromatograme Slike 4.3 - 4.9. Pikovi koji nisu integraljeni su poreklom iz korišćenih reagenasa.

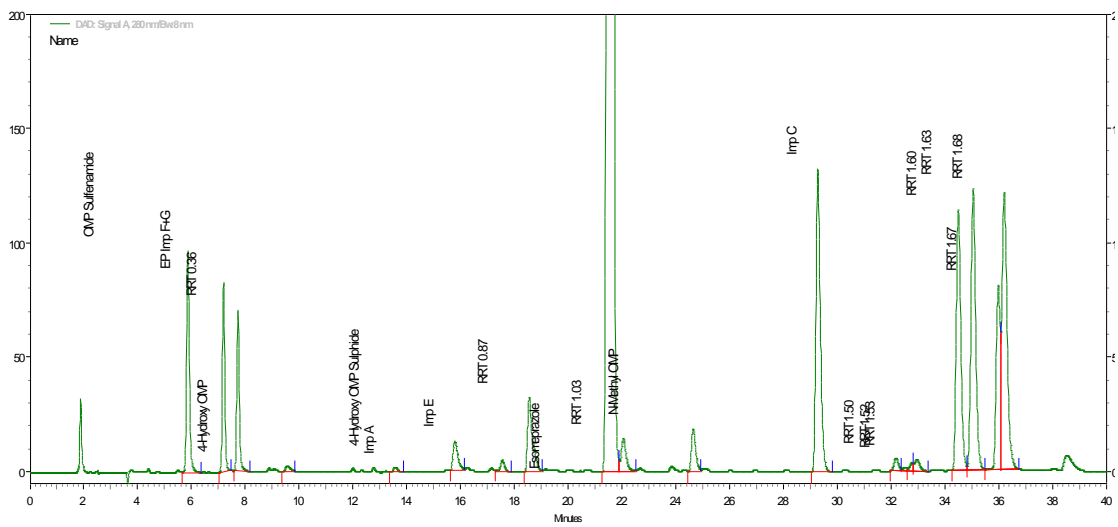


Slika 4.3 Netretirani uzorak esomeprazol natrijuma i inicijalno prisutne razgradne supstance 4-Hidroksi omeprazol, Ome. sulfon (Neč. D) i N-metil omeprazol su u nivoima nižim od 0.1% u odnosu na esomeprazol.

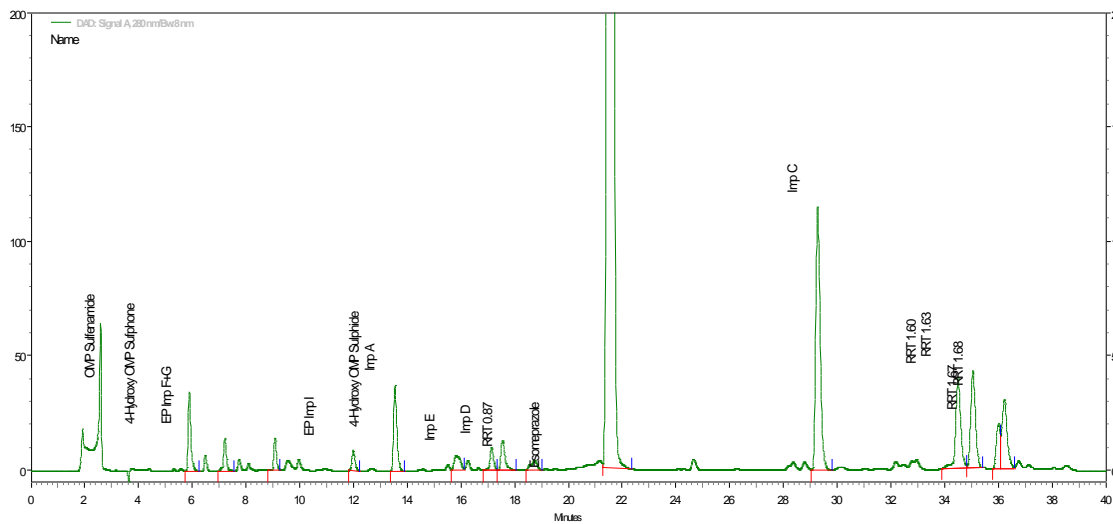
Tabela 4.20 Načini forsirane razgradnje, stepen postignute degradacije esomeprazola i čistoća glavnog pika na hromatogramu.

Način degradacije	Uslovi razgradnje	Udeo u površinama za pik esomeprazola [%]	esomeprazol pik	
			„purity threshold“	„peak Purity“
Kontrolni uzorak	Bez tretiranja	99,7	0,990000	1,000000
Kisela razgradnja	2ml 0,1M HCl, 22°C, 4min	80,8	0,990000	1,000000
Bazna razgradnja	2ml 5M NaOH, 80°C, 90min	89,6	0,990000	1,000000
Oksidacija	1% H ₂ O ₂ , 5ml, 80°C, 5 min	98,7	0,990000	1,000000
Termalna degradacija	120 °C, 24 sata	87,5	0,990000	1,000000
Fotoliza	Uv-Vis 200 Wh /m ² (ICH)	95,5	0,990000	1,000000

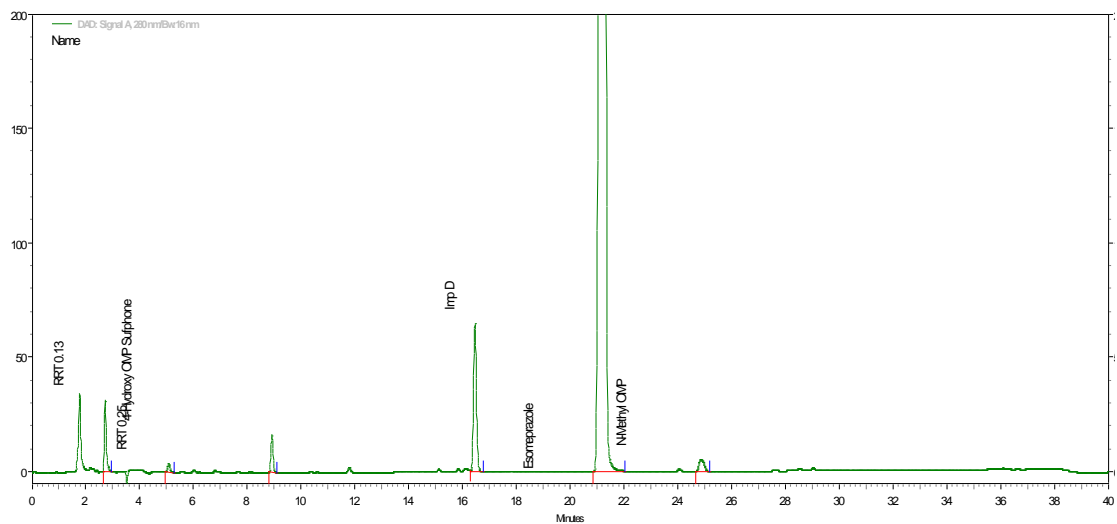
Test supstanaca: Esomeprazol Natrijum



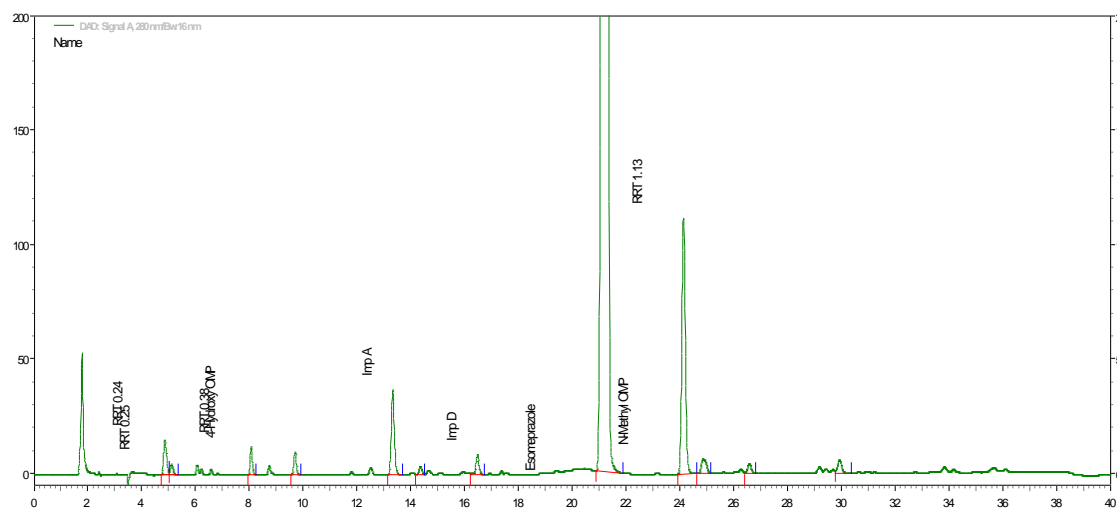
Slika 4.4 Degradacioni proizvodi dobijeni razgradnjom esomeprazole izloženom uslovima kisele hidrolize navedenim u poglavlju 3.1.3



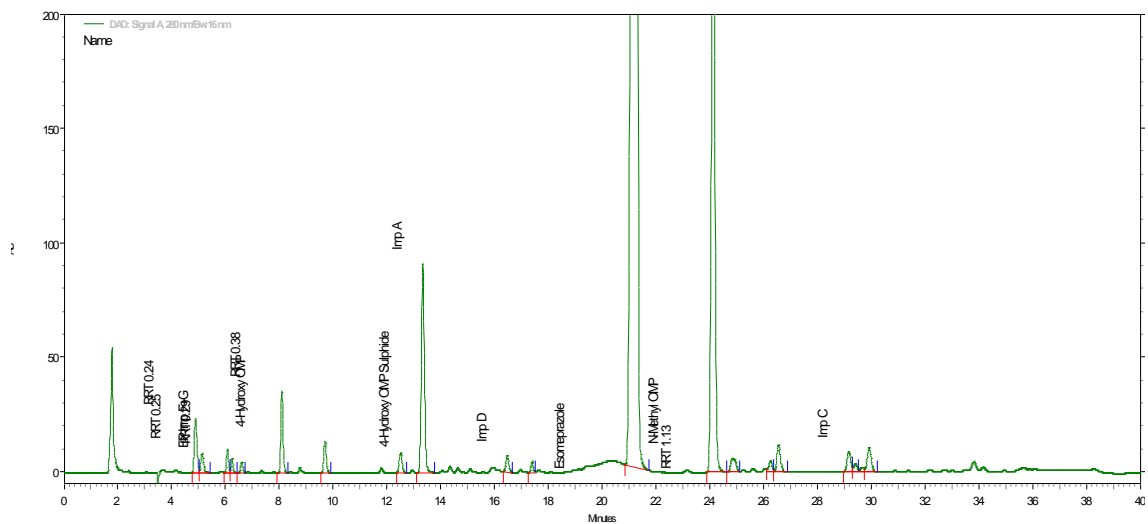
Slika 4.5 Degradacioni proizvodi dobijeni razgradnjom esomeprazole izloženom uslovima bazne hidrolize navedenim u poglavlju 3.1.3



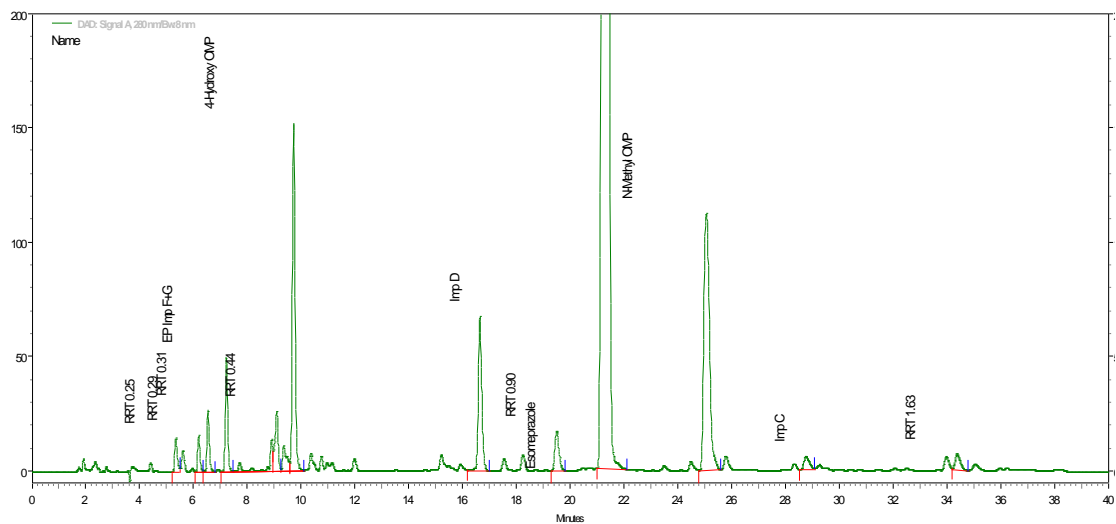
Slika 4.6 Hromatogram rastvora esomeprazola u kome je on podvrgnut uslovima oksidativne degradacije navedenim u poglavlju 3.1.3.



Slika 4.7 Hromatogram rastvora esomeprazola u kome je on podvrgnut uslovima fotodegradacije (Uv-Vis 200 Wh /m2 14 dana).



Slika 4.8 Hromatogram rastvora esomeprazola u kome je on podvrgnut uslovima fotodegradacije (Uv-Vis 200 Wh /m² 42 dana).



Slika 4.9 Hromatogram esomeprazole natrijuma koji je u čvrstom stanju podvrgnut uslovima termalne razgradnje (24h na 110°C).

4.4 Studije stabilnosti i glavni razgradni proizvodi

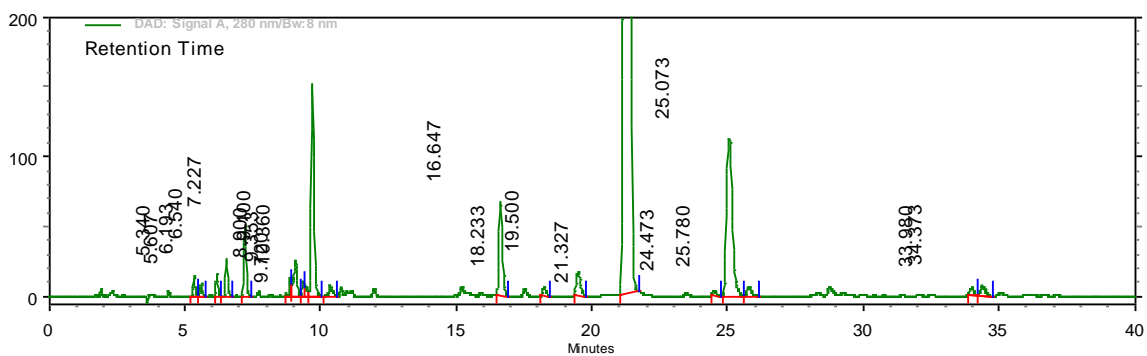
4.4.1 Glavni degradacioni proizvodi čvrstog esomeprazol natrijuma

Esomeprazol natrijum u čvrstom stanju je izlagan 24 sata termalnom tretiranju na 110 °C, (izložen vazduhu, grejna ploča) i kondicionirana na 25 °C, 30 °C i 40 °C tokom 24 meseci držanjem u komore za ispitivanje stabilnosti. Analize uzoraka iz komora su rađene u pogodnim vremenskim intervalima (u nultom trenutku, nakon 1., 3., 6., 12., 24. 36. meseca). Rezultati su prikazani u Tabelama 4.21, 4.22 i 4.23.

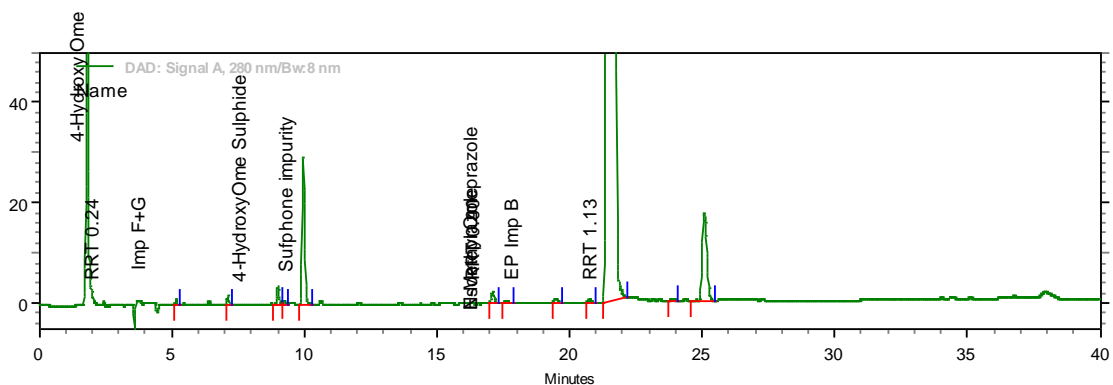
Hromatografski profil nečistoća dobijen opisanom RP-HPLC metodom ukazivao je na pojavu i porast tri glavna razgradna proizvoda sa relativnim retencionim vremenima RRT 0.46, RRT 0.81 i RRT 1.16, i, (Slika 4.10 i 4.11). Ovi degradacioni proizvodi kasnije su identifikovani kao 4-hidroksi omeprazol, omeprazol sulfon i N-metil omeprazol.

Iz studije ispitivanja stabilnosti bilo je očigledno da 4-hidroksi omeprazol i N-metil omeprazol nastaju istom brzinom. Brzina njihovog nastajanja je jedino zavisna od temperature na kojoj je tretiran uzorak. Izvesno je da su 4-hidroksi omeprazol i N-metil omeprazol proizvodi intermolekulske reakcije između dva molekula esomeprazola, u kojoj se sa metoksi grupe iz pozicije 4 vrši metilacija jednog od dva imidazolskih N atoma. Oba N-metil omeprazol izomera nastaju podjednakom verovatnoćom čime se objašnjava karakterističan izgled hromatografskog pika na RRT 1.16 kao dva pika koja su međusobno jednaka i nedovoljno razdvojena, Slika 4.12.

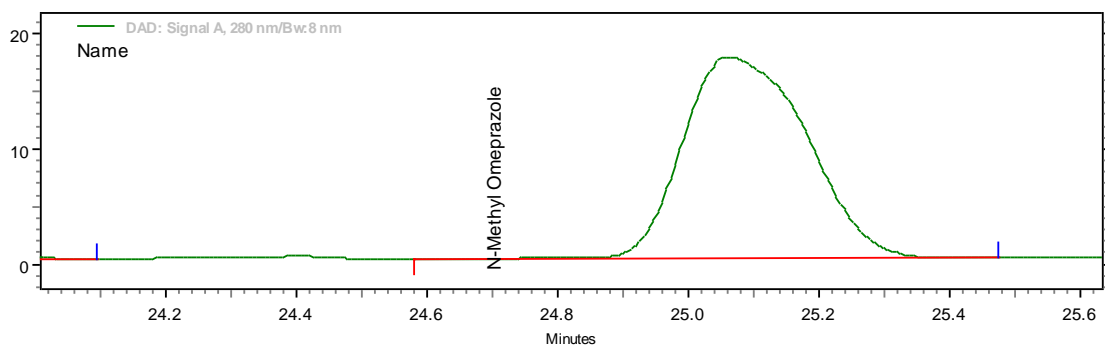
Između drugih degradacionih proizvoda može se izdvojiti kao značajan u studijama stabilnosti pri normalnim uslovima čuvanja (do 30°C) jeste Omeprazol sulfon (Neč. D) koji se javlja i kao glavni razgradni proizvod koji nastaje oksidacijom esomeprazola (Slika 4.13).



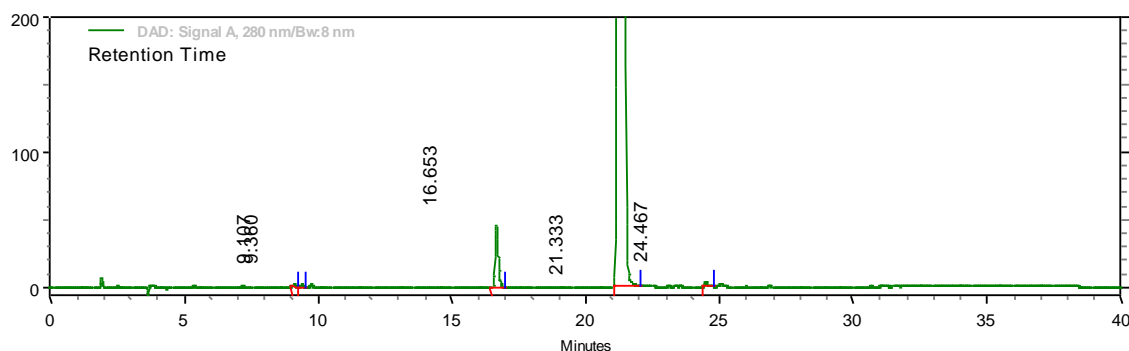
Slika 4.10 Termalna degradacijaesomeprazol natrijuma (120°C, 24 h). Glavni degradacioni proizvodi na RRT 0.46, RRT 0.81 i RRT 1.16 (na tr= 9,720, 16,647 i 25,073 min) kasnije identifikovani kao kao 4-Hidroksi Omeprazol, Omeprazol sulfon i N-Metil Omeprazol.



Slika 4.11 Esomeprazol Natrijum u čvrstom stanju nakon termalnog tretiranja 24 meseca na 30°C. Glavni degradacioni proizvodi na RRT 0.46, RRT 0.81 i RRT 1.16 identifikovani kao 4-Hidroksi Omeprazol , Omeprazol sulfon i N-Metil Omeprazol.



Slika 4.12 Hromatografski pik koji potiče od međusobno nedovoljno odvojenih izomera 1-N-Metil i 3-N-Metil omeprazola



Slika 4.13 Oksidativna degradacijaesomeprazol natrijuma (42,5 mg esomeprazol natrijuma+ 5ml 1% H₂O₂, 80°C, 5 min). Glavni degradacioni proizvod na RRT 0.78 (na tr= 16,647 min) kasnije identifikovan kao Omeprazol sulfon.

Tabela 4.21 Porast nečistoćaesomeprazol natrijuma u raznim vremenskim intervalima u toku 36 meseci kondicioniranja na T=25 °C, zaštićeno od svetlosti

T=25 °C	Vreme kondicioniranja (meseci)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
	(%)							
4-Hidroksi esomeprazol	0,06	0,16	0,20	0,22	0,26	0,28	0,31	0,40
N-metil omeprazol	0,08	0,18	0,21	0,25	0,26	0,28	0,35	0,44
4-Hidroksi omeprazol sulfid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	0,01	0,01	0,01
4-Hidroksi omeprazol sulfon	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	0,03	0,02
Neč. D	0,01	0,02	0,06	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
Neč. F	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
Najveća nepoznata nečistoća	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
Ukupne nečistoće	0,18	0,40	0,51	0,56	0,62	0,76	0,79	0,98
(R)-omeprazol	0,20	0,20	0,18	0,19	0,19	0,20	0,20	0,19

Tabela 4.22 Porast nečistoća esomeprazol natrijuma u raznim vremenskim intervalima u toku 36 meseci kondicioniranja na T=30 °C, zaštićeno od svetlosti

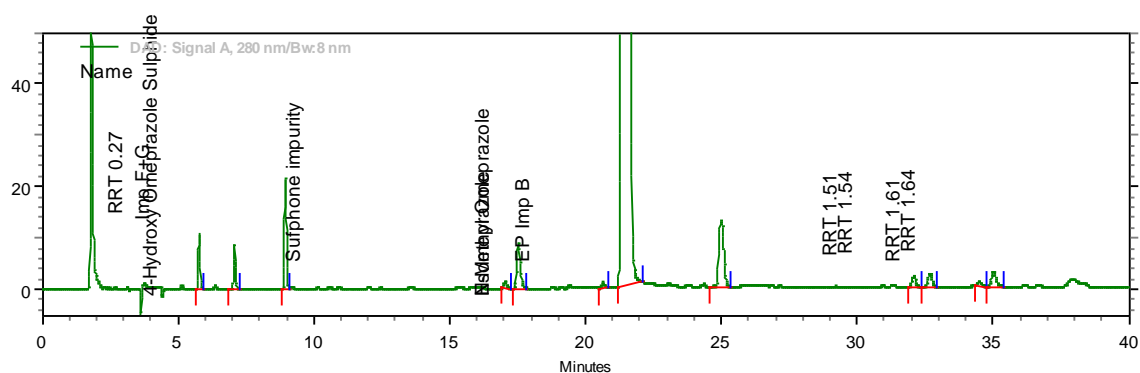
T=30 °C	Vreme kondicioniranja (meseci)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
	(%)							
4-Hidroksi esomeprazol	0,06	0,23	0,25	0,28	0,33	0,37	0,43	0,61
N-metil omeprazol	0,08	0,22	0,25	0,32	0,35	0,37	0,47	0,64
4-Hidroksi	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4-Hidroksi omeprazol sulfon	0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,06	0,06	0,05
Neč. D	0,01	0,04	0,03	0,04	0,05	0,07	0,10	0,14
Neč. F	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
Najveća nepoznata nečistoća	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ukupne nečistoće	0,18	0,53	0,57	0,71	0,81	0,91	1,10	1,48
(R)-omeprazol	0,20	0,20	0,19	0,19	0,20	0,21	0,20	0,20

Tabela 4.23 Porast nečistoća esomeprazol natrijuma u raznim vremenskim intervalima u toku 36 meseci kondicioniranja na T=40 °C, zaštićeno od svetlosti

T=40 °C	Vreme kondicioniranja (meseci)				
	0	1	2	3	6
	(%)				
4-Hidroksi esomeprazol	0,06	0,22	0,33	0,40	0,48
N-metil omeprazol	0,08	0,23	0,30	0,37	0,47
4-Hidroksi omeprazol sulfid	n.d.	n.d.	0,01	0,01	0,02
4-Hidroksi omeprazol sulfon	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03
Neč. D	0,01	0,04	0,05	0,06	0,08
Neč. F	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
Najveća nepoznata nečistoća	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ukupne nečistoće	0,18	0,53	0,73	0,89	1,11
(R)-omeprazol	0,20	0,19	0,20	0,21	0,20

4.4.2 Glavni degradacioni proizvodi esomeprazol natrijuma u vodenom rastvoru „viših“ koncentracija

Na netretiranim i termalno tretiranim uzorcima esomeprazol natrijuma rađena je njegova kompatibilnost sa fiziološkim rastvorom (8 mg/ml, što odgovara dozi pri administraciji injekcija) praćenjem promene hromatografskog profila njegovih nečistoća. Uočeno je da eventualno prisutni 4-hidroksi omeprazol, koji je degradacioni proizvod koji nastaje iz čvrstog stanja esomeprazol natrijuma, nestaje i prelazi u druga dva degradaciona proizvoda, kojima odgovaraju hromatografski pikovi na relativnim retencionim vremenima RRT 0.42 i RRT 0.81 (Tabela 4.24). Ovi degradacioni proizvodi su u NMR/LC-MS studijama identifikacije identifikovani su kao 4-hidroksi omeprazol sulfid, 4-hidroksi omeprazol sulfon (Slika 4.14).



Slika 4.14 Esomeprazol u koncentraciji 8 mg/ml i njegovi razgradni proizvodi iz vodenog rastvora pH= 10.4 nakon 12h. U odnosu na profil nečistoća esomeprazole u čvrstom stanju (na Slika 4.11) , koji je korišćen za pravljenje rastvora uočljiva je transformacija komponente RRT 0.46 (4-Hidroksi Ome.) u RRT 0.42 (4-Hidroksi Ome. Sulfid) i RRT 0.81 (4-Hidroksi Ome. Sulfon). Takođe, uočena pojava nepoznate RRT 0.27.

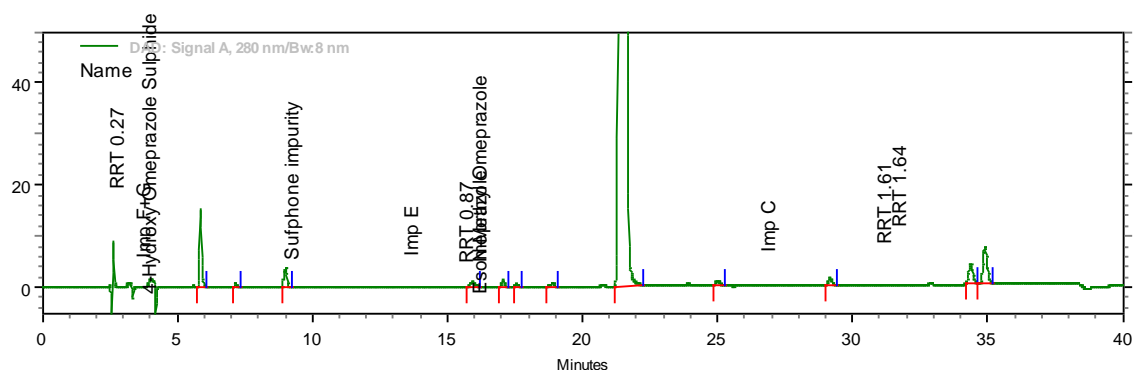
Tabela 4.24 Promena profila nečistoćaesomeprazol natrijuma tretiranog 6 meseci T=40 °C 12 sati po rastvaranju u vodenom rastvoru konc. 8mg/ml

Ispitivana supstanca/ rastvor	Čvrsti esomepr. Na	Rastvor te supstance 8mg/ml
Vreme kondicioniranja	6 meseci na T=40 °C	12 sati na T=30 °C
	(%)	
4-Hidroksi esomeprazol	0,43	n.d
N-metil omeprazol	0,51	0,51
4-Hidroksi omeprazol sulfid	0,02	0,21
4-Hidroksi omeprazol sulfon	0,01	0,32
RRT 0.27	n.d	0,12
RRT 0.51	n.d	0,05
RRT 0.54	n.d	0,06
RRT 0.61	n.d	0,04
RRT 0.64	n.d	0,07
Ukupne nečistoće	1,13	1,63
(R)-omeprazol	0,20	0,19

4.4.3 Glavni degradacioni proizvodi esomeprazol natrijuma u vodenom rastvoru „nižih“ koncentracija

Na netretiranim uzorcima esomeprazol natrijuma praćena je promena hromatografskog profila njegovih nečistoća pravljenjem vodenih rastvora različitih koncentracija (0,2, 0,4, 0,8 i 1,6 mg/ml, pH vrednosti ovih rastvora bile su 9,3, 9,6, 9,7 i 9,9) koja se dešava u toku 12h (Tabela 4.25). pH vrednost ispitivanih rastvora, koja je posledica bazne reakcije esomeprazola, uslovljavala je stepen razlaganja esomeprazola. Što je niža koncentracij esomeprazola, i pH rastvora je niža, a na nižim pH vrednostima dolazi do brže razgradnje esomprazola (rezultati u Tabeli 4.25 . Bitna promena u odnosu na hromatografski profil čistoće inicijalnog uzorka (čvrstog esomeprzol natrijuma) konverzija eventualno prisutnog 4-hidroksi omeprazola (njegovo nestajnje i

formirane 4-hidroksi omeprazole sulfid i 4-hidroksi omeprazol sulfona), ali i pojava razgradnog proizvoda na RRT 0.27, koji je u ovom slučaju i glavni razgradni proizvod, Slika 4.15. Sa nižom koncentracijom esomeprazole u rastvoru tj. pri nižim pH vrednostima koncentracija degradacionog proizvoda RRT 0.27 bila je veća. Bilo je očigledno da je u pitanju razgradnja katalizovana raspoloživim H^+ jonovima i njihovim koncentracionim nivoom. Ranije, u studiji forsirane degradacije ovaj razgradni proizvod je bio uočen kao jedan od proizvoda kisele hidrolize. Na osnovu NMR/LCMS studije njegove identifikacije pokazalo se da je to ciklični sulfenamid omeprazole, koji se često pominje u literaturi koja obrađuje mehanizam farmakološkog dejstva omeprazole u organizmu. Kako je ova hemijska vrsta permanentni katjon, ovo je u skladu sa uočenom brзом eluacijom sa hromatografske kolone pri reverzno-faznim uslovima. Takođe, u rastvoru se javljaju i kasno eluirajući degradacioni proizvodi (na RRT 1.61, 1.62), takođe uočeni u studiji forsirane degradacije kao proizvodi kisele hidrolize. Na osnovu literaturnih podataka, pretpostavka je da su u pitanju neki od više izomera dimera omeprazole (označen kao „JJ“ u [23]) u čijem formiranju se sulfenamidna kiselina omeprazole i ciklični sulfenamid omeprazole javljaju kao bitni intermedijeri. Kao je koncentracioni nivo ovih dimera bio ispod ICH propisanih nivoa za neophodnu identifikaciju, nije bilo daljih akcija u ovom smislu. Jedno je međutim bio očigledno, da uočena pojava vidljivih i nevidljivih čestica u rastvoru u izvesnoj korelaciji sa koncentracionim nivoom dimera ukazujući na njihovu sklonost da formiraju koloidne rastvore u vodenom okruženju. U ovom radu pri korišćenim uslovima forsirane degradacije u cilju dobijanja komponente RRT 0.27 primećeno je da ovi koloidi prave tamno crveni talog ranije pomenut u [138].



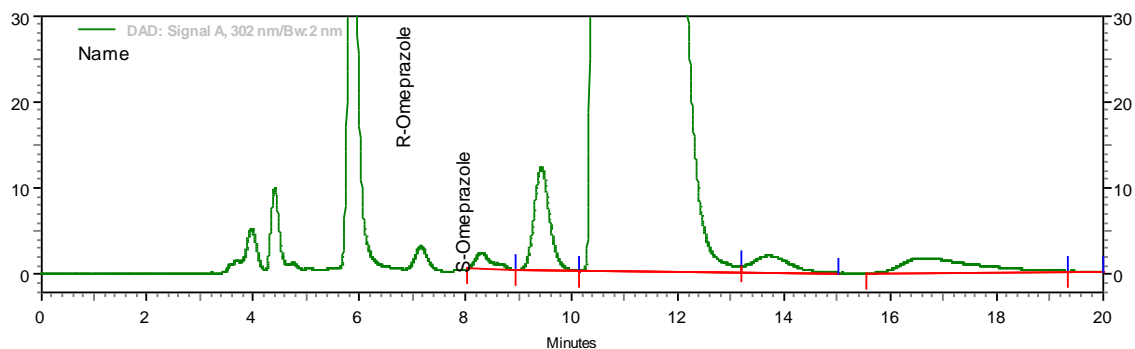
Slika 4.15 Razgradnja esomeprazola u vodenom rastvoru pH=9,58 u koncentraciji 0.2 mg/ml nakon 12h na 25 oC. Pojava komponente RRT 0.27 iznad koncentracionog nivoa za koji je po ICH [133] neophodna identifikacija komponente.

Tabela 4.25 Porast nečistoća esomeprazol natrijuma 12 sati po rastvaranju pri različitim koncentracijama u vodenim rastvorima.

Ispitivana supstanca/ rastvor (12 sati na T=30 °C) pH vrednost rastvora (/)	Koncentracija esomeprazola u rastvoru				
	esomepr. Na- čvrsti	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1,6 mg/ml
	/	9,30	9,58	9,74	9,88
		(%)			
4-Hidroksi esomeprazol	0,17	n.d	n.d	n.d	n.d
N-metil omeprazol	0,21	0,20	0,21	0,21	0,22
4-Hidroksi ome. sulfid	0,01	0,11	0,11	0,12	0,10
4-Hidroksi ome. sulfon	0,01	0,43	0,25	0,19	0,18
Neč E	n.d	0,12	0,05	0,03	0,01
Neč D	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
Neč F	0,02	0,05	0,05	0,05	0,06
RRT 0.27	n.d	0,93	0,61	0,43	0,32
RRT 0.51	n.d	0,04	0,02	0,02	0,01
RRT 0.54	n.d	0,04	0,03	0,04	0,03
RRT 0.61	n.d	0,19	0,09	0,09	0,08
RRT 0.62	n.d	0,25	0,13	0,12	0,09
Ukupne nečistoće	0,43	2,38	1,58	1,31	1,11
(R)-omeprazol	0,19	0,20	0,18	0,19	0,19

4.4.4 Recematizacija

Zaštićen od svetlosti, esomeprazol natrijum u čvrstom stanju (u oba oblika, kristalnom i amorfnom) termalno tretiran na 25 °C, 30 °C i 40 °C tokom šest meseci, kao i onaj u rastvorima, (u koncentracionim nivoima jednakim onima pri administraciji injekcija i infuzija) nije pokazivao recematizaciju. Međutim, studije ispitivanja foto stabilnosti ukazuju na recematizaciju pokrenutu uticajem svetlosti u značajnom nivou (Slika 4.16). Iz ovoga je izvučen praktični zaključak da se sama farmaceutska aktivna supstanca, svi farmaceutski proizvodi koji se prave od nje, kao i rastvori koji se koriste tokom administracije proizvoda drže zaštićenim od svetlosti.



Slika 4.16 Hromatogram uzorka esomeprazol natrijuma koji je izlagan UV-Vis zračenju: 200 W hours/m², 14 dana. (R)-izomer omeprazola u nivou od oko 1%.

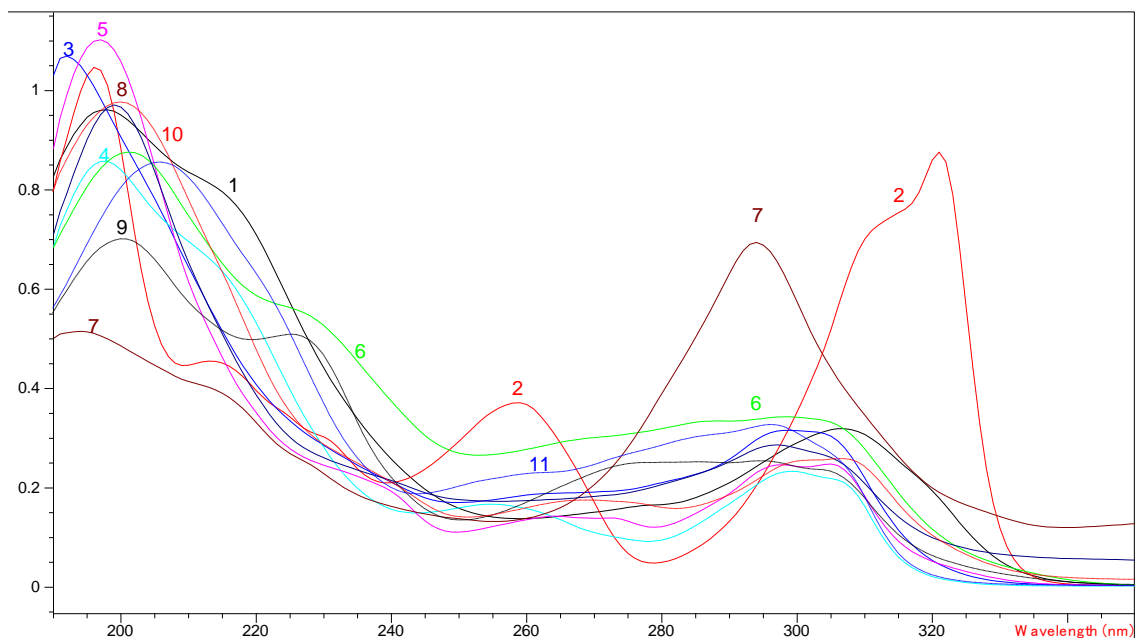
4.5 Spektrometrijska karakterizacija nečistoća esomeprazola

4.5.1 UV-Vis spektri esomeprazola i njegovih nečistoća

Uv-Vis spektri esomeprazola i njegovih nečistoća dati su na Slici 4.17 a talasne dužine na kojima se javljaju apsorpcioni maksimumi u Tabeli 4.26. Iako su u pitanju veoma strukturno slična jedinjenja, očigledan je uticaj prisustva ili odsustva supstituenata na prisutne hromofore koji rezultuje različitim UV-Vis spektrima. Ova činjenica ohrabruje korišćenje hromatografskih alatki za proveru spektralne čistoće hromatografskih pikova, odnosno formiranje spektralne biblioteke kojom bi se i potvrđivao identitet pikova u toku hromatografske analize. Prisustvo izrazite, izdvojene apsorpcione trake pri višim talasnim dužinama (321 nm) kod Nečistoće A (5-Methoksi-1H-benzimidazol-2-tiol) koja se strukturno razlikuje od ostalih nečistoća izostankom piridinskog prstena, ukazuje na poreklo ovih apsorpcionih traka koje se javljaju na višim talasnim dužinama kod ostalih ispitivanih jedinjenja.

Tabela 4.26 Apсорpcioni maksimumi esomeprazola i njegovih nečistoća

Oznaka	Komponenta	$\lambda_{\max 1}$ (nm)	$\lambda_{\max 2}$ (nm)	$\lambda_{\max 3}$ (nm)
1	Esomeprazol	198	/	307
2	Nečistoća A	196/213	259	321
3	Nečistoća B	< 195	/	298
4	Nečistoća C	198	255	299
5	Nečistoća D	197	264	298/305
6	Nečistoća E	201	/	298
7	Nečistoća F	< 195	294	391/485
8	Nečistoća H	199	/	297
9	Nečistoća I	200/225	/	285/295
10	N-Metil-Ome.	200	269	307
11	4-OH Omp.	206	/	296



Slika 4.17. UV-Vis spektri esomeprazola i njegovih nečistoća. 1 - Esomeprazol, 2 - Neč. A, 3 - Neč. B, 4 - Neč. C, 5 - Neč. D, 6 - Neč. E, 7 - Neč. F, 8 - Neč. H, 9 - Neč. I, 10 - N-metil omeprazol i 11- 4-hidroksi omeprazol sulfid.

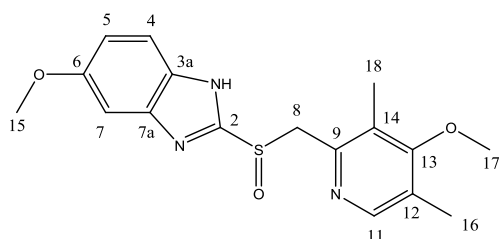
4.5.2 NMR spektri esomeprazola i njegovih nečistoća

4.5.2.1 Zajedničke NMR spektralne karakteristike esomeprazola i njegovih nečistoća

Struktura esomeprazola i 11 ispitivanih uzoraka nečistoća esomeprazola je određena pomoću 1D i 2D NMR spektroskopije. Asignacija ^1H i ^{13}C NMR signala je urađena uz pomoć snimljenih HSQC, HMBC i NOESY 2D NMR spektara. Rezultati asignacija su prikazani na Slikama 4.18, 4.24-4.32 dok su hemijska pomeranja asigniranih ^1H i ^{13}C NMR signala prikazana u tabelama 4.27 i 4.28. Ilustrativni ^1H , ^{13}C HSQC i HMBC NMR spektri esomeprazola prikazani su na slikama 4.19-4.22. Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru, dok su signali neprotovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru. Metoksi grupa vezana za benzenovo jezgro (H-15) je identifikovana na osnovu HMBC korelacije sa C-6, a metoksi grupa vezana za piridinsko jezgro (H-17) na

osnovu HMBC korelacije sa C-13. U HMBC spektrima se takođe mogu uočiti korelacije metil grupe H-16 sa C-12, C-11 i C-13 i metil grupe H-18 sa C-9, C-13 i C-14. Na osnovu HMBC korelacije H-8 sa C-2, asigniran je ugljenik imidazolskog prstena. Čvrni ugljenici su identifikovani na osnovu HMBC korelacija preko 3 hemijske veze: C-3a sa H-5 i H-7, a C-7a sa H-4.

U slučaju esomeprazola u aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,24 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze dva dubleta i jedan dvostruki dublet ($J = 8,6$ i $2,4$ Hz). Ovaj AMX spinski sistem i vrednosti konstanti sprežanja odgovaraju 1,2,4-supstituciji na benzenovom prstenu. AB kvartet na $\delta \sim 4,5$ potiče od metilenske grupe (H-8) u susedstvu sulfoksidne funkcionalne grupe. Protoni ove metilenske grupe su dijastereotopni i nalaze se u neposrednoj blizini stereocentra, pa nisu hemijski ekvivalentni i dolazi do geminalnog sprežanja između njih ($J = 13$ Hz). Signali N-H protona se javljaju zajedno sa vlagom iz uzorka na $\delta \sim 3,8$.

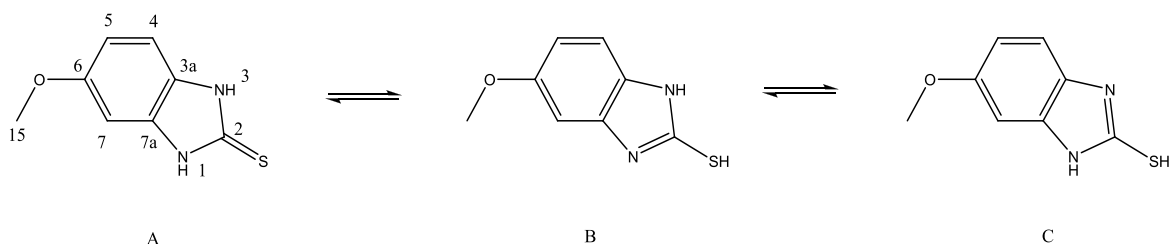


Slika 4.18 Strukturna formula esomeprazola sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

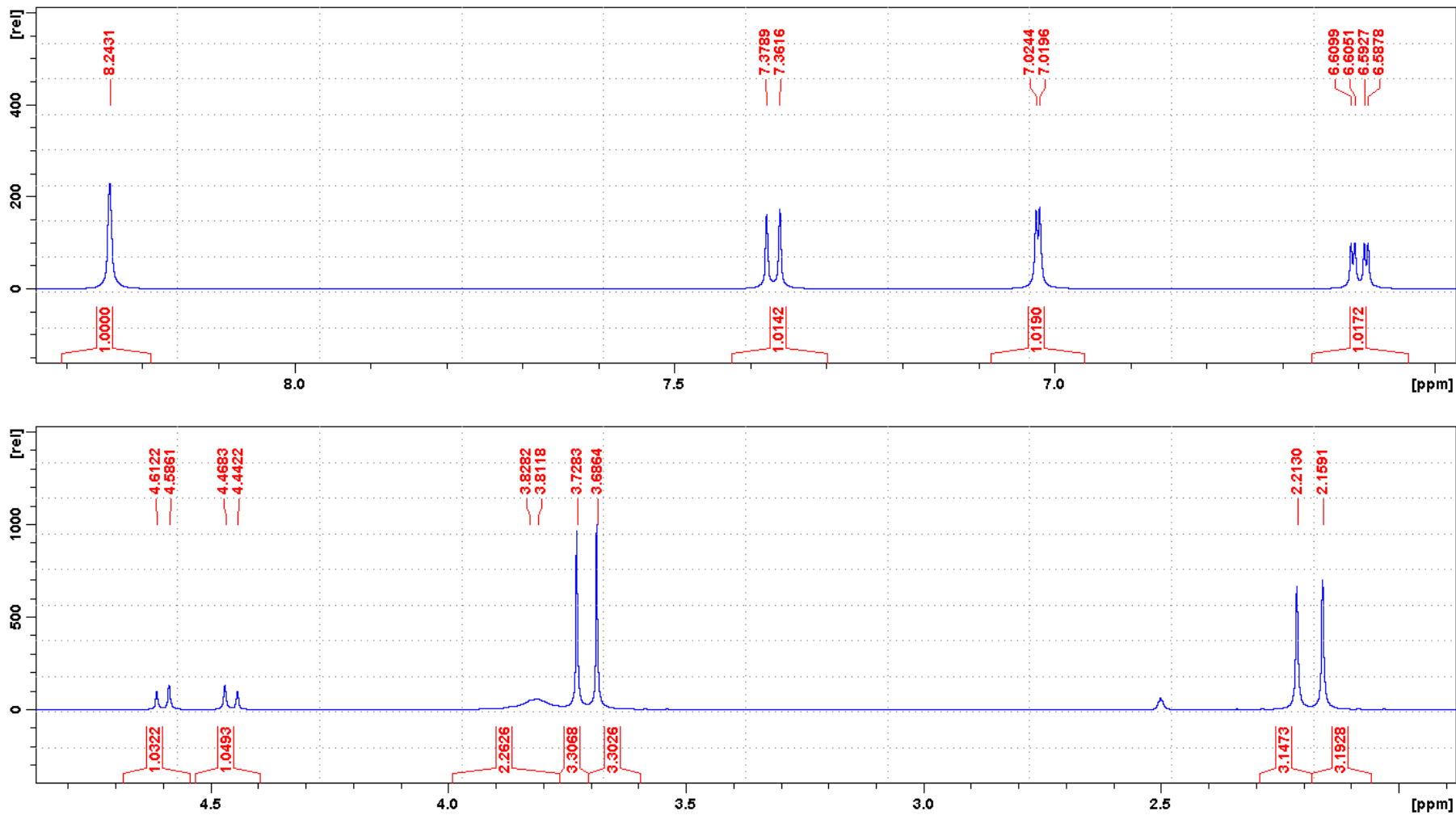
4.5.2.2 Esomeprazol Nečistoća A

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava AMX spinski sistem sačinjen od dva dubleta i jednim dvostrukim dubletom ($J = 8,6$ i $2,2$ Hz), što odgovara 1,2,4-supstituciji na benzenovom prstenu. Uočena su dva proširena singleta na δ 12,40 i 12,36 sa jednakim integralima koja potiču od N-H, što odgovara tautomeru A. Asignacija ovih signala je ustanovljena na osnovu

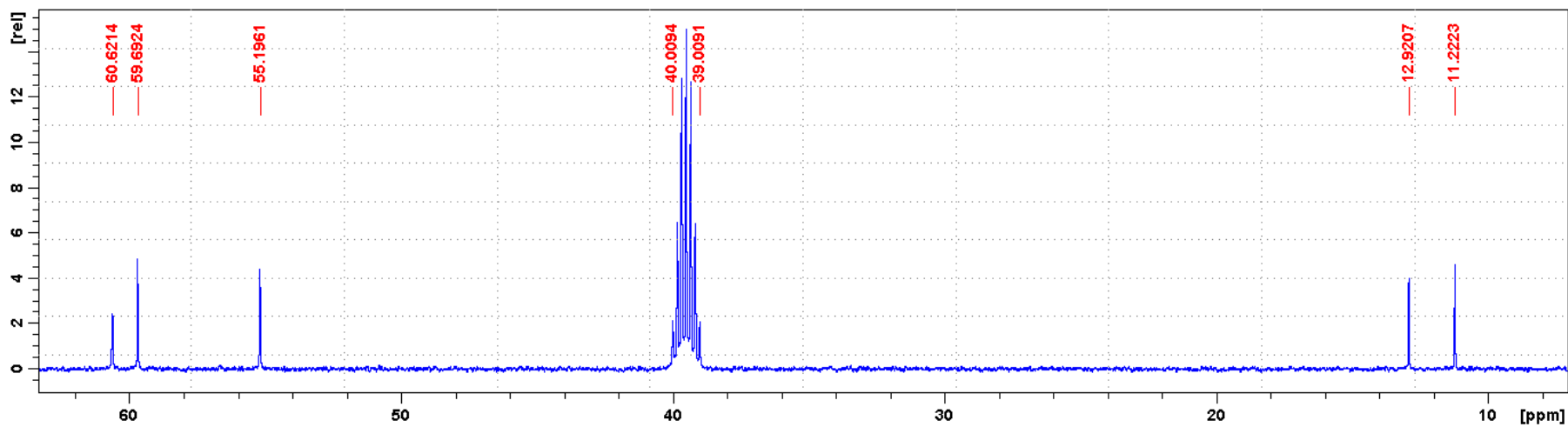
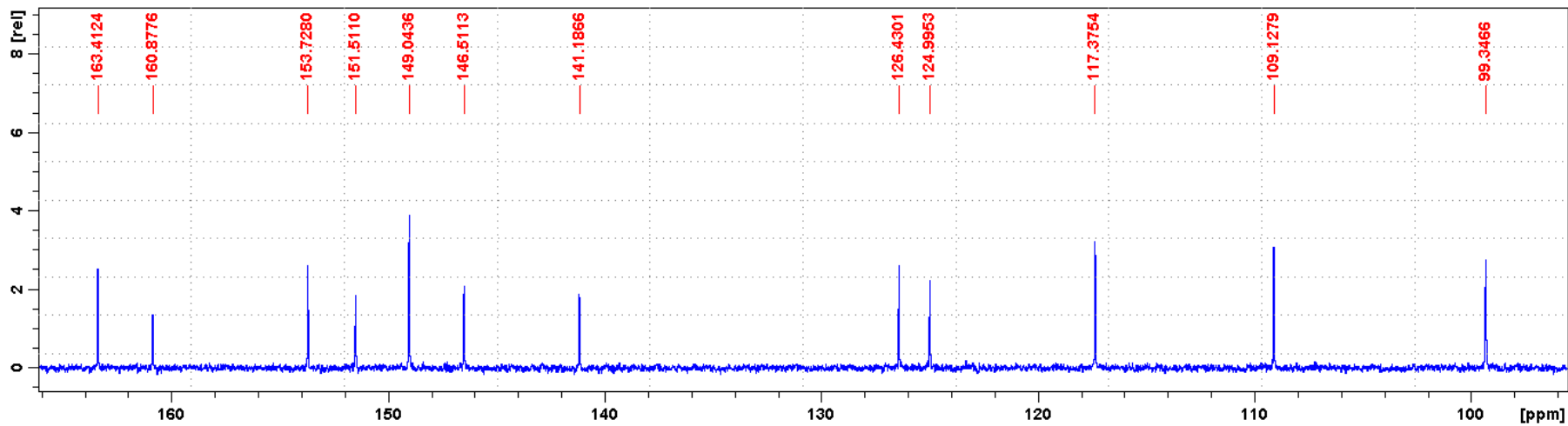
HMBC korelacija: H-1 sa C-7a i C-2, odnosno H-3 sa C-3a i C-2. U prilog ove tvrdnje je i hemijsko pomeranje C-2 sa δ 167,8, što odgovara tiokarbonilnoj grupi. Nema dodatnih signala koji bi poticali od tautomera B i C, tako da se može tvrditi da je tautomer A dominantan.



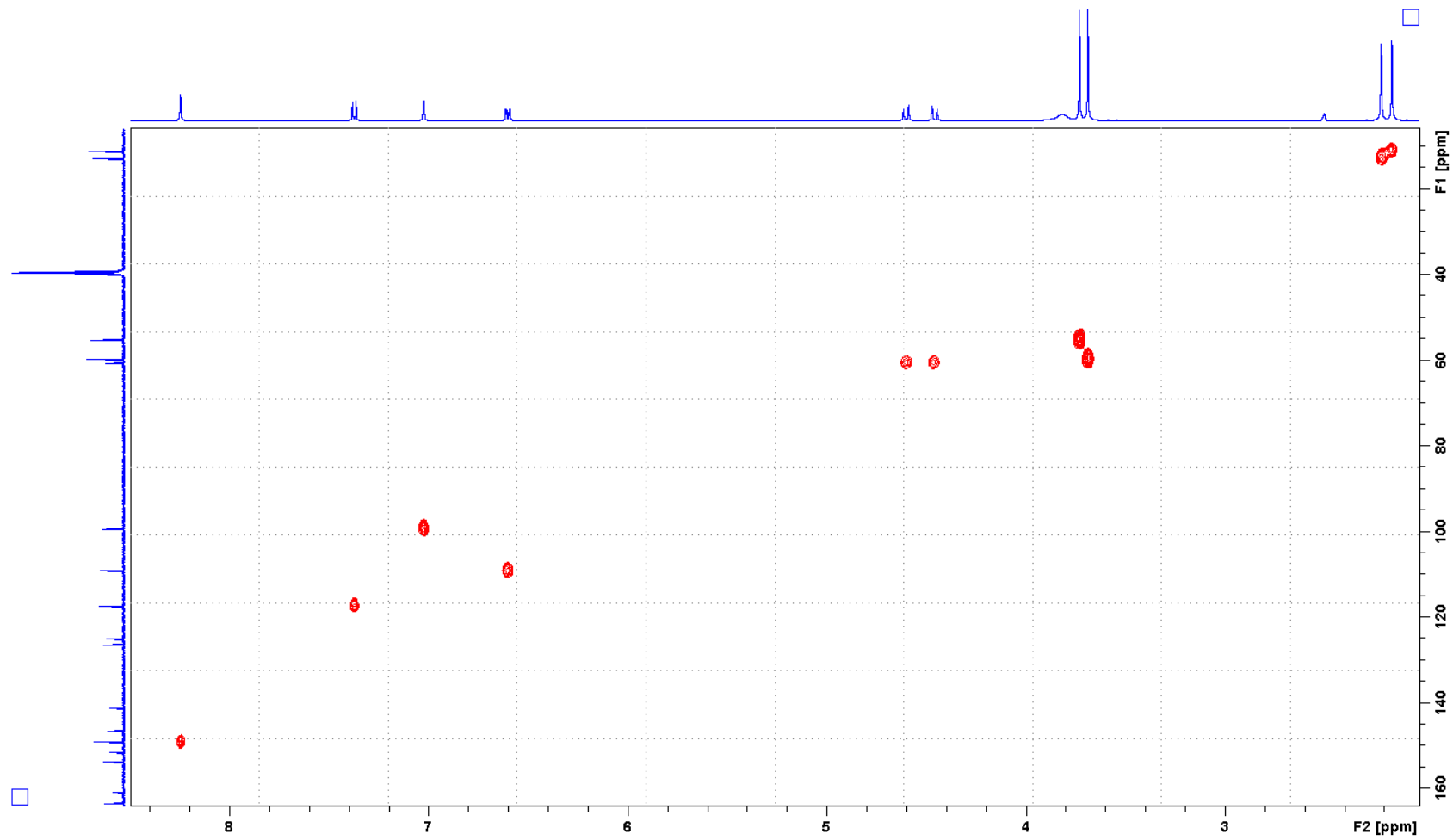
Slika 4.19 Strukturna formula esomeprazol Nečistoće A i mogući tautomeri sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u tabelama 4.27 i 4.28.



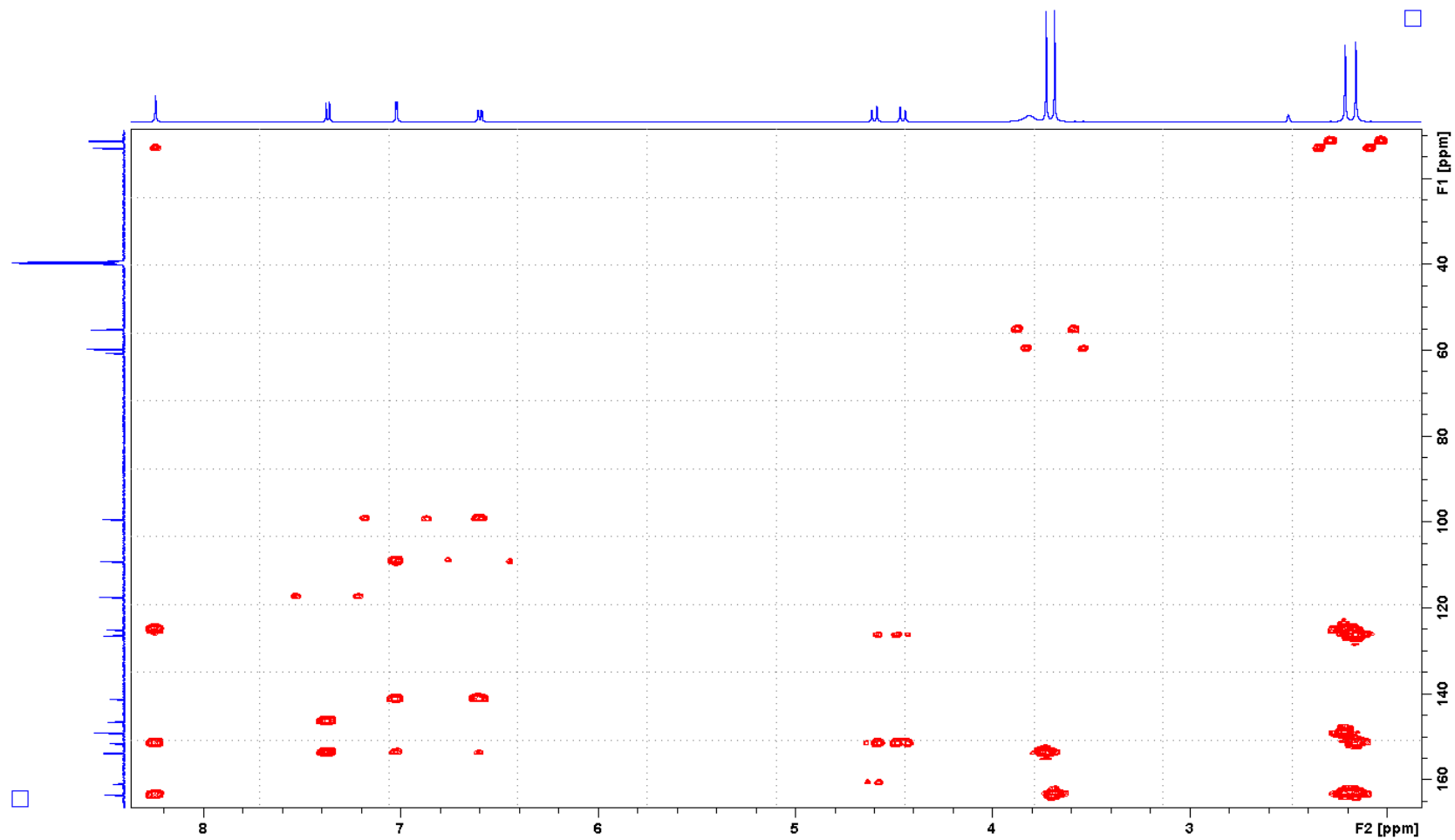
Slika 4.20: ¹H-NMR spektar esomeprazola



Slika 4.21: ¹³C-NMR spektar esomeprazola



Slika 4.22: HSQC spektar esomeprazola



Slika 4.23: HMBC spektar esomeprazola

Tabela 4.27 ¹H NMR podaci ispitivanih jedinjenja, rastvarač DMSO-*d*₆, osim za Neč. F i Neč. G, gde je rastvarač CDCl₃ uz dodatak DMSO-*d*₆. Hemijska pomeranja su data u ppm u odnosu na signal koji potiče od TMS.

¹ H	Esomeprazol	Neč. A	Neč. B	Neč. C	Neč. D	Neč. E	Neč. F
NH	3,8 <i>br s</i>	12,40 <i>br s</i> (A), 12,36 <i>br s</i> (B)	13,44 <i>br s</i>	12,46 <i>br s</i>	13,59 <i>br s</i>	13,54 <i>br s</i>	-
4	7,37 <i>d</i> (8,6 Hz)	7,02 <i>d</i> (8,6 Hz)	7,55 <i>br s</i>	7,35 <i>br s</i>	7,7 <i>br s</i>	7,6-7,0 <i>br</i>	7,97 <i>d</i> (8,7 Hz)
5	6,60 <i>dd</i> (8,6; 2,4 Hz)	6,71 <i>dd</i> (8,6; 2,2 Hz)	6,92 <i>br d</i> (8,3 Hz)	6,75 <i>dd</i> (8,6; 2,4 Hz)	7,0 <i>br d</i> (~7,0 Hz)	6,92 <i>br s</i>	6,83 <i>dd</i> (8,7; 2,1 Hz)
7	7,02 <i>d</i> (2,4 Hz)	6,67 <i>d</i> (2,2 Hz)	7,09 <i>br s</i>	6,98 <i>br s</i>	7,0 <i>br s</i>	7,6-7,0 <i>br</i>	7,09 <i>d</i> (2,1 Hz)
8	4,61-4,44 AB (13,0 Hz)	-	4,77-4,66 AB (13,4 Hz)	4,65 <i>s</i>	5,01 <i>s</i>	4,81 <i>s</i>	-
11	8,24 <i>s</i>	-	8,18 <i>d</i> (1,5 Hz)	8,17 <i>s</i>	8,04 <i>s</i>	8,23 <i>s</i>	7,90 <i>s</i>
13	-	-	7,43 <i>d</i> (1,5 Hz)	-	-	-	-
15	3,73 <i>s</i>	3,73 <i>s</i>	3,80 <i>s</i>	3,77 <i>s</i>	3,81 <i>s</i>	3,80 <i>s</i>	3,87 <i>s</i>
16	2,21 <i>s</i>	-	2,24 <i>s</i>	2,27 <i>s</i>	2,20 <i>s</i>	2,18 <i>s</i>	2,11 <i>s</i>
17	3,69 <i>s</i>	-	-	3,72 <i>s</i>	3,68 <i>s</i>	3,63 <i>s</i>	-
18	2,16 <i>s</i>	-	2,27 <i>s</i>	2,19 <i>s</i>	2,17 <i>s</i>	2,01 <i>s</i>	2,59 <i>s</i>
19	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 4.27 -**nastavak** . ¹H NMR podaci ispitivanih jedinjenja, rastvarač DMSO-*d*₆, osim za Neč F i Neč. G, gde je rastvarač CDCl₃ uz dodatak DMSO-*d*₆. Hemijska pomeranja su data u ppm u odnosu na signal koji potiče od TMS.

¹ H	Neč. G	Neč. H	Neč. I	1-N-metil omeprazol	3-N-metil omeprazol	4-OH-omeprazol sulfid
NH	-	nd	3,4 <i>br s</i>	-	-	11,42 <i>br s</i> ; 12,56 <i>br s</i>
4	7,47 <i>d</i> (8,8 Hz)	7,53 <i>d</i> (8,8 Hz)	7,59 <i>d</i> (8,8 Hz)	7,61 <i>d</i> (8,8 Hz)	7,56 <i>d</i> (8,8 Hz)	7,5-7,2 <i>br</i>
5	6,93 <i>dd</i> (8,8; 2,4 Hz)	6,92 <i>dd</i> (8,8; 2,1 Hz)	6,99 <i>dd</i> (8,8; 2,4 Hz)	6,93 <i>dd</i> (8,8; 2,4 Hz)	7,02 <i>dd</i> (8,8; 2,4 Hz)	6,77 <i>dd</i> (8,8; 2,4 Hz)
7	7,72 <i>d</i> (2,4 Hz)	7,09 <i>d</i> (2,1 Hz)	7,06 <i>br d</i> (2,4 Hz)	7,20 <i>d</i> (2,4 Hz)	7,25 <i>d</i> (2,4 Hz)	7,2-6,8 <i>br</i>
8	-	4,86-4,80 AB (13,7 Hz)	5,33 <i>s</i>	4,96-4,81 AB (13,8 Hz)	4,96-4,81 AB (13,8 Hz)	4,45 <i>s</i>
11	7,98 <i>s</i>	8,26 <i>s</i>	8,06 <i>s</i>	8,12 <i>s</i>	8,11 <i>s</i>	7,53 <i>s</i>
13	-	-	-	-	-	-
15	3,88 <i>s</i>	3,80 <i>s</i>	3,82 <i>s</i>	3,85 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>	3,77 <i>s</i>
16	2,12 <i>s</i>	2,35 <i>s</i>	2,16 <i>s</i>	2,16 <i>s</i>	2,16 <i>s</i>	1,83 <i>s</i>
17	-	-	3,70 <i>s</i>	3,65 <i>s</i>	3,65 <i>s</i>	-
18	2,60 <i>s</i>	2,87 <i>s</i>	2,19 <i>s</i>	2,18 <i>s</i>	2,18 <i>s</i>	1,91 <i>s</i>
19	-	-	-	3,93 <i>s</i>	3,91 <i>s</i>	-

Tabela 4.28 ^{13}C NMR podaci ispitivanih jedinjenja, rastvarač DMSO- d_6 , osim za Neč. F i Neč. G, gde je rastvarač CDCl_3 uz dodatak DMSO- d_6 . Hemijska pomeranja su data u ppm u odnosu na signal koji potiče od TMS.

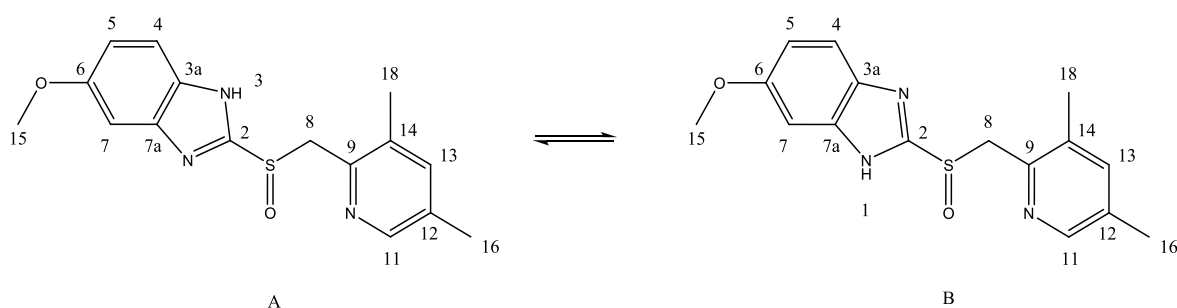
^{13}C	Esomeprazol	Neč. A	Neč. B	Neč. C	Neč. D	Neč. E	Neč. F
2	160,9	167,8	153,4(HMBC)	148,0(HMBC)	nd	153,4	150,6
3a	141,2	126,4	nd	138,0(HMBC)	nd	nd	123,0
4	117,4	110,0	nd	117,6(HSQC)	121,5(HSQC)	nd	113,2
5	109,1	109,7	113,3(HSQC)	110,4	114,6(HSQC)	113,3(HSQC)	111,3
6	153,7	155,7	156,8(HMBC)	155,3	157,8(HMBC)	156,7(HMBC)	158,7
7	99,4	94,5	nd	94,1(HSQC)	94,3(HSQC)	nd	105,2
7a	146,5	133,1	nd	nd	nd	nd	148,1
8	60,6	-	59,7	36,5	60,6	54,5	177,0
9	151,5	-	146,9	154,0	146,7	139,4	138,9
11	149,0	-	147,1	148,7	149,2	137,6	125,4
12	125,0	-	132,3	125,1	126,1	129,3	124,7
13	163,4	-	138,6	163,4	163,6	154,0	180,7
14	126,4	-	132,8	124,5	127,6	130,5	131,1
15	55,2	55,5	55,5	55,4	55,5	55,5	55,5
16	12,9	-	17,4	10,9	11,3	12,9	9,3
17	59,7	-	-	59,8	59,7	60,3	-
18	11,2	-	18,1	12,9	12,9	11,9	13,8
19	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 4.28 nastavak . ^{13}C NMR podaci ispitivanih jedinjenja, rastvarač $\text{DMSO-}d_6$, osim za Neč F i Neč. G, gde je rastvarač CDCl_3 uz dodatak $\text{DMSO-}d_6$. Hemijska pomeranja su data u ppm u odnosu na signal koji potiče od TMS.

^{13}C	Neč. G	Neč. H	Neč. I	1-N-metil omeprazol	3-N-metil omeprazol	4-OH- omeprazol sulfid
2	148,9	152,8	147,7	151,3	152,5	147,1; 148,7
3a	140,0	-	134,3(HMBC)	135,8	130,8	137,9; 129,9
4	120,1	113,5	118,8(HSQC)	120,8	111,4	118,1; 111,2
5	112,9	113,5	115,1	113,4	114,7	110,8; 110,5
6	157,5	156,6	157,6	157,3	156,3	155,7; 153,3
7	98,2	97,1(HSQC)	96,8(HSQC)	93,4	101,7	100,7; 94,2
7a	129,3	-	nd	137,0	142,3	nd
8	178,0	60,1	54,2	58,4	58,4	31,6
9	138,8	148,8	137,5	150,1	150,1	141,2
11	125,2	147,7	137,6	148,9	148,9	133,4
12	124,5	131,0	129,7	125,4	125,4	121,3
13	180,2	144,0	153,9	163,5	163,5	177,5
14	130,6	131,4	130,9	126,1	126,1	121,6
15	55,4	55,5	55,5	55,7	55,5	55,5
16	9,1	15,6	12,9	12,8	12,8	13,7
17	-	-	60,3	59,7	59,7	-
18	13,6	17,0	12,2	11,0	11,0	10,4
19	-	-	-	30,4	30,4	-

4.5.2.3 Esomeprazol nečistoća B

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočavaju dva dubleta sa malim konstantama sprežanja ($J \sim 1,5$ Hz) na δ 8,18 i δ 7,43 koji potiču od H-11, odnosno H-13 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan prošireni dublet koji potiče od H-5 (δ 6,92, $J = 8,3$ Hz) i dva jako proširena singleta (H-4 na δ 7,55 i H-7 na δ 7,09). Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomera A i B koji nalaze u režimu izmene srednje brzine. Pri tom su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerizacija dešava. Tako se za protone H-3 (izomer A) i H-1 (izomer B) javlja jedan prošireni singlet na δ 13,44 u ^1H NMR spektru, dok signali C-2, C-3a, C-4, C-5, C-6, C-7, C7a izostaju iz ^{13}C NMR spektra. Hemijska pomeranja za C-2 i C-6 su indirektno određena na osnovu HMBC korelacija, a C-5 na osnovu odgovarajuće HSQC korelacije. Protoni metilenske grupe su diastereotopni i nalaze se u neposrednoj blizini stereocentra, pa nisu hemijski ekvivalentni (AB kvartet na $\delta \sim 4,7$) i dolazi do geminalnog sprežanja između njih ($J = 13,4$ Hz).

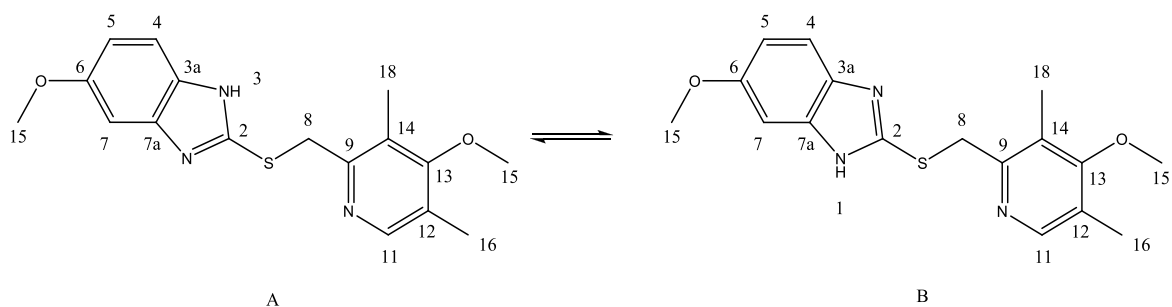


Slika 4.24 Strukturna formula tautomera A i B, Nečistoće B, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.4 Esomeprazol nečistoća C

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,17 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan dvostruki dublet koji potiče od H-5 (δ 6,75, $J = 2,4$ i $8,6$ Hz) i dva jako proširena

signala (H-4 na δ 7,34 i H-7 na δ 6,98). Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomera A i B koji nalaze u režimu izmene srednje brzine. Pri tom su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerija dešava. Za protone H-3 (izomer A) i H-1 (izomer B) se javlja jedan prošireni singlet na δ 12,46 u ^1H NMR spektru, dok signali C-2, C-3a, C-4, C-5, C-7, C7a izostaju iz ^{13}C NMR spektra. Hemijska pomeranja za C-2 i C-3a su indirektno određena na osnovu HMBC korelacija, a C-4 i C-7 na osnovu odgovarajućih HSQC korelacija. Pošto protoni metilenske grupe nisu dijastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 4,64.

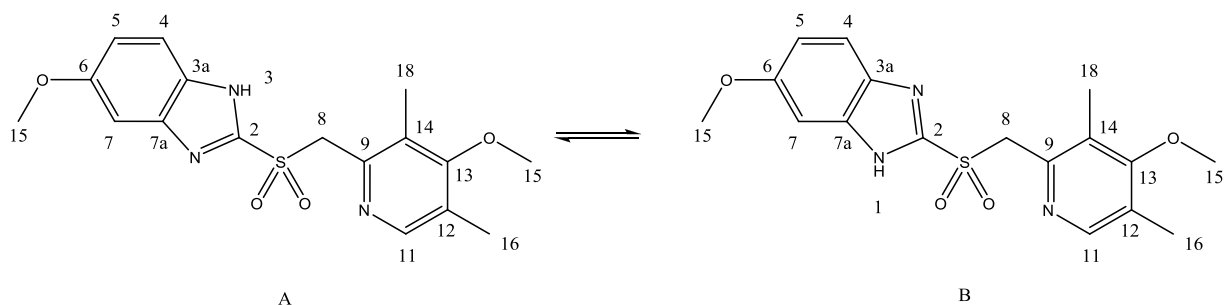


Slika 4.25 Strukturna formula tautomera A i B, Nečistoće C, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.5 Esomeprazol nečistoća D

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,04 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan prošireni signal koji potiče od H-4 na $\delta \sim 7,7$, i dva proširena, preklopljena signala od H-5 i H-7 na $\delta \sim 7,0$. Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomera A i B koji nalaze u režimu izmene srednje brzine. Pri tom su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerija dešava. Za protone H-3 (izomer A) i H-1 (izomer B) se javlja jedan prošireni singlet na δ 13,59 u ^1H NMR spektru, dok signali C-2, C-3a, C-4, C-5, C-6, C-7, C7a izostaju

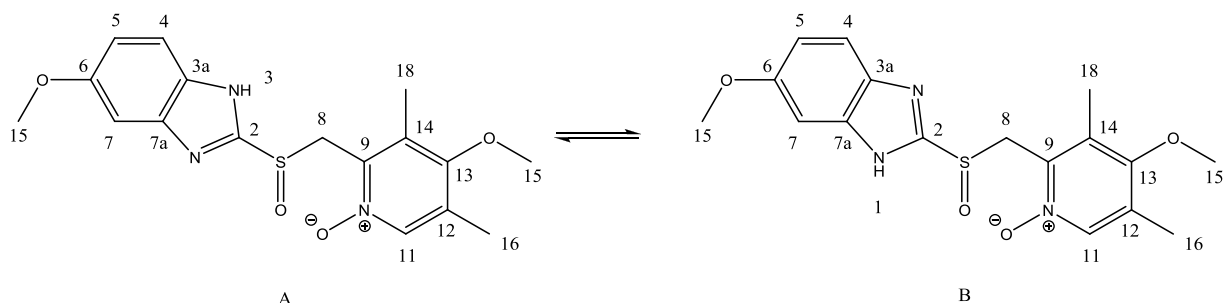
iz ^{13}C NMR spektra. Hemijsko pomeranje za C-6 je indirektno određeno na osnovu HMBC korelacije, a C-4, C-5 i C-7 na osnovu odgovarajućih HSQC korelacija. Pošto protoni metilenske grupe nisu dijastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 5,01.



Slika 4.26 Strukturna formula tautomera A i B, Nečistoće D, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.6 Esomeprazol nečistoća E

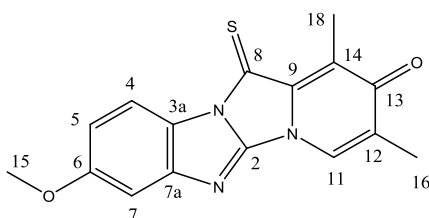
U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,23 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan prošireni signal koji potiče od H-5 na δ 6,92, i dva proširena i preklopljena signala od H-4 i H-7 na $\delta \sim 7,6-7,0$. Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomera A i B koji nalaze u režimu izmene srednje brzine. Pri tom su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerija dešava. Za protone H-3 (izomer A) i H-1 (izomer B) se javlja jedan prošireni singlet na δ 13,54 u ^1H NMR spektru, dok signali C-2, C-3a, C-4, C-5, C-6, C-7, C7a izostaju iz ^{13}C NMR spektra. Hemijsko pomeranje za C-6 je indirektno određeno na osnovu HMBC korelacije, a C-5 i C-7 na osnovu odgovarajuće HSQC korelacije. Pošto protoni metilenske grupe nisu dijastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 4,81.



Slika 4.27 Strukturna formula tautomera A i B, Nečistoće E, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.7 Esomeprazol nečistoća F

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 7,90 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze dva dubleta i jedan dvostruki dublet ($J = 8,7$ i $2,1$ Hz). Ovaj AMX spinski sistem i vrednosti konstante sprezanja odgovaraju 1,2,4-supstituciji na benzenovom prstenu. Signali karbonilnog ugljenika C-13 (δ 180,7) i C-2 (δ 150,6) ugljenika imidazolskog prstena su asignirani na osnovu HMBC korelacija sa H-11. Signal tiokarbonilnog ugljenika C-8 (δ 177,0) zbog udaljenosti protona nije pokazao nijednu HMBC korelaciju.

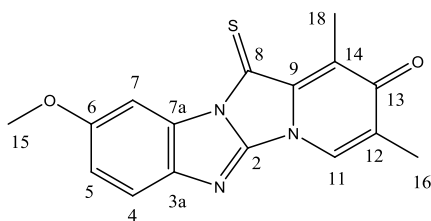


Slika 4.28 Strukturna formula Nečistoće F, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.8 Esomeprazol nečistoća G

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 7,98 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze dva dubleta i jedan dvostruki dublet ($J = 8,8$ i $2,4$ Hz). Ovaj AMX spinski sistem i

vrednosti konstante sprezanja odgovaraju 1,2,4-supstituciji na benzenovom prstenu. Signal karbonilnog ugljenika C-13 (δ 180,2) je asigniran na osnovu HMBC korelacije sa H-11. Signali tiokarbonilnog ugljenika C-8 (δ 178,0) i imidazolskog C-2 (δ 148,9) nisu pokazali nijednu HMBC korelaciju. Njihova asignacija je urađena poređenjem hemijskih pomeranja sa onim iz uzorka Nečistoće F.

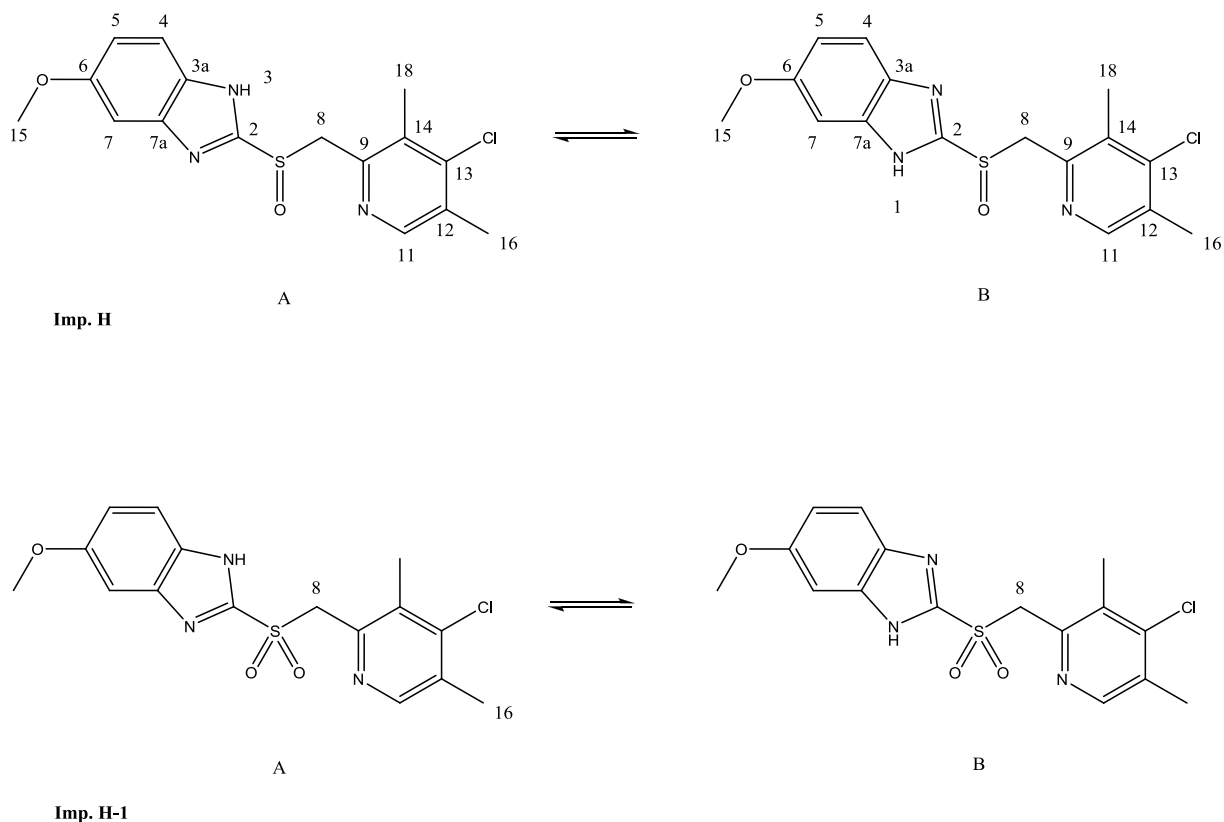


Slika 4.29 Strukturna formula Nečistoće G, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.9 Esomeprazol nečistoća H

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,26 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze dva dubleta i jedan dvostruki dublet ($J = 8,8$ i $2,1$ Hz). Ovaj AMX spinski sistem i vrednosti konstante sprezanja odgovaraju 1,2,4-supstituciji na benzenovom prstenu. AB kvartet na $\delta \sim 4,8$ potiče od metilenske grupe u susedstvu sulfoksidne funkcionalne grupe. Protoni metilenske grupe su diastereotopni i nalaze se u neposrednoj blizini stereocentra, pa nisu hemijski ekvivalentni i dolazi do geminalnog sprezanja između njih ($J = 13,7$ Hz). Tautomerija srednje brzine između oblika A i B je uticala na izostanak ^{13}C NMR signala ugljenika koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerija dešava. Tako je hemijsko pomeranje za C-7 određeno na osnovu HSQC korelacije, dok odgovarajuće HMBC korelacije koje bi poticale od C-3a i C-7a nisu uočene. Pored navedenih signala u ^1H NMR spektru je uočen set signala od vrste Nečistoća H-1. Signali Nečistoće H-1, osim za H-8, imaju identičan oblik, ali različita hemijska pomeranja u poređenju sa Nečistoću H. Pošto ne postoje

međusobne NOESY korelacija između signala Nečistoće H i Nečistoće H-1, zaključeno je da ne postoji hemijska ravnoteže između ove dve vrste. Sudeći prema vrednostima integrala, Nečistoća H-1 je prisutan u količini ~ 9%. Na osnovu vrednosti hemijskog pomeranja i oblika signala H-8 (δ 5,13, s) koji ima HSQC korelaciju sa C-8 (δ 61,0) zaključeno je da je Nečistoća H-1 oksidacioni proizvod (sulfoksid) od Nečistoće H.

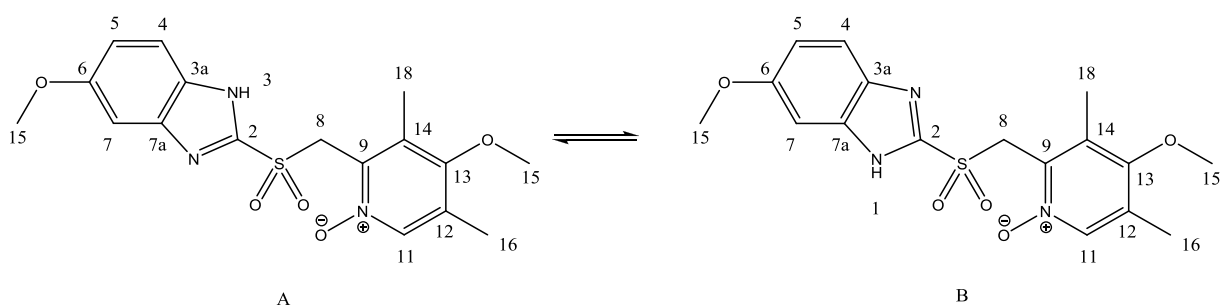


Slika 4.30 Strukturna formula tautomera A i B, Nečistoće H i prisutnih tautomera Nečistoće H-1 njenog oksidacionih proizvoda, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.10 Esomeprazol nečistoća I

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,06 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan prošireni signal koji potiče od H-7 na δ 7,06, dublet na δ 7,59 i dvostruki dublet

na δ 6,99, koji potiču od H-4, odnosno H-7. Širok signal koji potiče od H-7 se javlja usled pojave tautomera A i B koji nalaze u režimu izmene srednje brzine. Signali N-H protona se javljaju zajedno sa vlagom iz uzorka na $\delta \sim 3,4$. Signali C-3a, C-4, i C-7, C7a izostaju iz ^{13}C NMR spektra. Hemijsko pomeranje za C-3a je indirektno određeno na osnovu HMBC korelacije, a C-4 i C-7 na osnovu odgovarajućih HSQC korelacija. Pošto protoni metilenske grupe nisu diastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 5,33.

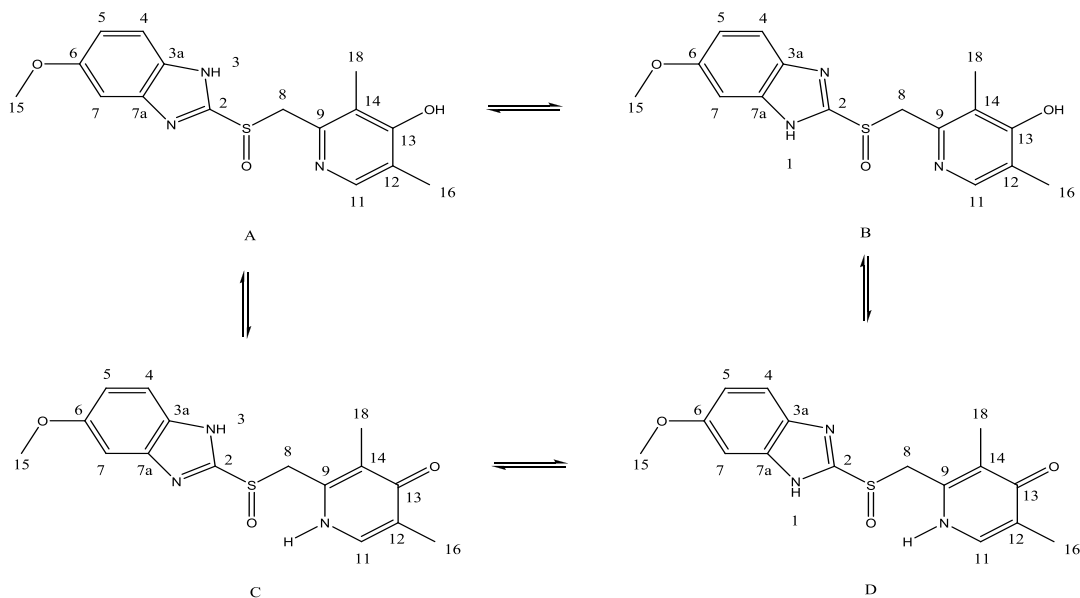


Slika 4.31 Strukturna formula tautomera A i B, Nečistoće I, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.2.11 4-Hidroksi-omeprazol sulfid

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 7,53 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan dvostruki dublet koji potiče od H-5 (δ 6,77, $J = 2,4$ i $8,8$ Hz) i dva jako proširena signala (H-4 na $\delta \sim 7,3$ i H-7 na $\delta \sim 6,9$). Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomerije imidazolovog prstena, u režimu izmene srednje brzine. Pri tom su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerija dešava. Za signal C-13 je detektovano visoko hemijsko pomeranje (δ 177,5), na osnovu čega je utvđeno prisustvo piridonskih tautomera (C i D). Kako ne postoji dodatni signal C-13, prisustvo 4-hidrokipiridinskih tautomera (A i B) je isključeno. Zaaminske protone imidazolovog i piridonskog prstena su

detektovana dva proširena singleta na δ 12,56 i 11,42 u ^1H NMR spektru. Pošto protoni metilenske grupe H-8 nisu dijastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 4,64.



Slika 4.32 Strukturna formula tautomera 4-Hidroksi-omeprazol sulfid, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.5.3 MS/MS spektri i fragmentacioni putevi esomeprazola i njegovih nečistoća

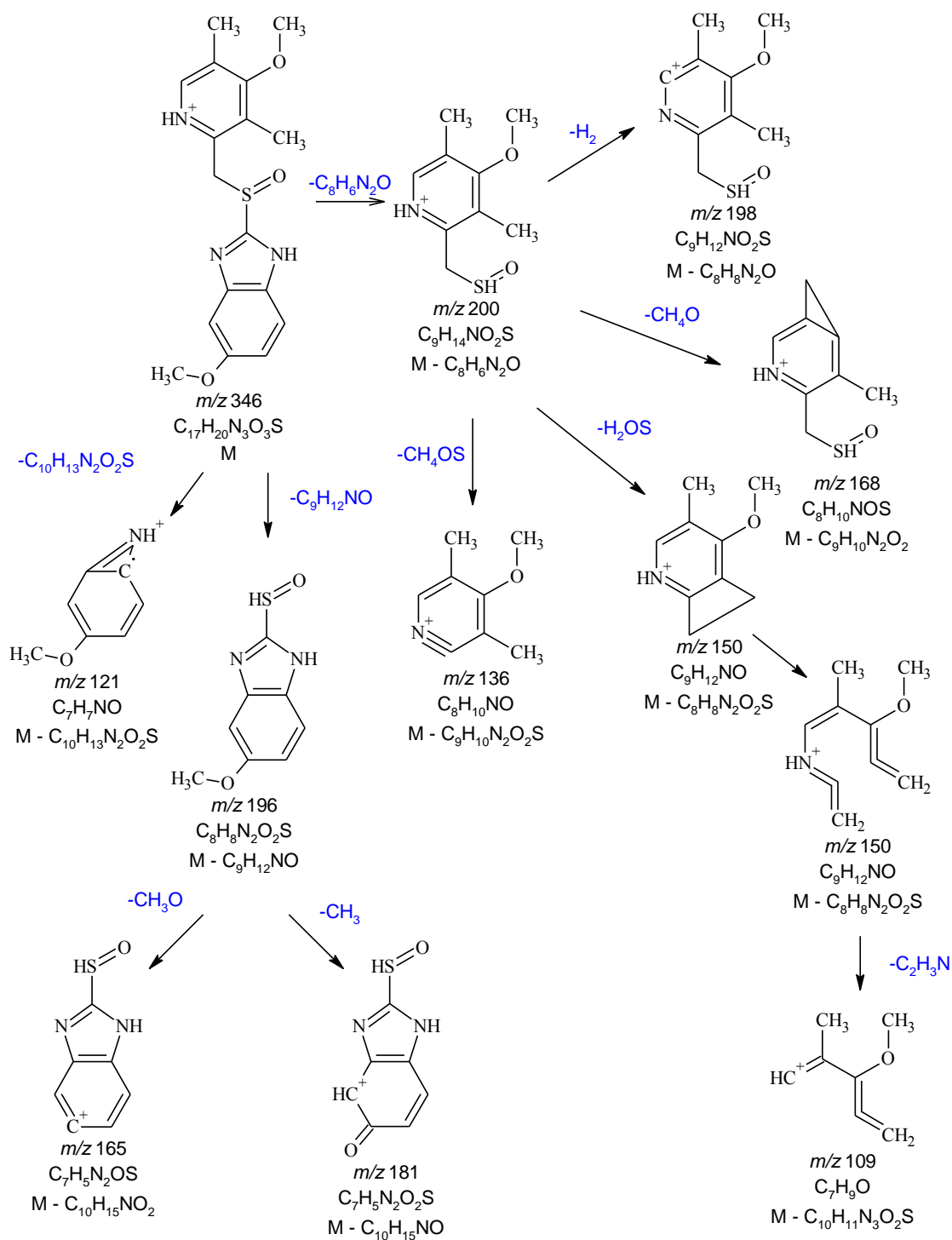
Premda je poznavanje tačnih masa molekulskih jonova od značaja za identifikaciju, ovaj podatak pruža siromašnu informaciju o strukturi nepoznatih jedinjenja. Iz tog razloga snimani su MS^2 spektari esomeprazola i njegovih nečistoća. MS/MS spektri snimani su modu „skeniranje fragmentnih jona“ (Q1 podešen na propuštanje samo odabranog molekuskog jona, SIM, CID koliziona ćelija uključena, Q3 – skeniranje), uz kolizionu energiju variranu u opsegu 12–55 eV. Da bi se izbegla greška u izboru molekuskog jona koliziona energija je birana tako da na MS^2 spektru molekulski jon daje jednu od intenzivnijih linija.

Generalno zapažanje je da koliziono-indukovana disocijacija (CID) esomeprazola i njemu sličnih jedinjenja (njegovih nečistoća) rezultira relativno bogatim MS/MS spektrima. Mase uočenih fragmentnih jona i relativni identiteti pripadajućih linija prezentirani su u Tabeli 4.24. Iako, cilj studije nije bio da se u potpunosti objasni CID fragmentaciona hemija svih ovih jedinjenja, već da se uoči karakteristični načini fragmentacije za ova međusobno slična jedinjenja i proceniti iskoristivost ovih saznanja u objašnjenju njihovih međusobnih strukturnih razlika, postulirani su fragmentacioni putevi nekih od ispitivanih jedinjenja. Na osnovu poznavanja strukture ishodnih jedinjenja i *in-silico* simuliranih fragmentacija korišćenjem softvera *ACD/MS Fragmenter* su izvedeni teorijski očekivani fragmenti koji su prikazani na Slikama 4.33-4.40. koji su u saglasju sa merenim MS/MS spektrima.

Prisustvo supstituenata na benzoimidazolskom i piridinskom delu osnovnog skeleta molekula i oksidaciono stanje prisutnog sumporovog atoma ima dramatičnog uticaja na gasno-faznu disocijonu hemiju. On, generalno, nije posledica gubitaka ovih bočnih, supstituisanih grupa, već njihovih uticaja na CID hemiju. Ovo se može uočiti iz postuliranih fragmentacionih obrazaca prikazanih na Slikama 4.33-4.40. Iz razmatranja se ne sme isključiti i uticaj različite primenjene kolizione energije.

MS/MS instrument na bazi trostrukog kvadrupola sa izuzetnom selektivnošću i osetljivosti za namene kvatifikacije komponenti možda nije najadekvatniji za namenu ispitivanja fragmentacionih ponašanja i strukturne elucidacije. Pre svega on je nisko rezolutivni MS instrument, i bez mogućnosti viših MS stupnjeva što ne daje mogućnost provere strukture postuliranog fragmentacionog jona i time limitira njegove mogućnosti za ovu namenu. Međutim, i na ovaj način se mogu izvući izvesni zaključci o strukturnim sličnostima kod roditeljskih jona na osnovu prisustva karakterističnih ili zajedničkih fragmentnih jona. U ovome bi od značajne pomoći bili i drugi modovi rada instrumenta poput „skeniranje prekursorskih jona“ (Q1 -

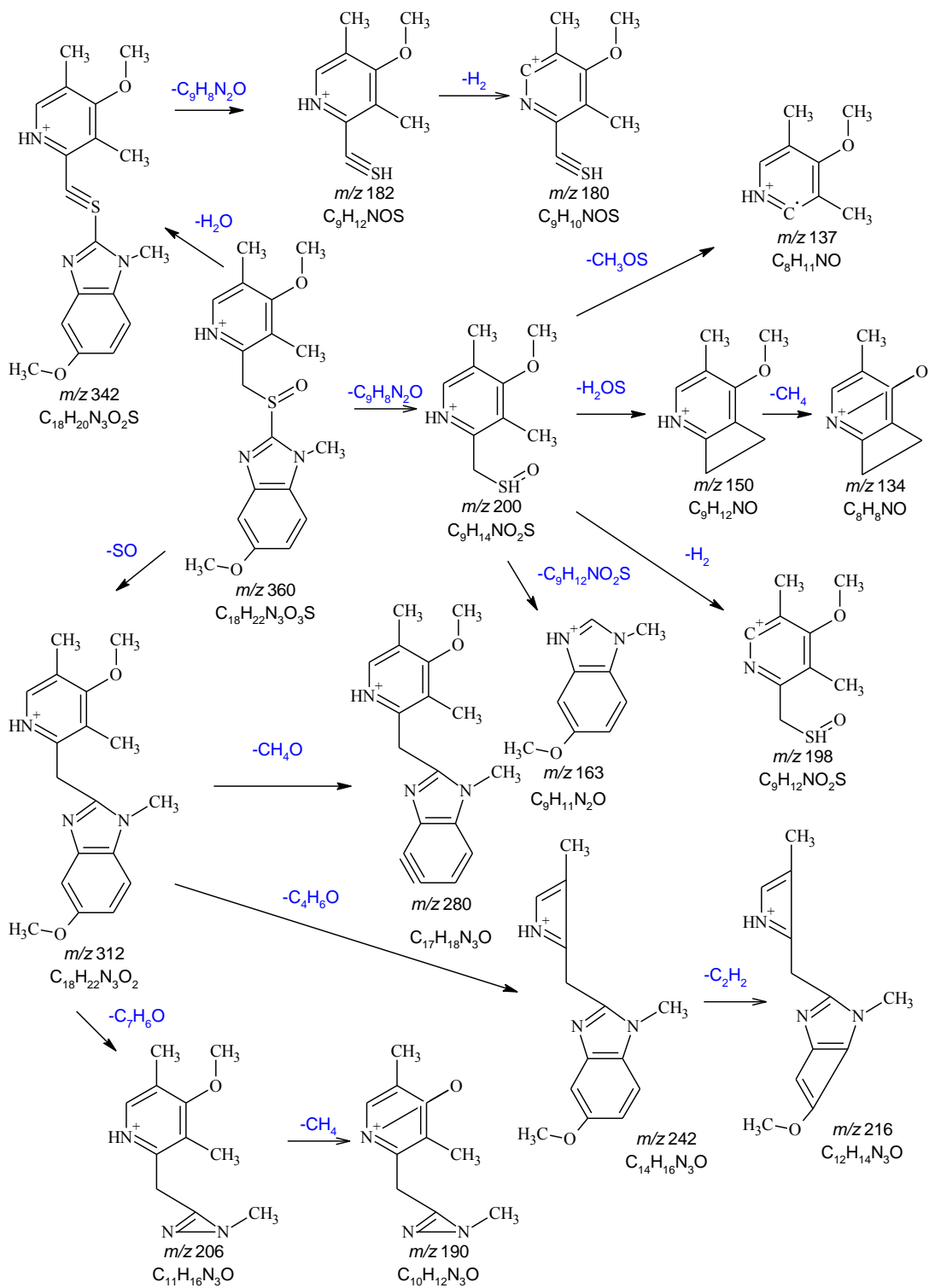
skeniranje, CID koliziona ćelija uključena, Q3 - SIM) koji bi omogućavao skrining molekula i lako otkrivanje zajedničkih strukturnih elemenata.



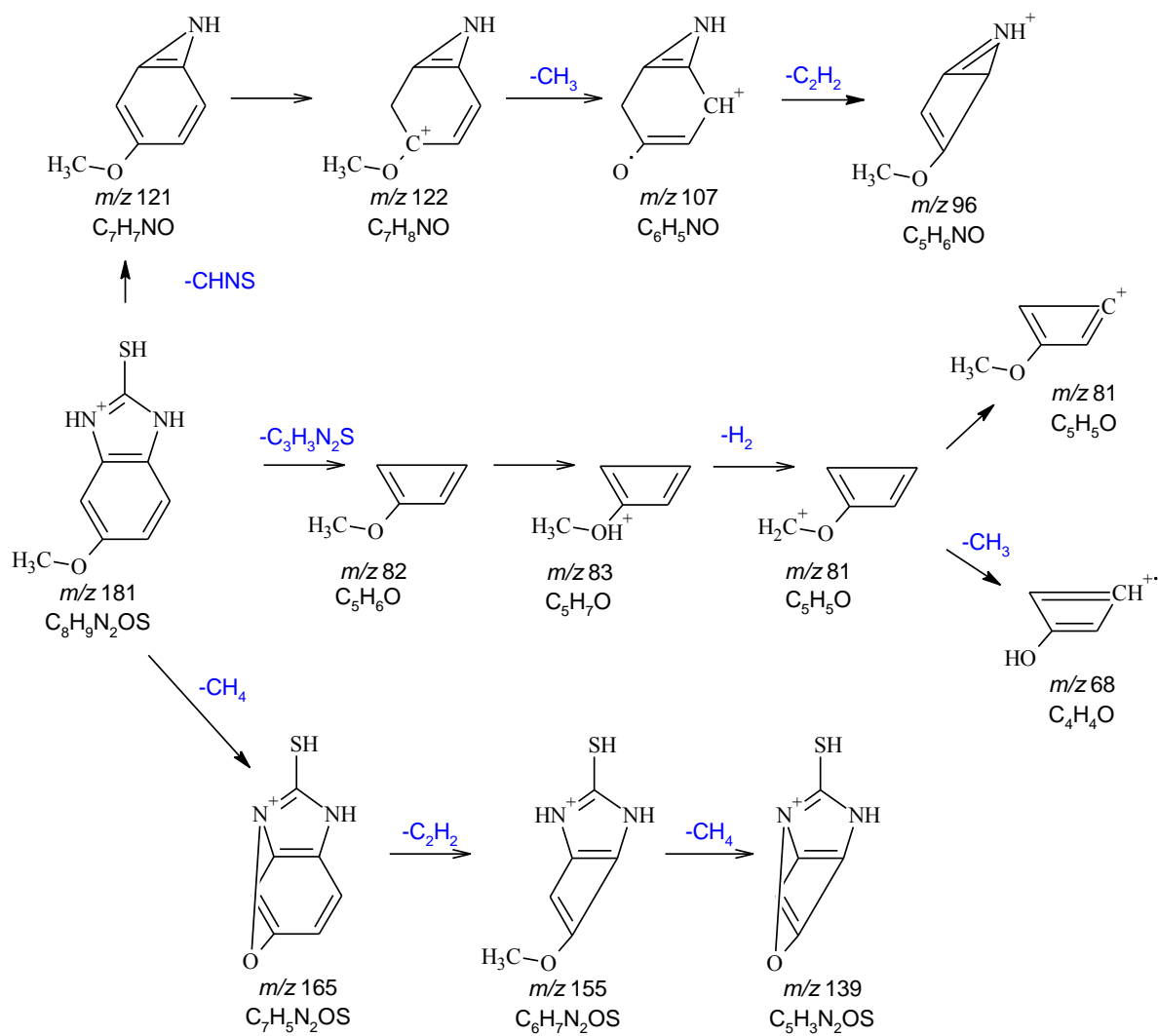
Slika 4.33 Postulirani fragmentacioni obrazac molekulskog jona (M+H)⁺esomeprazola (m/z 346) pri CID 55eV

Tabela 4.29 Glavni fragmentni joni dobijeni od roditeljskih molekulskog jona ispitivanih jedinjenja putem CID

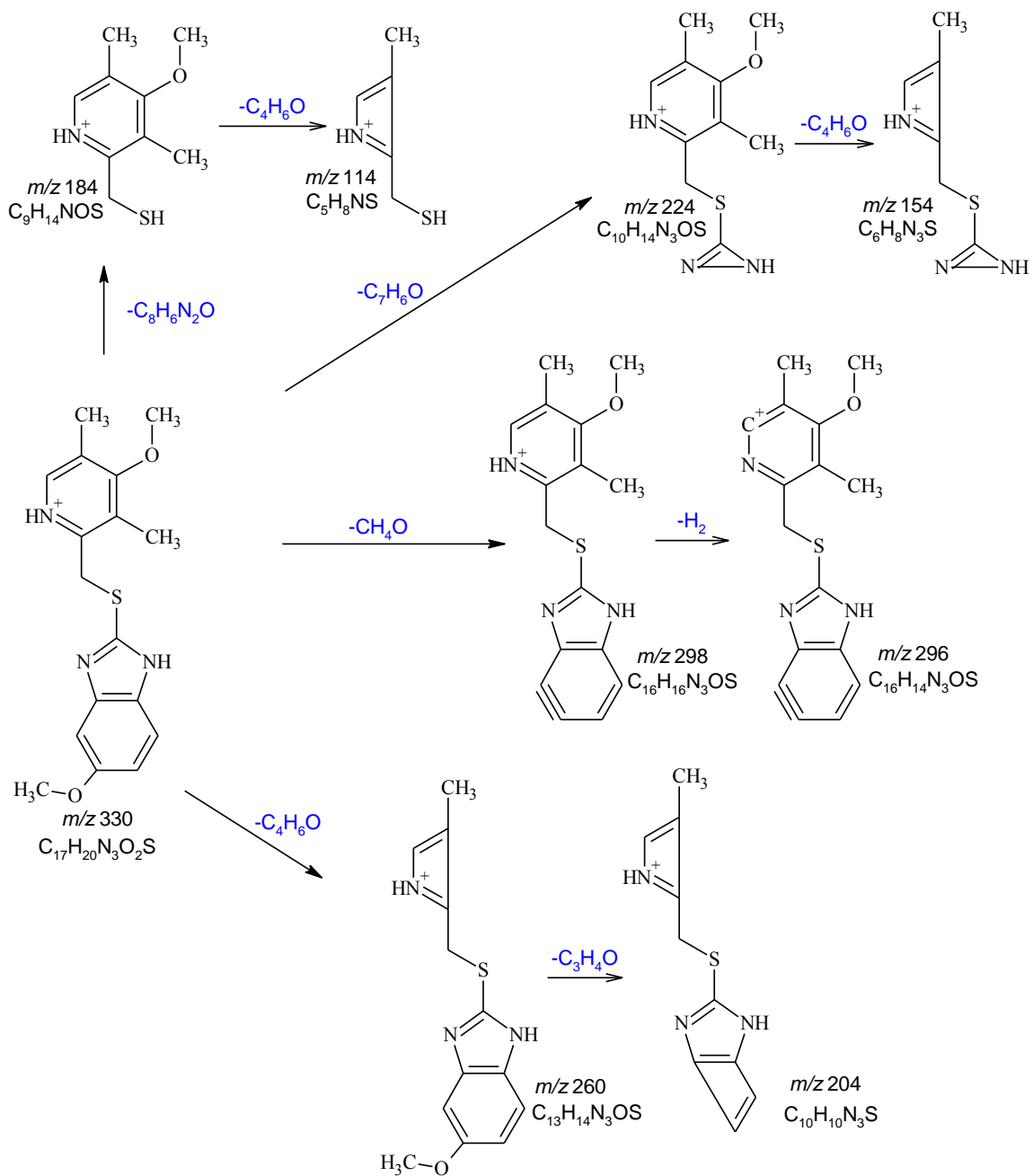
Jedinjenje:	Prekurzor jon		Glavni fragmentni joni dobijeni od roditeljskog molekulskog jona															
	t_R	CID(eV)	m/z	346	198	190	180	168	165	150	136	122	108					
Esomeprazol	11,56	55	m/z	346	198	190	180	168	165	150	136	122	108					
			I	100	65	45	41	57	10	47	100	44	7					
N-Metil Ome.	12,37	23	m/z	360	342	310	281	215	207	198	180	164	150	136	134			
			I	11	10	5	11	10	6	67	63	69	30	15	8			
Nečistoća A	4,28	20	m/z	181	180	168	165	139	137	124	110	96	80	68	57			
			I	32	95	47	100	39	57	7	8	4	8	3	2			
Nečistoća B	11,10	18	m/z	316	206	178	136	130	126	103								
			I	95	24	6	100	73	27	92								
Nečistoća C	14,73	20	m/z	330	319	310	296	213	203	156								
			I	41	40	43	100	8	98	36								
Nečistoća D	11,77	20	m/z	362	257	280	256	222	216	206	200	150						
			I	53	10	5	100	25	5	50	4	35						
Nečistoća E	8,60	12	m/z	362	361	334	297	287	282	246	236	213	186	153	126	106		
			I	100	37	7	10	47	5	91	65	9	43	14	4	17		
Nečistoća F	18,44	18	m/z	312	270	231	189	179	161	140	134							
			I	100	74	90	99	16	35	3	91							
Nečistoća G	18,91	18	m/z	312	261	227	220	210	138	89	79	57						
			I	17	24	20	17	100	25	39	87	98						
Nečistoća H	14,19	23	m/z	350	321	290	212	201	166	95								
			I	53	99	58	53	7	56	74								
Nečistoća I	9,00	18	m/z	378	342	256	200	115	83									
			I	40	11	7	93	100	6									
4-Hidroksi Ome. Sulfid	7,92	20	m/z	316	341	114	103	57										
			I	100	18	60	4	50										



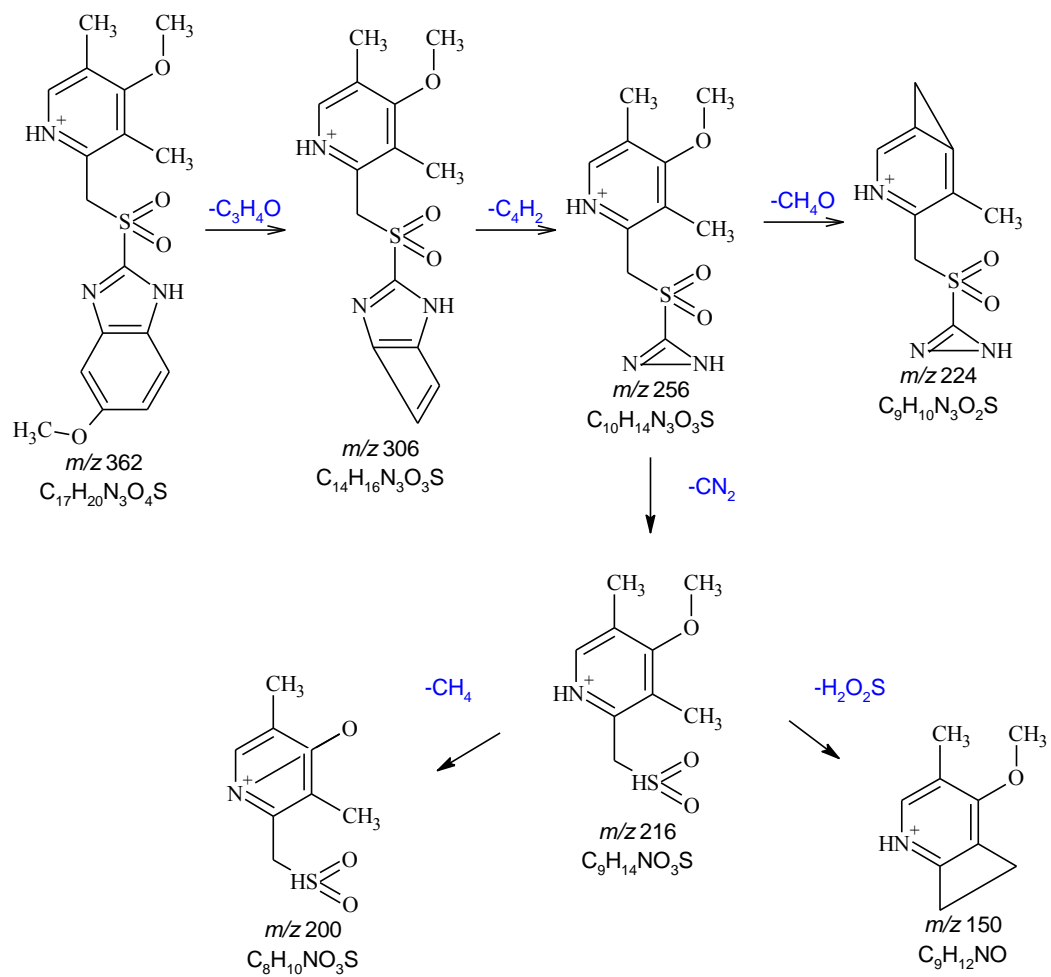
Slika 4.34 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuskog jona $(M+H)^+$ N-Metil-Omeprazola (m/z 360) pri CID 23eV.



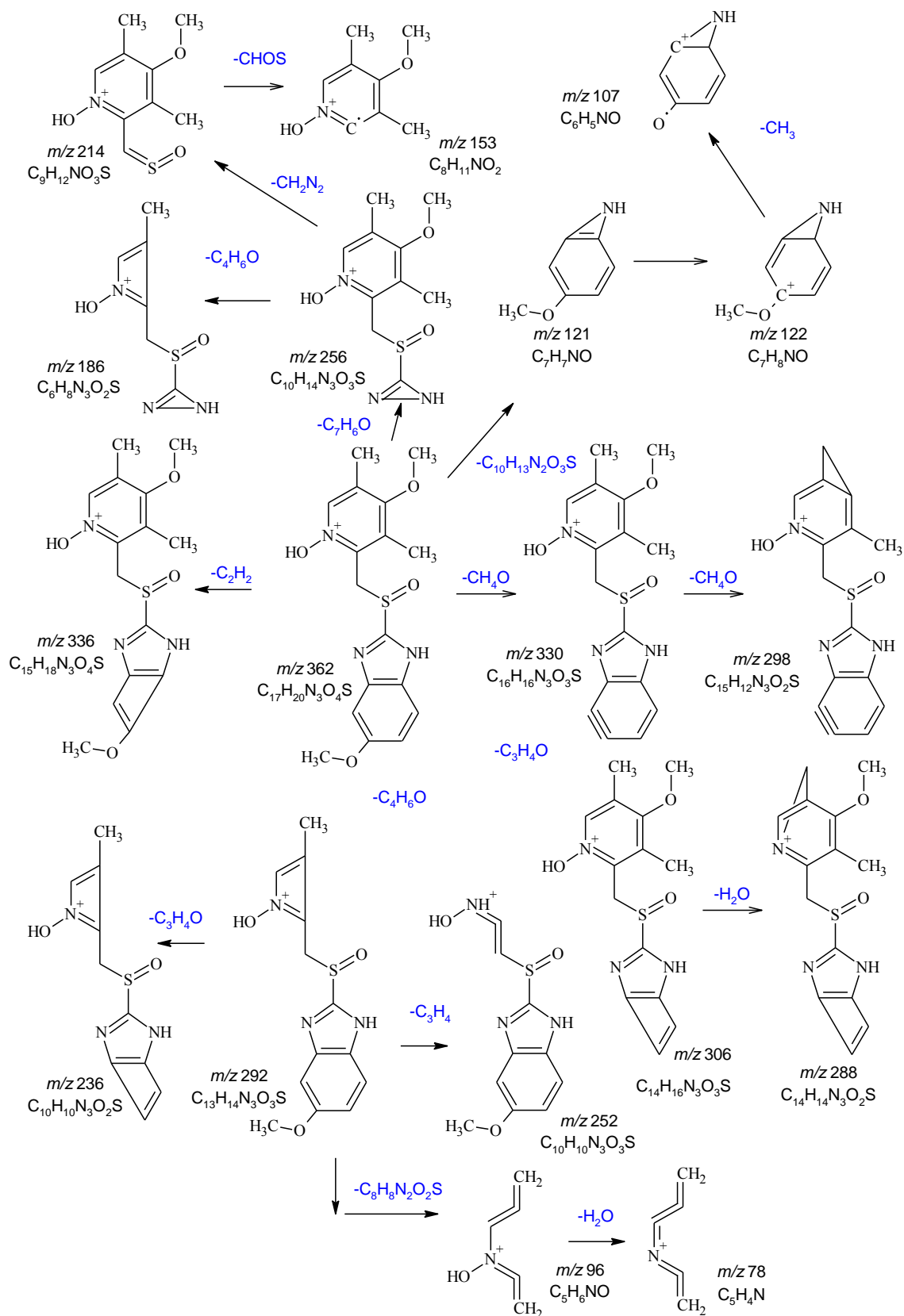
Slika 4.35 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuskog jona $(M+H)^+$
 Nečistoće A (m/z 181) pri CID 20eV



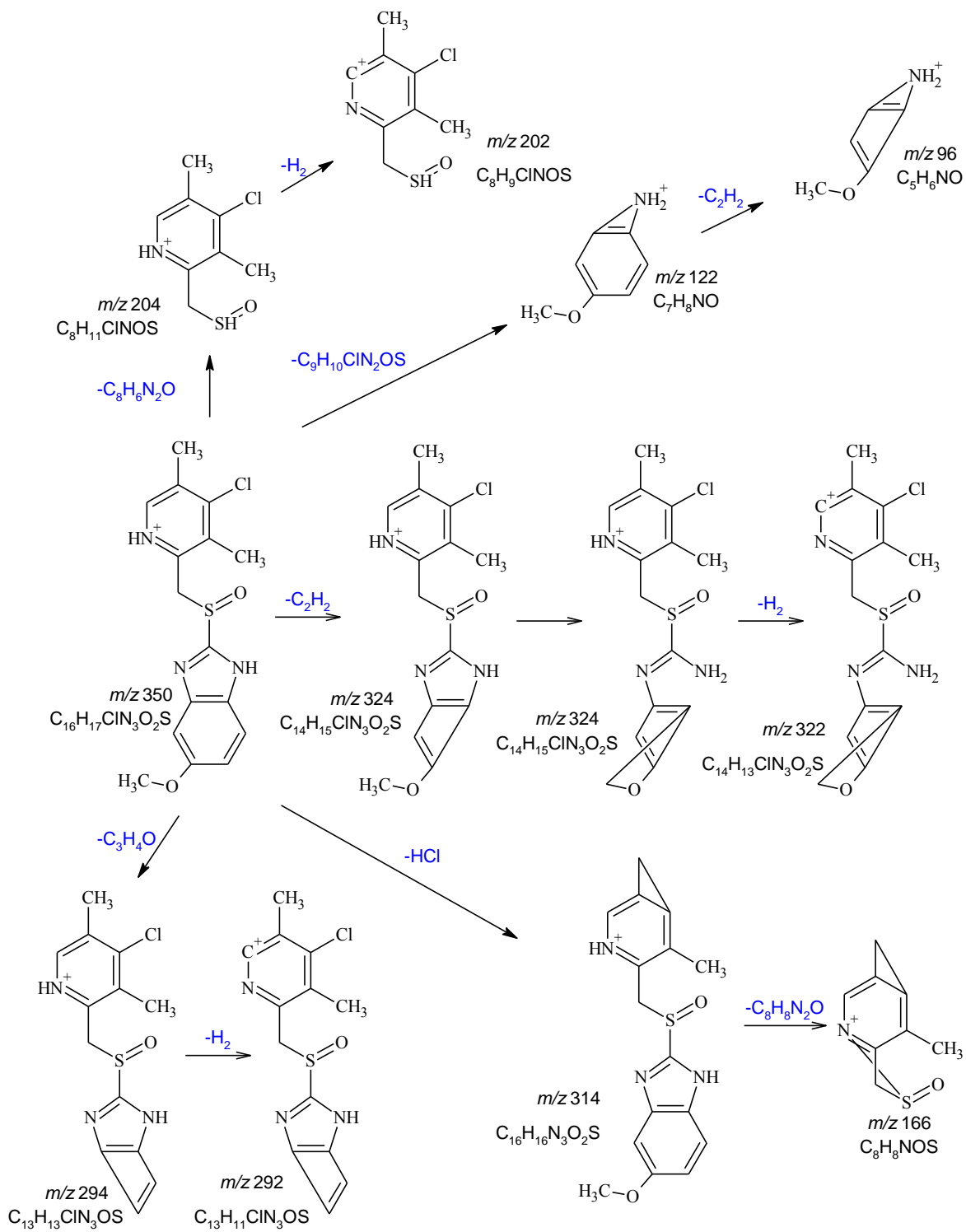
Slika 4.36 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuskog jona (M+H)⁺ Nečistoće C (m/z 330) pri CID 20eV



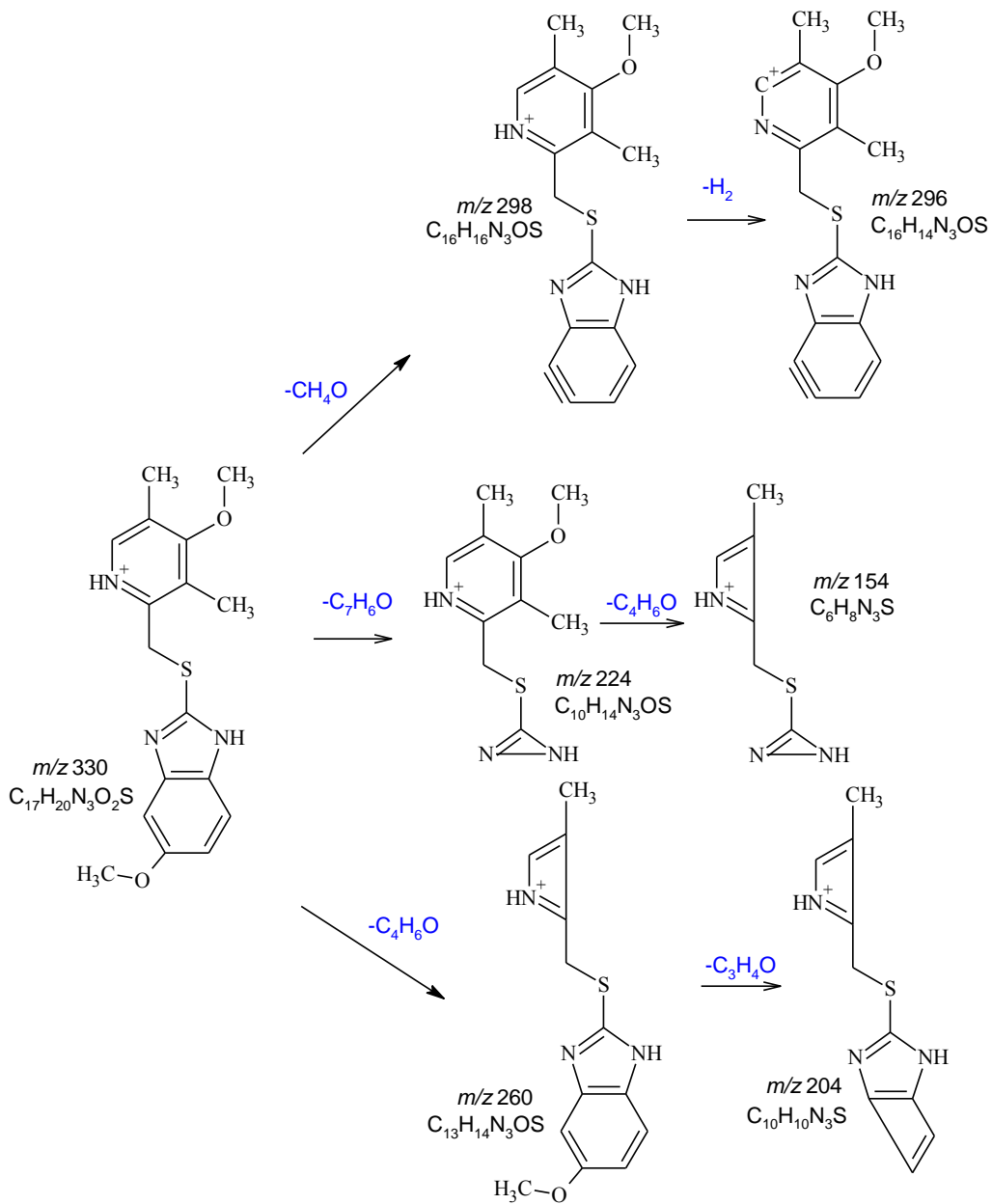
Slika 4.37 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuskog jona $(M+H)^+$
 Nečistoće D (m/z 362) pri CID 20eV



Slika 4.38 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuloskog jona $(M+H)^+$ Nečistoće E (m/z 362) pri CID 12 eV



Slika 4.39 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuloskog jona $(M+H)^+$ Nečistoće H (m/z 350) pri CID 23eV



Slika 4.40 Postulirani fragmentacioni obrazac molekuskog jona $(M+H)^+$ Nečistoće I (m/z 330) pri CID 18eV

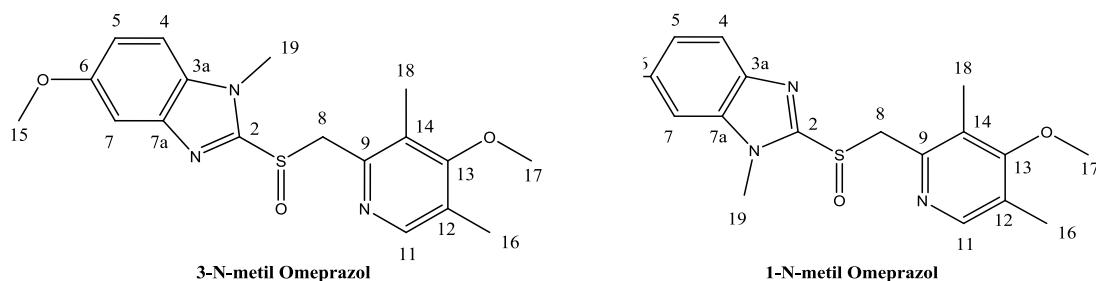
4.6 Studije izolacije i objašnjenja strukture glavnih degradacionih proizvoda esomeprazola

4.6.1 Objašnjenje strukture nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 1.16

Bilo je više neuspješnih pokušaja u traženju uslova forsirane degradacije koji bi dali razgradne proizvode RRT 0.46 i RRT 1.16 u značajnijoj količini (bar u nivou od 5%) potrebne za dalje prečišćavanje i karakterizaciju. Izvođena je, najpre, termalna degradacija čvrstog esomeprazol natrijuma na $T=130\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od dva dana. Nakon prvih 12 h tretiranja razgradni proizvodi RRT 0.46 i RRT 1.16 su bili gotovo jedini degradacioni proizvodi koji se javljali, međutim daljim termalnim tretiranjem počele su da se favorizuju sporedne reakcije koje su vodile kompleksnijoj smeši razgradnih supstanci. Prisustvo velikog broja komponenti u razgrađenoj supstanci je činilo gotovo nemogućim razvoj pogodne semipreparativne HPLC metode za izolaciju razgradnih proizvoda RRT 0.46 i RRT 1.16. Bilo je nagoveštaja dobrog prinosa RRT 0.46 razgradnjom esomeprazola u jako koncentrovanom metanolskom rastvoru NaOH ali se i od ovoga odustalo. Zato se u rešavanju ovog problema pristupilo na drugačiji način, putem ciljane sinteze. Postavljena je pretpostavka (na osnovu ekvivalentnog stvaranja obe nečistoće) da se sa neke od dve metoksi grupe jednog molekula esomeprazola vrši metilacija jednog od dva imidazolskih N atoma druge molekule esomeprazola i stvara literaturno pominjani N-metil omeprazol [31]. Kako nam je standard 5-desmetil omeprazola bio na raspolaganju (jedan od glavnih metabolita omeprazola), i njegovo retenciono vreme nije odgovaralo ni jednom od ove dve nepoznate nečistoće, ostala je jedina mogućnost da se metilacija dešava sa metoksi grupe koja je na poziciji 4 uz stvaranje literaturno nepoznatog jedinjenja 4-hidroksi omeprazola.

Ljubaznošću Toronto Research Chemicals (TRC, Canada) i njihove specijalizovane laboratorije za uslužne sinteze, rađena je sinteza N-metil omeprazola. Za materijal koji nam je poslat hromatografski, referentnom HPLC metodom, dobijeno je isto retenciono vreme kao za nepoznati razgradni

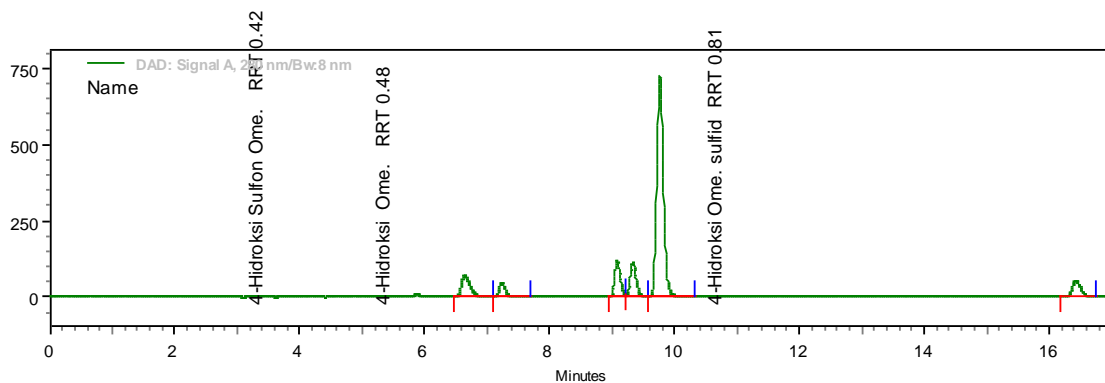
proizvod RRT 1.16. Dalje, materijal je nedvosmisleno okarakterisan kao N-metil omeprazolu na osnovu LC-HR/MS merenjem tačne molekulske mase i u više NMR eksperimenata. Tačnije, NMR studija je pokazala da je sintetisan materijal smeša izomera 1-N-metil omeprazola i 3-N-metil omeprazola, čije su strukturne formule prikazane na Slici 4.41. U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra ove smeše se uočavaju dva preklopljena singleta na δ 8,12 i 8,11 koji potiču od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze signali dva AMX sistema (po dva dubleta i po jedan dvostruki dublet). Ovi AMX spinski sistemi i vrednosti konstanti sprezanja odgovaraju 1,2,4-supstituciji na benzenovom prstenu. Dva preklopljena AB kvarteta na $\delta \sim 4,9$ potiču od H-8 metilenskih grupa oba jedinjenja. Protoni metilenske grupe su dijastereotopni i nalaze se u neposrednoj blizini stereocentra, pa nisu hemijski ekvivalentni i dolazi do geminalnog sprezanja između njih. Signali H-19 su pokazali NOESY korelacije sa H-4 (3-N-metil omeprazol), odnosno H-7 (1-N-metil Omeprazol), na osnovu čega su asignirani svi ostali signali ova dva jedinjenja. Takođe su uočene NOESY korelacije H-4/H-5, H15/H-7 i H-15/H-5 kod oba jedinjenja.



Slika 4.41 Strukturna formula 1-N-metil omeprazola, 3-N-metil omeprazola, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.27 i 4.28.

4.6.2 Objašnjenje strukture nepoznatih razgradnih proizvoda RRT 0.46, RRT 0.42, RRT 0.81

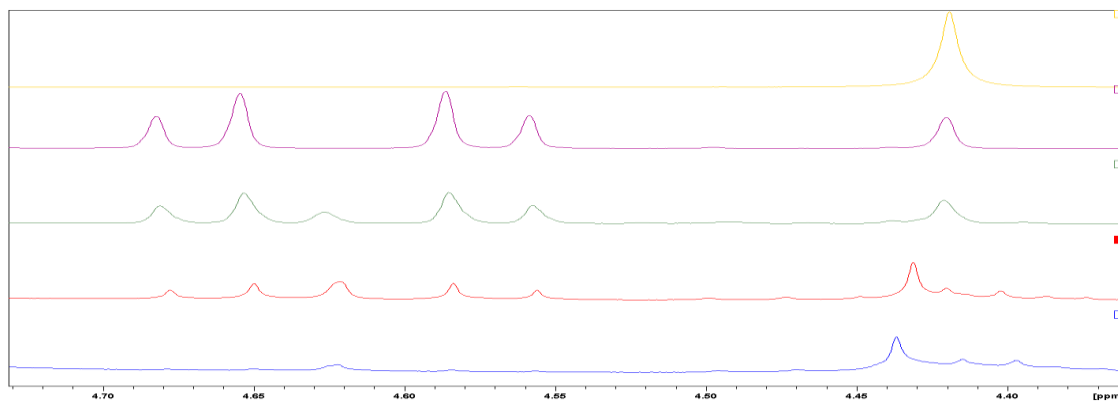
U laboratoriji Toronto Research Chemicals su umesto 4-hidroksi omeprazola sintetisali 4-hidroksi omeprazol sulfid uz sugestiju da dalju oksidaciju u 4-hidroksi omeprazol vršimo korišćenjem meta-hloroperoksibenzoeve kiseline (mCPBA). Za 4-hidroksi omeprazol su nam potvrdili nešto što smo i sami zapazili, da se ova komponenta može generisati za kratki period vremena u rastvorima (njen ranije zapažen prelaz u nečistoću RRT 0.42 i RRT 0.81) uz napomenu o njenoj nestabilnosti i u čvrstom stanju, što je i bio razlog ponuđenog načina sinteze. Ovakavo ponuđeno rešenje pokazalo se višestruko korisnim, jer se pokazalo da je 4-hidroksi omeprazol sulfid treći neidentifikovani razgradni proizvod koji se javlja na RRT 0.81. Sem toga, njegovom selektivnom oksidacijom sa mCPBA, kao prvi i glavni proizvod koji se javlja bila je upravo opaženi RRT 0.46, dok je daljom oksidacijom dolazilo do porasta četvrtog značajnog degradacionog proizvoda koja se detektuje na RRT 0.42 referentnom RP-HPLC metodom. Tok same reakcije 4-hidroksi omeprazola sulfid sa mCPBA praćen je referentnom RP-HPLC metodom kojom je utvrđen brzi prelaz komponente RRT 0.81 u komponentu RRT 0.46, i dalja konverzija u nepoznatu nečistoću RRT 0.42 (Slika 4.42). Sama reakcija je izvođena mešanjem 1,0 ml metanolnog rastvora 4-OH-omeprazol sulfida koncentracije 5 mg/ml sa 0,25 ml metanolng rastvora MCPBA koncentracije 14 mg /ml. Reakciona smeša je nakon 2 minuta na sobnoj temperaturi injektovana u hromatografski sistem koristeći referentnu HPLC metodu (Slika 4.42)



Slika 4.42 Oksidacija atoma sumpora 4-hidroksi omeprazola sulfida (RRT 0.81) sa mCPBA.

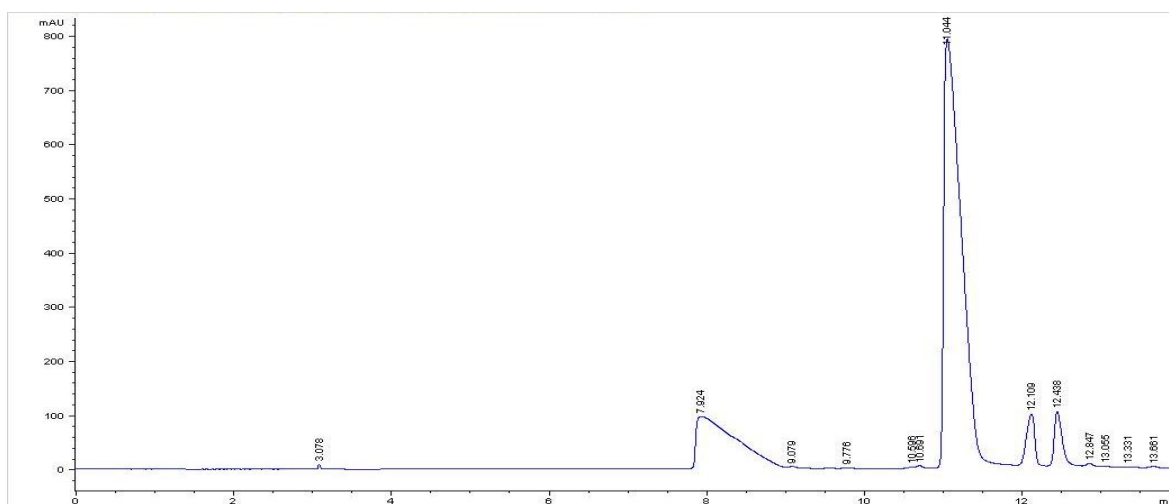
Ova reakcija 4-OH-omeprazol sulfida sa meta-hloroperoksibenzojevom kiselinom (mCPBA) ispitivana je dalje NMR, HPLC/DAD-ESI/ToF MS metodama. U zasićen rastvor 4-OH-omeprazol sulfida u CD₃OD (oko 5 mg u 450 μ l rastvarača) koji se nalazio u NMR kivetu dodata je ekvimolarna količina mCPBA. Temperatura je održavana na 10 °C. Reakcioni tok je praćen snimanjem ¹H, HSQC i HMBC NMR spektara u različitim vremenskim intervalima. U prva 2 min reakcije se pored signala H-8 4-OH-omeprazol sulfida na δ 4,41 s, javlja i signal H-8 4-OH-omeprazol sulfoksida (4,68-4,56 AB kvartet, J = 13,9 Hz). U narednih 40 min reakcije, sudeći po intenzitetu signala u ¹H NMR spektru, opada količina 4-OH-omeprazol sulfoksida. Nakon 60 min signali 4-OH-omeprazol sulfoksida potpuno iščezavaju, i postepeno se javljaju novi signali koji potiču od smeše daljih degradacionih proizvoda Slika 4.43 .

Za reakcionu smešu snimljeni su HPLC/DAD-ESI/ToF MS hromatogrami i maseni i UV spektri komponenti smeše. Na taj način izmerene su tačne mase i određene bruto formule komponenti: 4-hidroksi-omeprazol sulfida, 4- hidroksi -omeprazol sulfoksida i 4- hidroksi -omeprazol sulfona.

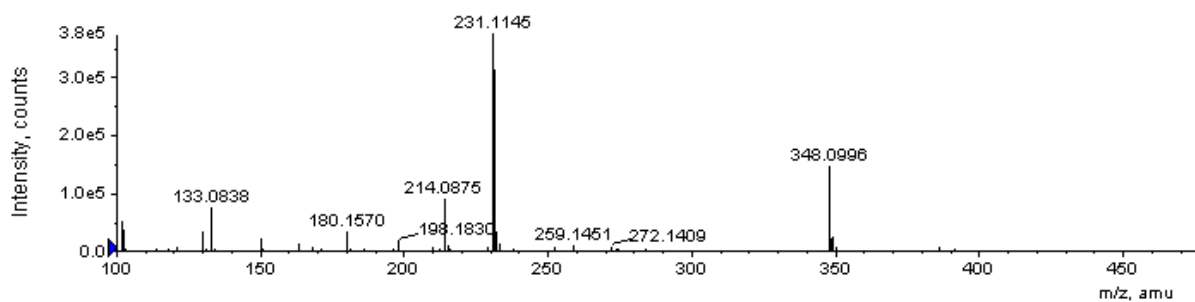


Slika 4.43 $^1\text{H-NMR}$ spektri smeše 4-OH-omeprazol sulfida i mCPBA (oblast 4,3 – 4,8 ppm), uporedni prikaz nakon 0, 2, 18, 42 i 62 min reakcije (u CD_3OD)

Dominantni proizvod dalje oksidacije 4-OH-omeprazol sulfida je 4-OH-omeprazol sulfon (RRT 0.42), koji je izolovan semipreparativnom HPLC tehnikom (Slika 4.36). Određena mu je tačna molekulska masa ($[\text{M}+\text{H}]^+$, izmereno 348,09991 (izračunato 348,10125) i bruto formula ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) dobijenog proizvoda su određene pomoću ESI/ToF masene spektrometrije (Slika 4.37 i 4.38), a struktura je utvrđena na osnovu 1D i 2D NMR (HSQC, HMBC) eksperimenata (Slike 4.38- 4.41 i Tabele 4.27 i 4.28.).

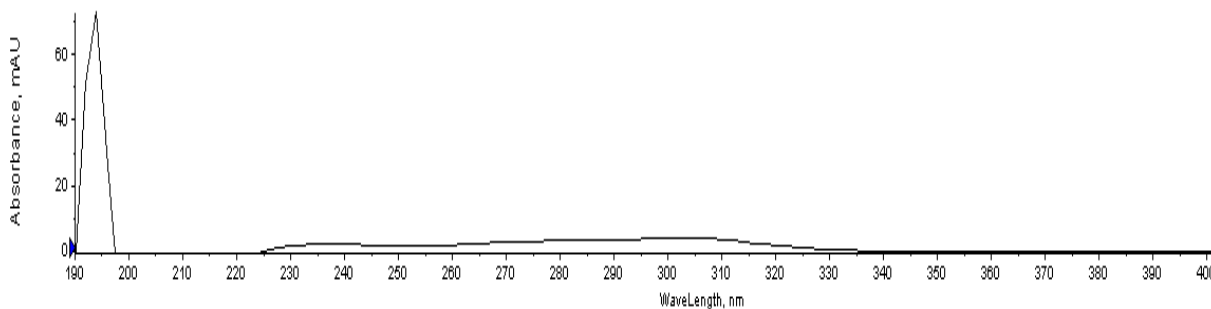


Slika 4.44 HPLC/DAD hromatogram reakcione smeše pri izolovanju 4-OH-omeprazol sulfona (RRT 0,42) na semi-preparativnoj koloni (pik na $t_r = 7,924$ min)

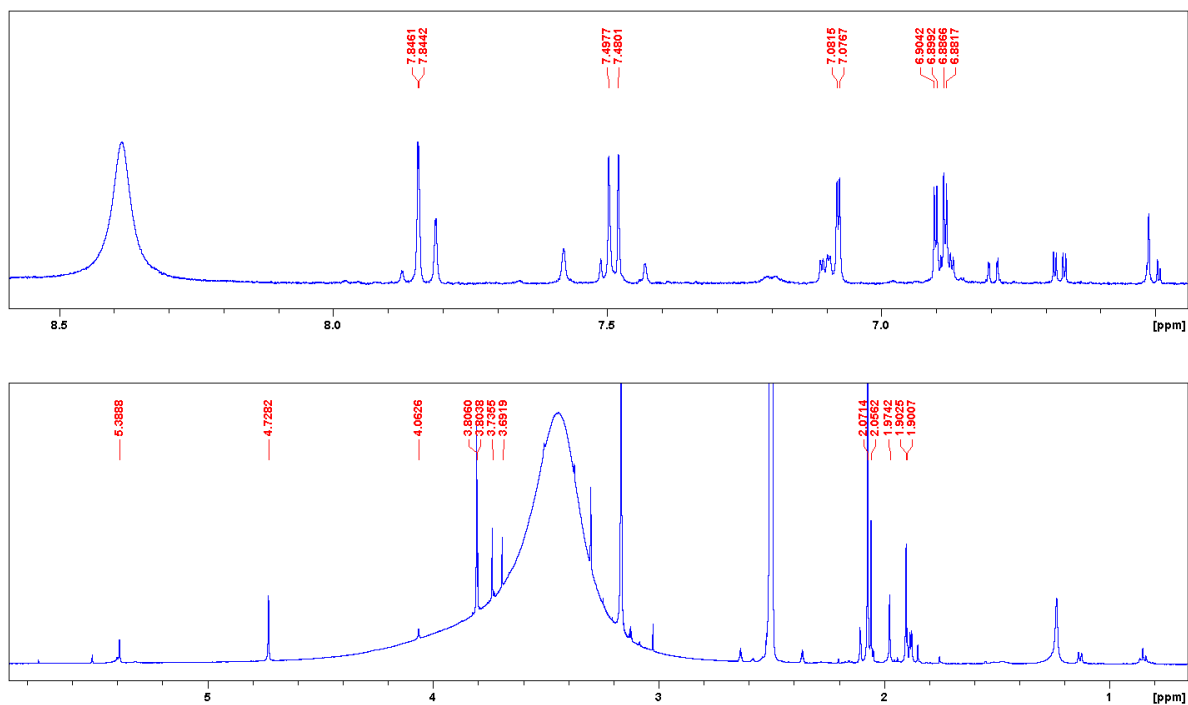


Bruto formula	Izračunata masa	Retenciono vreme (min)		
C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347.09398	5.97		
Joni	Izračunata masa jona	Izmerena masa jona	Greška (mDa)	Greška (ppm)
[M+H] ⁺	348.10125	348.09990	-1.35738	-3.90

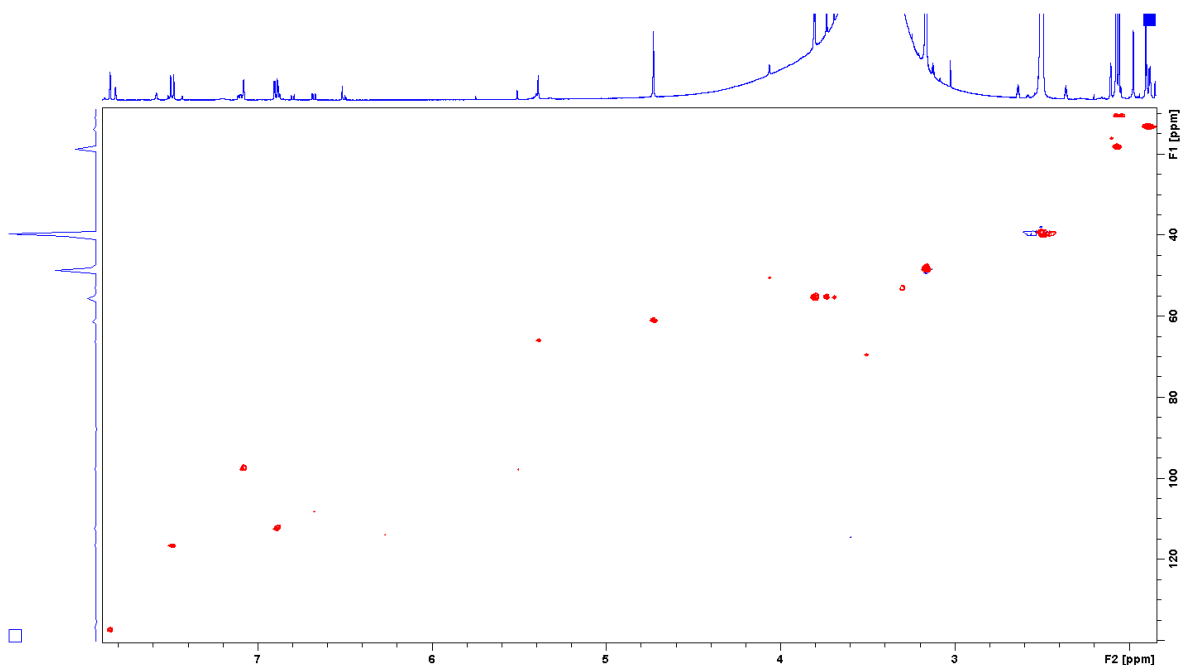
Slika 4.45 : ESI/ToF maseni spektar 4-OH-omeprazol sulfona (RRT 0.42), bruto formula i mase detektovanih jona



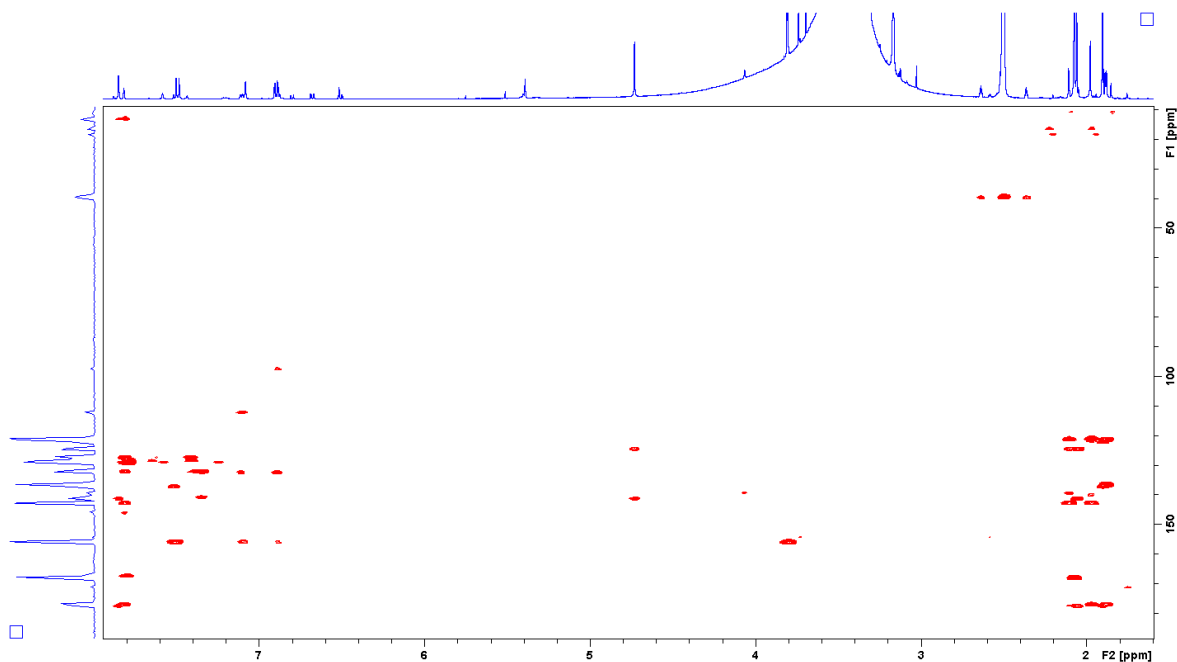
Slika 4.46 : HPLC UV DAD spektar 4-OH-omeprazol sulfona



Slika 4.47 $^1\text{H-NMR}$ spektar (u DMSO-d_6) frakcije RRT 0,42 posle razdvajanja reakcione smeše 4-OH-omeprazol sulfida i mCPBA na semi-preparativnoj HPLC koloni.



Slika 4.48 : HSQC spektar (u DMSO-d_6) frakcije RRT 0.42 posle razdvajanja reakcione smeše 4-OH-omeprazol sulfida i mCPBA na semi-preparativnoj HPLC koloni.



Slika 4.49 HMBC spektar (u DMSO- d_6) frakcije RRT 0.42 posle razdvajanja reakcione smeše 4-OH-omeprazol sulfida i mCPBA na semi-preparativnoj HPLC koloni.

Tabela 4.30. ^1H NMR podaci ispitivanih jedinjenja

^1H	4-OH-ome. sulfid, (u CD_3OD)	4-OH-ome. sulfoksid, (u CD_3OD)	4-OH-ome.sulfon, (u $\text{DMSO-}d_6$)
4	7,39 <i>br</i>	7,51 <i>br d</i> (8,8 Hz)	7,49 <i>d</i> (8,8 Hz)
5	6,85 <i>dd</i>	6,97 <i>br dd</i>	6,89 <i>dd</i>
7	6,98 <i>br</i>	7,06 <i>br</i>	7,08 <i>d</i>
8	4,41 <i>s</i>	4,68-4,56 AB (13,9 Hz)	4,73 <i>s</i>
11	7,61 <i>s</i>	7,62 <i>s</i>	7,85 <i>d</i> (1,0 Hz)
15	3,81 <i>s</i>	3,83 <i>s</i>	3,81 <i>s</i>
16	2,00 <i>s</i>	2,00 <i>s</i>	1,90 <i>s</i>
18	1,95 <i>s</i>	1,76 <i>s</i>	2,06 <i>s</i>

Tabela 4.31. ^{13}C NMR podaci ispitivanih jedinjenja.

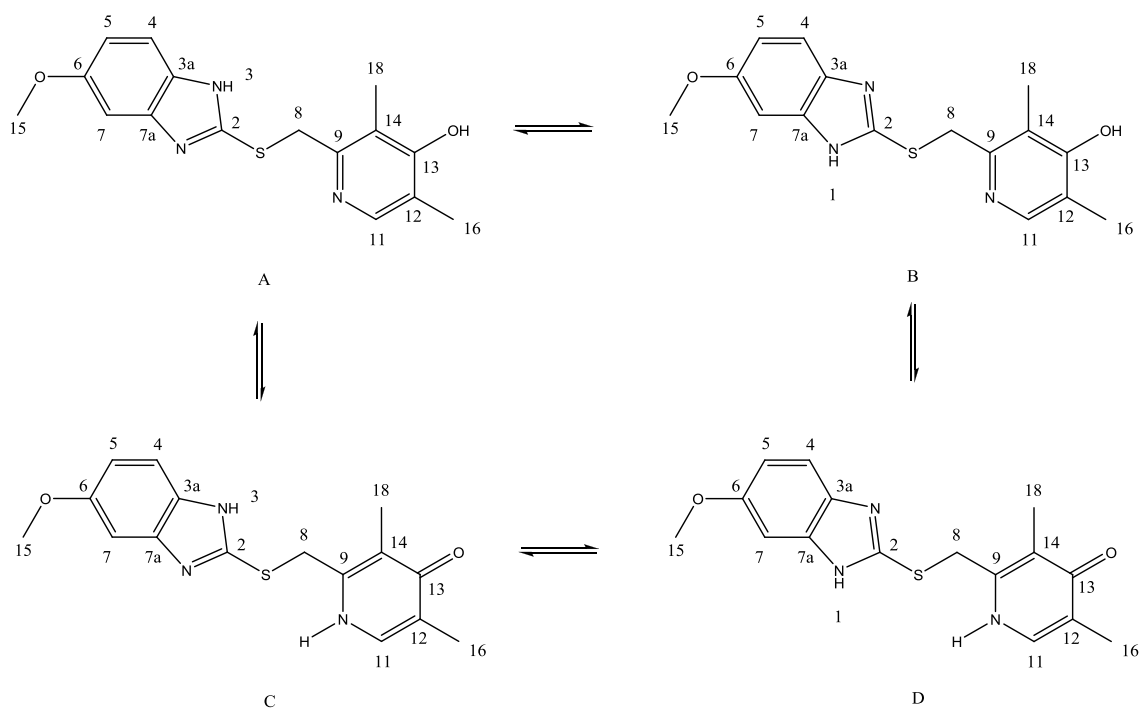
C	4-OH-omeprazol sulfid, (u CD_3OD)	4-OH-omeprazol sulfoksid, (u CD_3OD)	4-OH-omeprazol sulfon, (u $\text{DMSO-}d_6$)
2	n.d.	152,0	n.d.
3a	n.d.	n.d.	132,4
4	n.d.	n.d.	116,7
5	113,5	115,8	112,3
6	158,5	159,5	156,0
7	95,0	97,4	97,7
7a	n.d.	n.d.	137,4
8	34,0	56,7	61,1
9	144,6	137,4	141,3
11	136,1	137,0	137,3
12	124,9	125,5	122,0
13	180,6	180,0	177,4
14	124,4	126,9	124,6
15	56,2	56,2	55,5
16	14,1	14,0	13,4
18	10,9	11,4	10,6

n.d. - nije detektovan

4.6.2.1 NMR spektri 4-hidroksid-omeprazol sulfida

U cilju praćenja ispitivane reakcije u NMR kivetu, najpre su snimljeni NMR spektri 4-OH-omeprazol sulfida, u CD₃OD kao rastvaraču.

Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru, dok su signali neprotovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru.



Slika 4.50 Strukturna formula tautomera 4-Hidroksi-omeprazol sulfid, sa asignacijama 1H i 13C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.30 i 4.31.

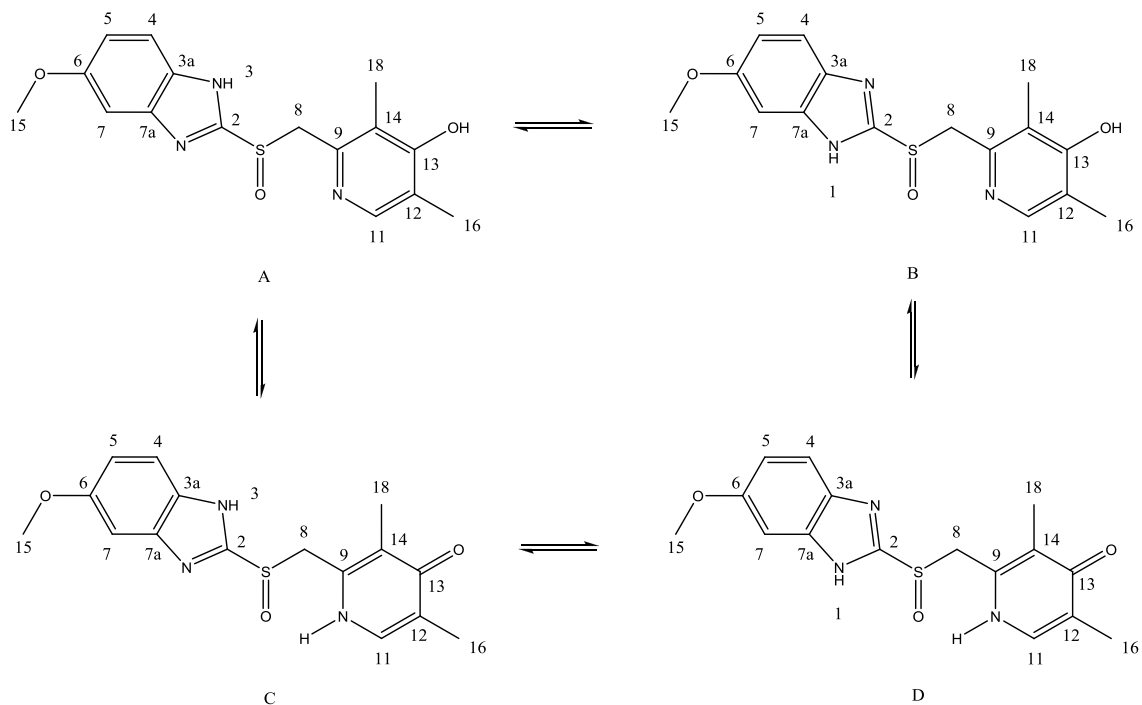
U aromatičnoj oblasti ¹H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 7,61 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se nalaze i jedan dvostruki dublet koji potiče od H-5 (δ 6,85, *J* = 2,4 i 8,8 Hz) i dva veoma

proširena signala (H-4 na δ 7,39 i H-7 na δ 6,98). Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomerije imidazolovog prstena, u režimu izmene srednje brzine. Pri tome su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta tautomerije, pa nisu detektovani signali C-2, C-3a, C-4 i C-7a u HSQC, odnosno HMBC spektrima. Signal ugljenika C-13 je na visokom hemijskom pomeranju (δ 180,6), na osnovu čega je utvrđeno prisustvo piridonskih tautomera (C i D). Kako ne postoji dodatni signal C-13, prisustvo 4-hidroksipiridinskih tautomera (A i B) je isključeno. Pošto protoni metilenske grupe H-8 nisu dijastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 4,41.

Metoksi grupa vezana za benzenovo jezgro (H-15) je identifikovana na osnovu HMBC korelacije sa C-6. U HMBC spektrima se takođe mogu uočiti korelacije metil-grupe H-16 sa C-12, C-11 i C-13 i metil-grupe H-18 sa C-9, C-13 i C-14.

4.6.2.2 NMR spektri 4- hidroksid -omeprazol sulfoksida

Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru (snimljen nakon 12 min od početka reakcije), dok su signali neprotonovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru (snimljen nakon 18 min od početka reakcije). Kako se 4-OH-omeprazol sulfoksid nalazi u reakcionoj smeši, bilo je neophodno razgraničiti njegove signale od signala ostalih jedinjenja prisutnih u reakcionoj smeši. Signal H₂-8 (AB kvartet na $\delta \sim 4,6$) je nedvosmisleno asigniran. Protoni ove metilenske grupe su dijastereotopni i nalaze se u neposrednoj blizini stereocentra (za razliku od ovih protona drugih sastojaka reakcione smeše), pa nisu hemijski ekvivalentni i dolazi do geminalnog sprežanja između njih ($J = 13,9$ Hz). U HMBC spektru je uočena korelacija signala H₂-8 sa C-14, C-9 i C-2. Metoksi grupa vezana za benzenovo jezgro (H-15) je takođe nedvosmisleno identifikovana na osnovu HMBC korelacije sa C-6.



Slika 4.51 Strukturna formula tautomera 4-Hidroksi-omeprazol sulfoksida, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.30 i 4.31.

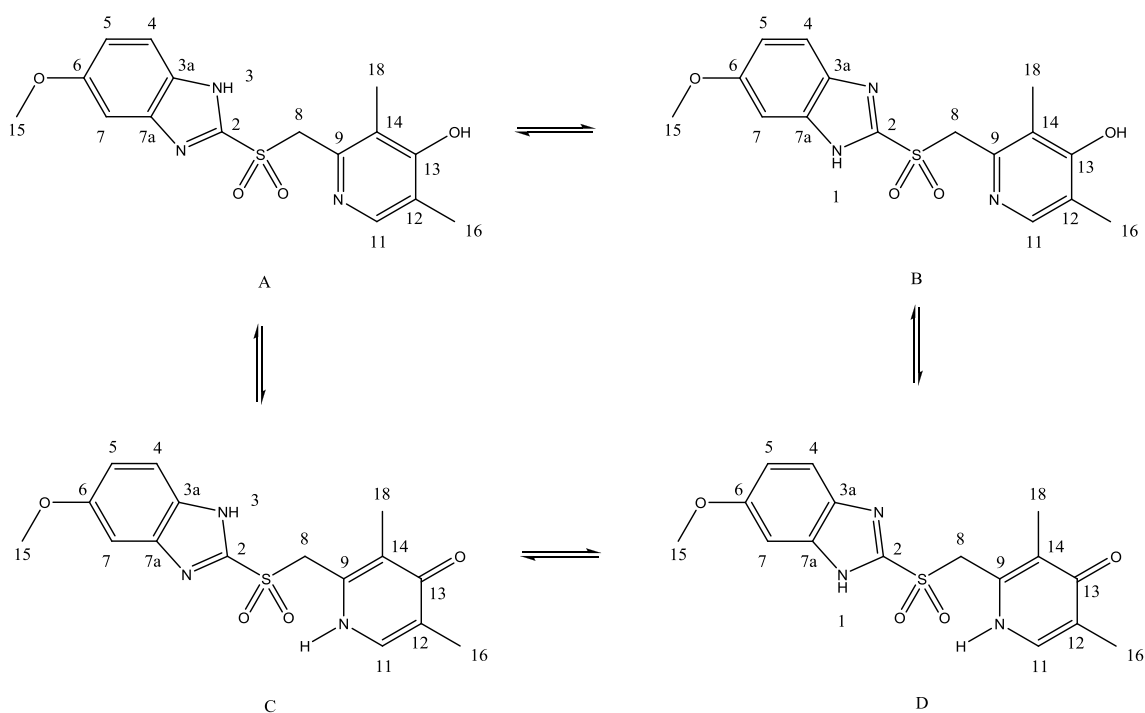
U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava singlet na δ 7,62 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan prošireni dvostruki dublet koji potiče od H-5 (δ 6,97, $J = 2,0$ i 8,8 Hz), prošireni dublet na δ 7,51 $J = 8,8$ Hz (H-4, HMBC korelacija sa C-6) i prošireni signal na δ 7,06 (H-7). Ovakav sistem koji se sastoji od širokih, nerazloženih linija se javlja usled pojave tautomerije imidazolovog prstena, u režimu izmene srednje brzine. Pri tome su ovim uticajem najviše zahvaćeni protoni i ugljenici koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta gde se tautomerizacija dešava, pa nisu detektovani signali C-3a, C-4 i C-7a u HSQC, odnosno HMBC spektrima. Signal C-13 je na visokom hemijskom pomeranju (δ 180,0), na osnovu čega je utvrđeno prisustvo piridonskih tautomera (C i D). Kako ne postoji dodatni signal C-13, prisustvo 4-hidroksipiridinskih tautomera (A i B) je isključeno. U HMBC

spektrima se takođe mogu uočiti korelacije metil-grupe H-16 sa C-12, C-11 i C-13 i metil-grupe H-18 sa C-9, C-13 i C-14.

4.6.2.3 NMR spektri 4- hidroksid -omeprazol sulfona (RRT 0.42)

Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru, dok su signali neprotovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru.

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan uski dublet na δ 7,61 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze jedan dvostruki dublet koji potiče od H-5 (δ 6,89, $J = 2,4$ i $8,8$ Hz) i dva dubleta (H-4 na δ 7,49, $J = 8,8$ i H-7 na δ 7,08, $J = 2,4$).

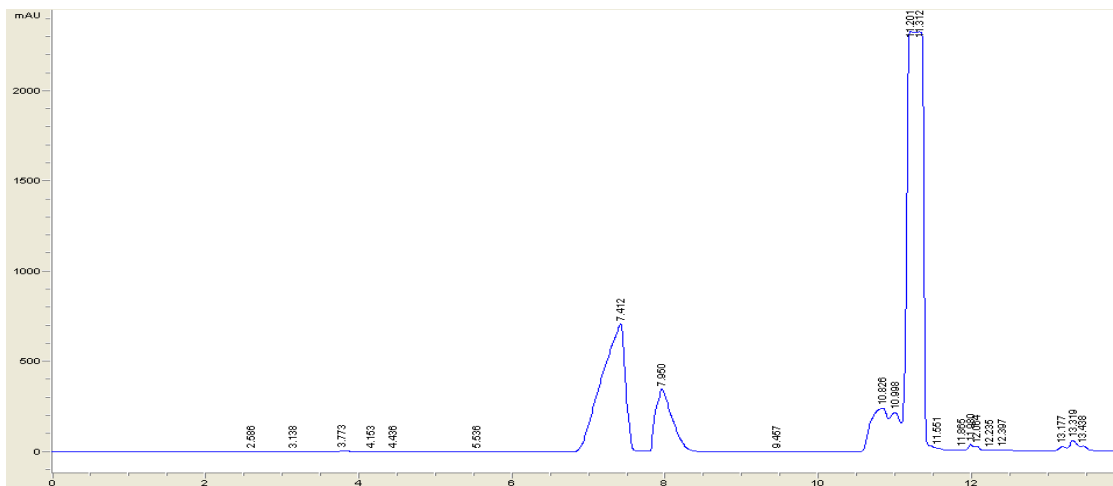


Slika 4.52 Strukturna formula tautomera 4-Hidroksi-omeprazol sulfoksida, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tabelama 4.30 i 4.31.

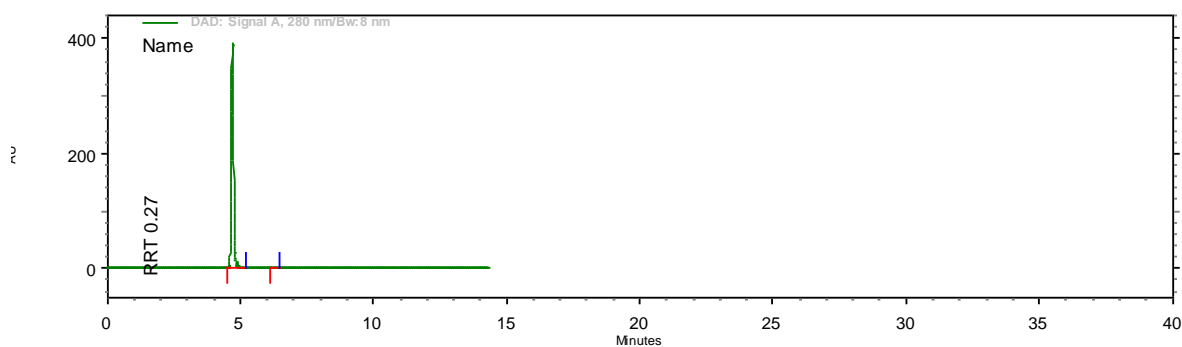
Signal ugljenika C-13 se nalazi na visokom hemijskom pomeranju (δ 177,4), na osnovu čega je utvrđeno prisustvo piridonskih tautomera (C i D). Kako ne postoji dodatni signal C-13, prisustvo 4-hidroksipiridinskih tautomera (A i B) je isključeno. Pošto protoni metilenske grupe H2-8 nisu dijastereotopni, njihov signal u ^1H NMR spektru se javlja kao singlet na δ 4,73. Metoksi grupa vezana za benzenovo jezgro (H-15) je identifikovana na osnovu HMBC korelacije sa C-6. U HMBC spektrima se takođe mogu uočiti korelacije metil-grupe H-16 sa C-12, C-11 i C-13 i metil-grupe H-18 sa C-9, C-13 i C-14. Signal angularnog ugljenika C-3a je identifikovan na osnovu HMBC korelacije sa H-7 i H-5, a C-7a sa H-4.

4.6.3 Izolacija i objašnjenje strukture nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0.27

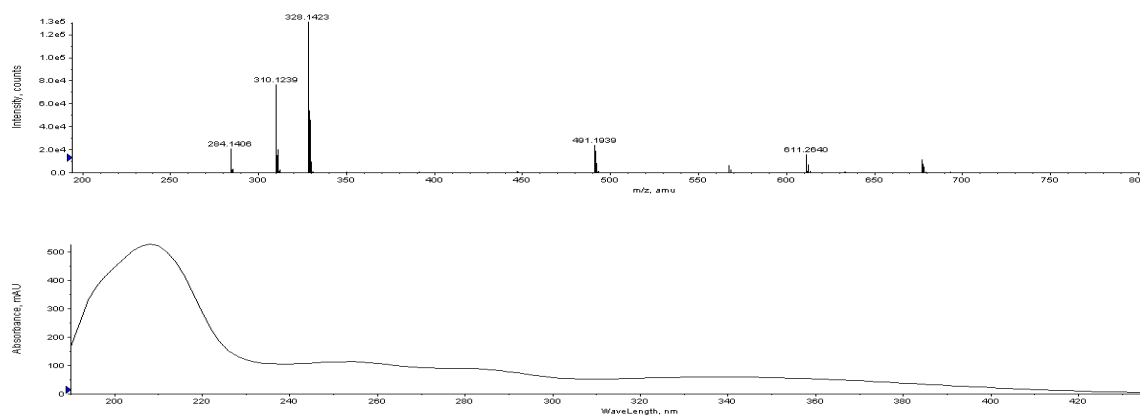
Ispitivan je proizvod razgradnje esomeprazola nastao u vodenom rastvoru koncentracije 8 mg/ml (pH = 9,4 sa 0,5M HCl) tokom 12 sati na 50°C. Dobijeni rastvor podvrgnut je hromatografskom razdvajanju tehnikom semipreparativne HPLC (Slika 4.44). Skupljana je frakcija „RRT 0,27“ u kojoj se javlja proizvod razgradnje, sa relativnim retencionom vremenom 0,27 referentnom HPLC metodom (Slika 4.45). Tačna masa (M^+ izmereno 328,1423; izračunato 328,1120) i bruto formula ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) dobijenog proizvoda su određene pomoću ESI/ToF masene spektrometrije (Slika 4.46). Na istom retencionom vremenu nije bilo moguće detektovati ovu hemijsku vrstu u negativnom ESI jonskom modu. Nakon uparavanja frakcije RRT 0,27 dobijeni proizvod je rastvoren u CD_3OD , nakon čega su snimljeni 1D i 2D NMR (HSQC, HMBC) spektri. Snimanjem masenog spektra uparene frakcije RRT 0,27 pomoću ESI/ToF masene spektrometrije je utvrđeno da se proizvod razgradnje esomeprazola dalje razgrađuje tokom procesa uparavanja.



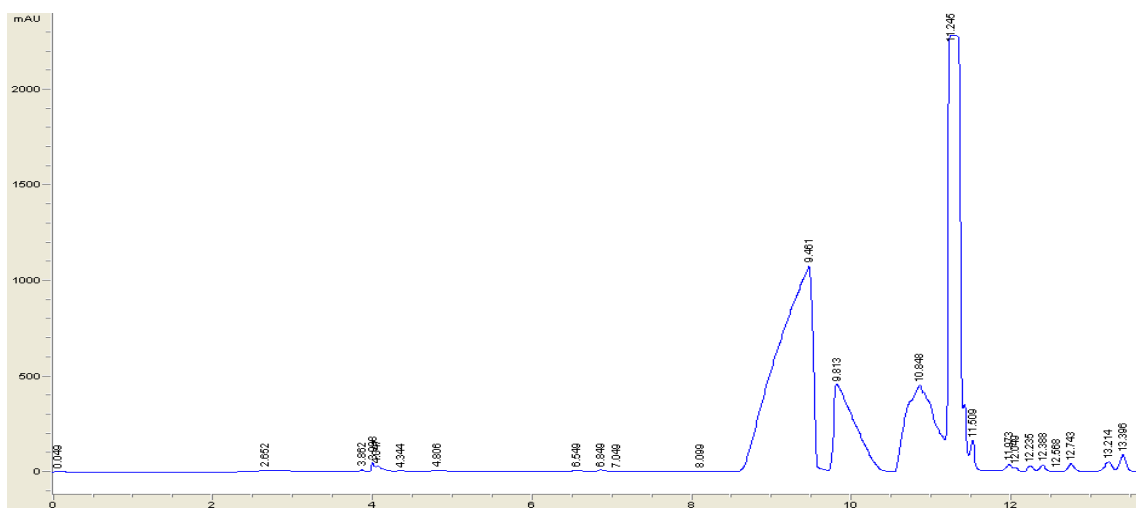
Slika 4.53 HPLC/DAD hromatogram reakcione smeše pri izolovanju komponente RRT 0.27 (na tr = 7,412 min) na semi-preparativnoj koloni



Slika 4.54 Izolovana frakcija komponente RRT 0.27 povratno analizirana referentnom metodom radi potvrde identiteta.



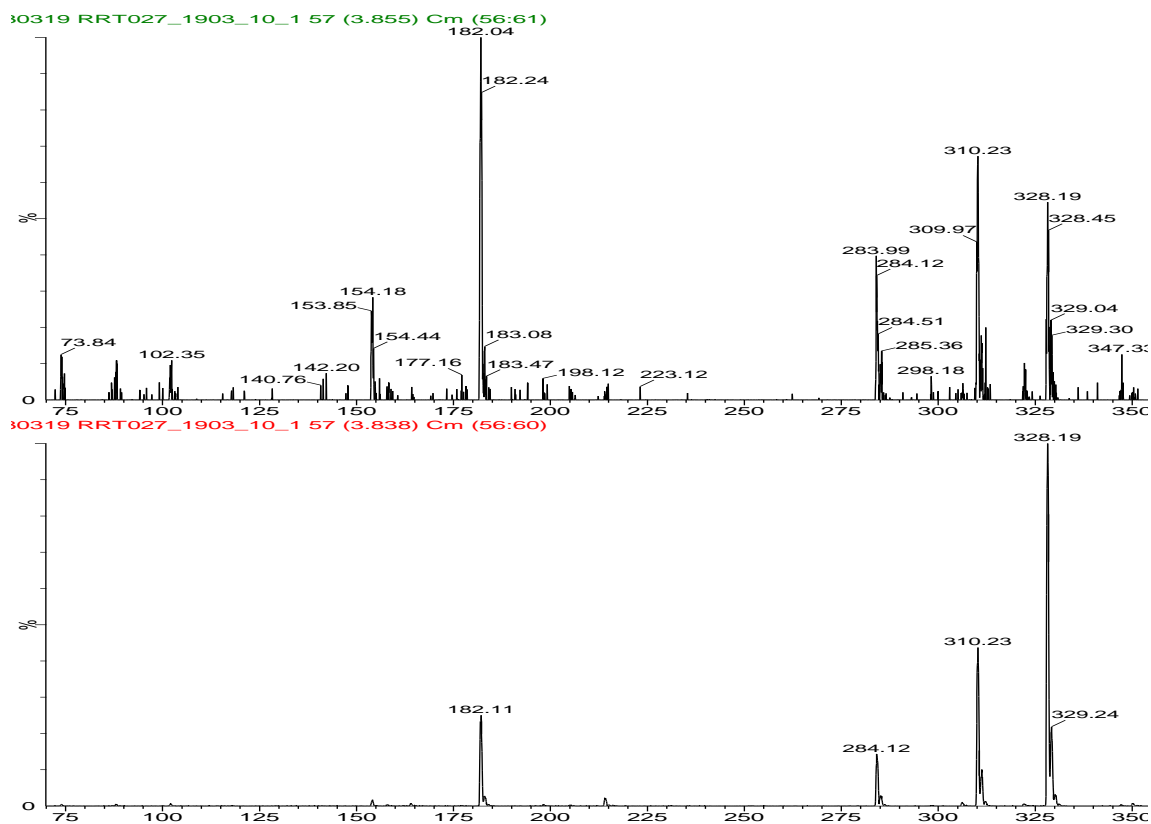
Slika 4.55 ESI+/ToF maseni spektar (gore) i HPLC/UV spektar (dole) frakcije RRT 0,27, neposredno po izolovanju



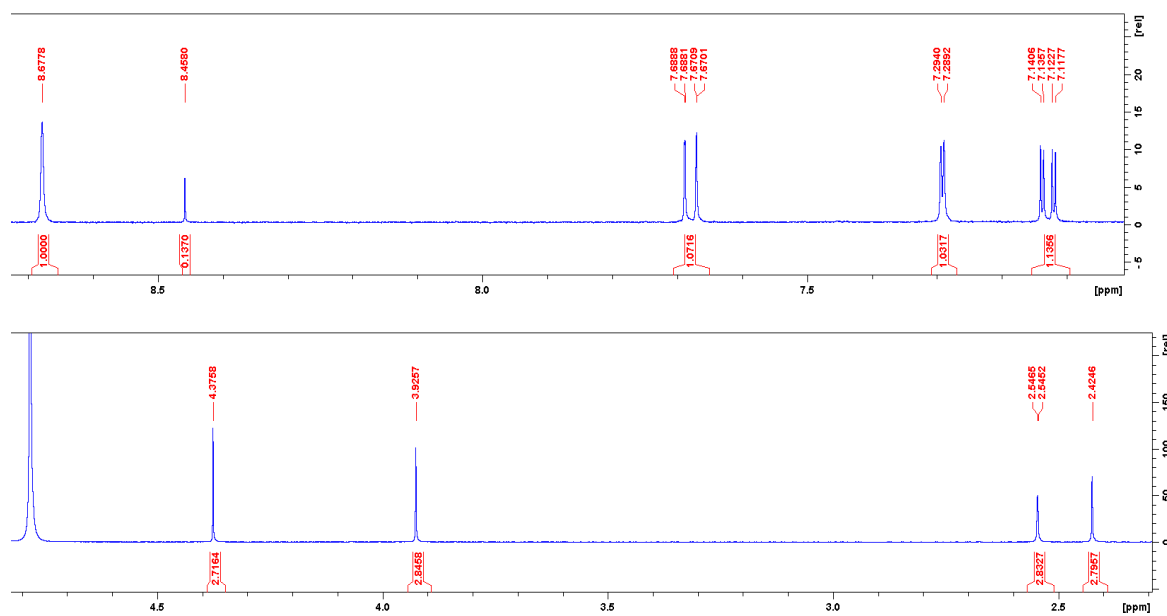
Slika 4.56 HPLC/DAD hromatogram reakcione smeše pri izolovanju komponente RRT 0.27 (na tr = 9,461 min) na semi-preparativnoj koloni uz korišćenje deuterisanih rastvarača

U cilju karakterizacije frakcije RRT 0.27 pomoću NMR spektroskopije, esomeprazol je razgrađen u D₂O (koncentracije 8 mg/ml, pH = 9,4 tokom 12 h na 50°C), a proizvod razgradnje izolovan tehnikom semipreparativne HPLC, koristeći deuterisane rastvarače (CD₃CN, D₂O) i aditive (mravlja kiselina-d₂ i amonijak-d₄) za eluiranje (Slika 4.47)

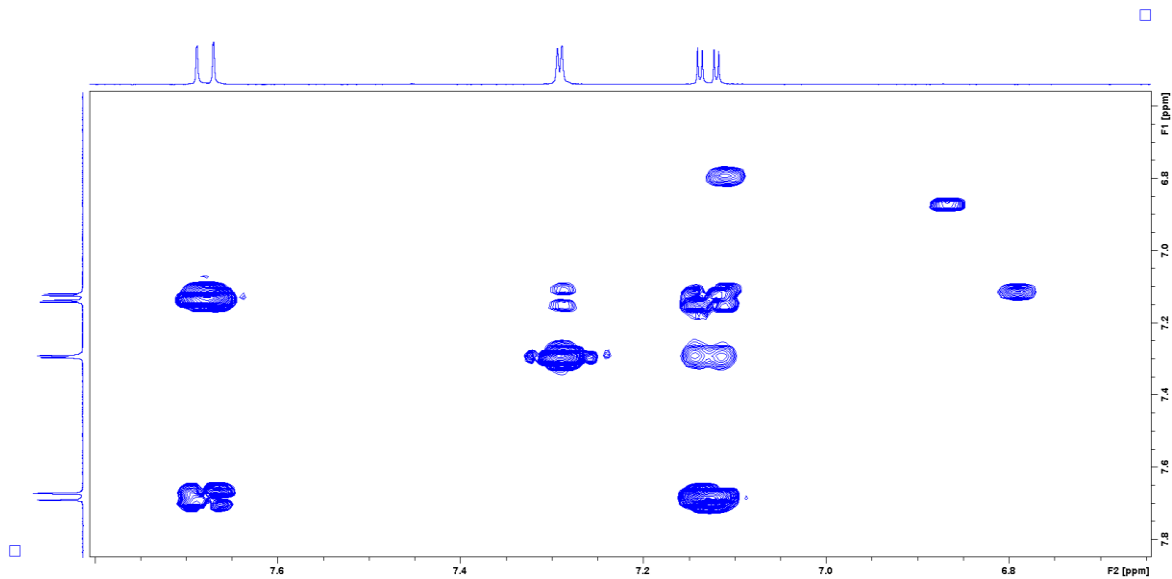
U ovom slučaju, proizvod razgradnje je samo delimično uparen, nakon čega su snimljeni ESI/APCI/QqQ maseni spektri (Slika 4.48), kao i ¹H-NMR i 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) spektri (Slika 4.49-4.53). Nakon snimanja NMR spektara (preko noći) uočeno je da se proizvod razgradnje esomeprazola dalje delimično razgrađuje.



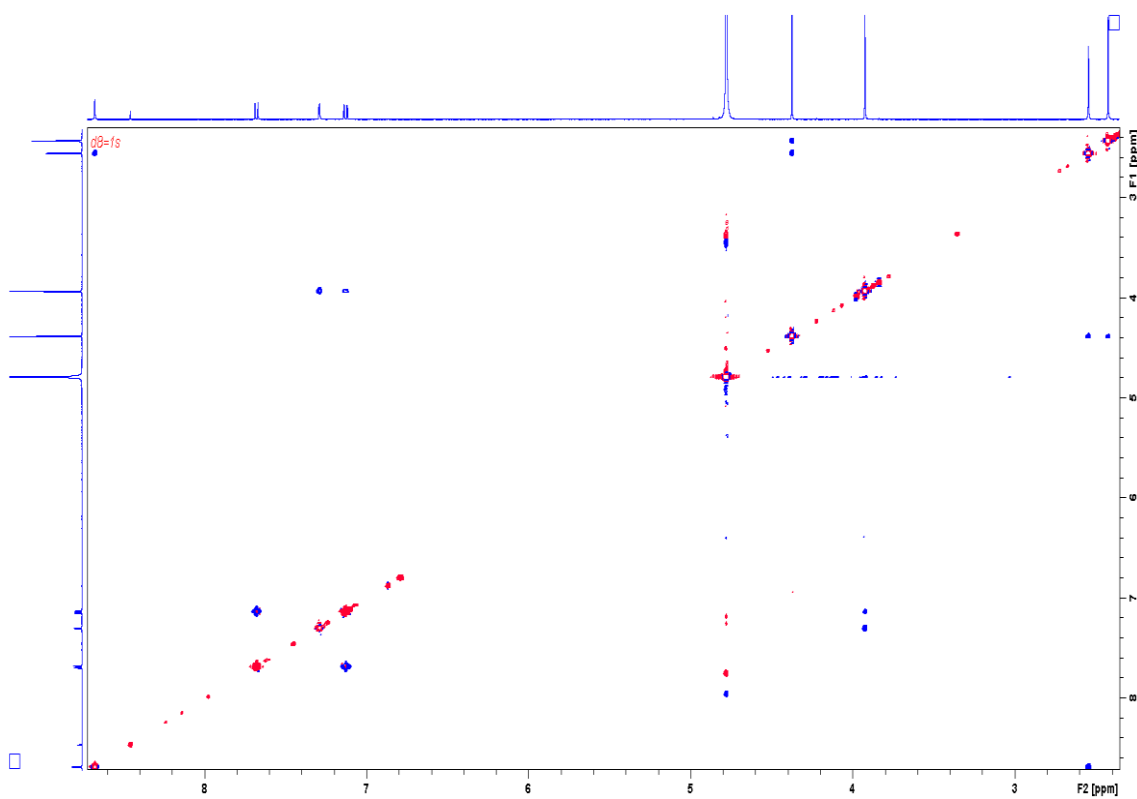
Slika 4.57 APCI/QqQ (gore) i ESI/QqQ (dole) maseni spektri proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, nakon semipreparativne hromatografije i pre snimanja NMR spektara. Molekulski jon na 328,19.



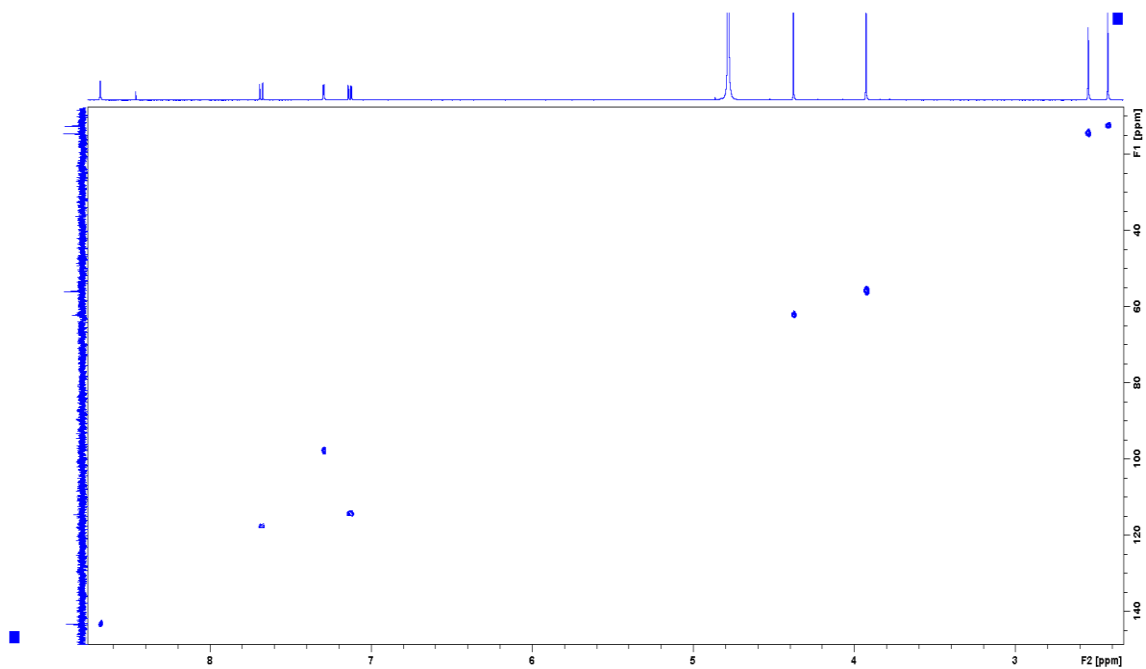
Slika 4.58 ¹H-NMR spektar proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, nakon semipreparativne hromatografije



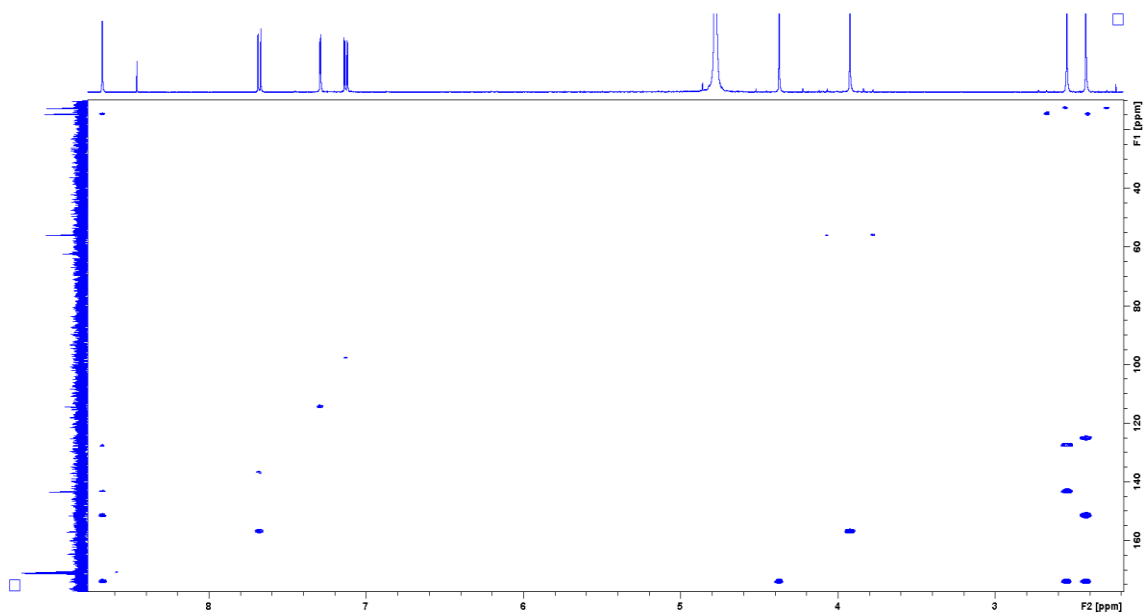
Slika 4.59 COSY spektar proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, nakon semipreparativne hromatografije



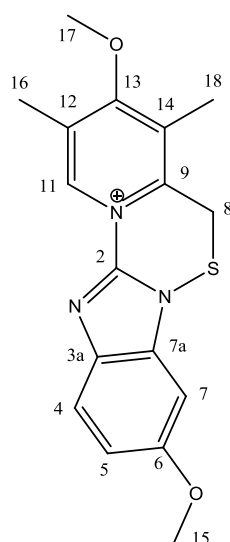
Slika 4.60 NOESY spektar proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, nakon semipreparativne hromatografije



Slika 4.61 HSQC spektar proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, nakon semipreparativne hromatografije



Slika 4.62 HMBC spektar proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, nakon semipreparativne hromatografije



Slika 4.63 Strukturna formula ciklični sulfenamid esomeprazola, sa asignacijama ^1H i ^{13}C NMR signala sa hemijskim pomeranjima datim u Tab. 4.32 i 4.33

Na osnovu analize dobijenih spektralnih podataka, zaključeno je da je kao proizvod razgradnje esomeprazola nastao ciklični sulfenamid esomeprazola bruto molekulske formule $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ sa strukturom prikazanom na Slici 4.63. Činjenica da je permanentni katjon objašnjava nemogućnost njegove detekcije u negativnom ESI-/ToF modu i nemogućnost njegove izolacije putem potpunog uparavanja rastvora.

Koncentracija frakcije RRT 0.27 nakon delimičnog uparavanja nije bila dovoljna da bi se snimio ^{13}C NMR spektar zadovoljavajućeg kvaliteta, pa su ^{13}C hemijska pomeranja određena indirektno. Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru, dok su signali neprotonovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru.

U aromatičnoj oblasti ^1H NMR spektra se uočava jedan singlet na δ 8,68 koji potiče od protona 11 iz piridinskog prstena. U istoj oblasti se još nalaze dva dubleta koji potiču od H-4 (δ 7,58, $J = 9,0$ Hz) i od H-7 (δ 7,29, $J = 2,5$ Hz), kao i dvostruki dublet koji potiče od H-5 (δ 7,13, $J = 2,5$ i $9,0$ Hz). Položaji metil i

metoksi grupa su određeni na osnovu HMBC korelacija odgovarajućih protona sa susednim ugljenicima koji se nalaze u aromatičnim jezgrima, kao i na osnovu NOESY korelacija koja upućuju na prostornu bliskost odgovarajućih protona (Tabela 4.32 i 4.33).

Tabela 4.32 ^1H NMR podaci, COSY i NOESY korelacije cikličnog sulfenamida esomeprazola izolovanog tehnikom semipreparativne HPLC (RRT 0.27)

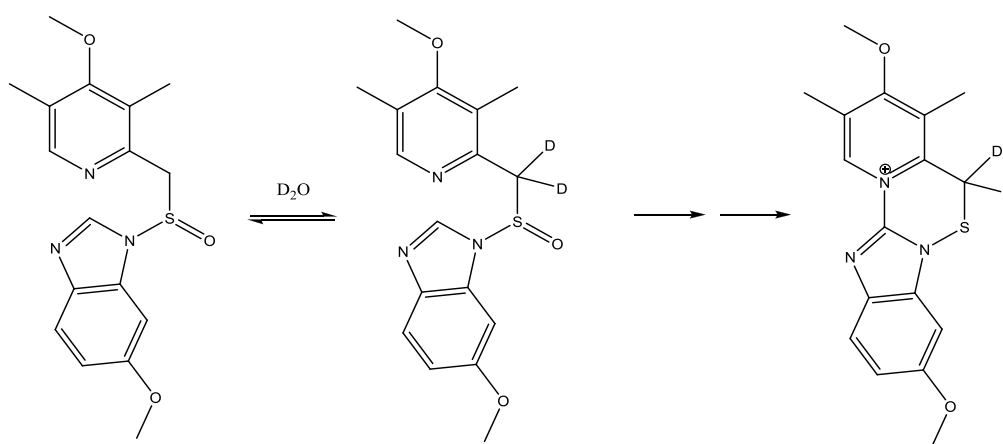
H	^1H	COSY	NOESY
4	7,58 <i>d</i> (9,0 Hz)	H-5	H-5, H-15
5	7,13 <i>dd</i> (9,0; 2,5 Hz)	H-4, H-7	H-4
7	7,29 <i>d</i> (2,5 Hz)	H-4	H-15
8	nije detektovan	-	-
11	8,68 <i>s</i>	-	H-16
15	3,93 <i>s</i>	-	H-7, H-5
16	2,55 <i>s</i>	-	H-11, H-17
17	4,38 <i>s</i>	-	H-16, H-18
18	2,42 <i>s</i>	-	H-17

Kako u ^1H NMR, kao i u HSQC, HMBC, COSY, NOESY spektrima izostaje signal H-8 pretpostavljeno je da tokom razgradnje esomeprazola u D_2O dolazi do izmene vodonika sa deuterijumom prema semi prikazanoj na Slici 4.64. Međutim, snimanjem ESI/APCI/QqQ masenog spektra dobijena je molekulska težina 328, što odgovara nedeuterisanom proizvodu. Kako je maseni spektar snimljen u vodenim uslovima, došlo je do zamene deuterijuma vodonikom (Slika 4.55). Da bi se ovo dokazalo, snimanje masenih spektara (LC-ESI/APCI/QqQ) je izvršeno koristeći deuterisane rastvarače kao mobilne faze (CD_3CN , D_2O), nakon čega je dobijena molekulska težina 330 (Slici 4.65).

Tabela 4.33 ^{13}C NMR podaci i HMBC korelacije cikličnog sulfenamida esomeprazola izolovanog tehnikom semipreparativne HPLC (RRT 0.27).

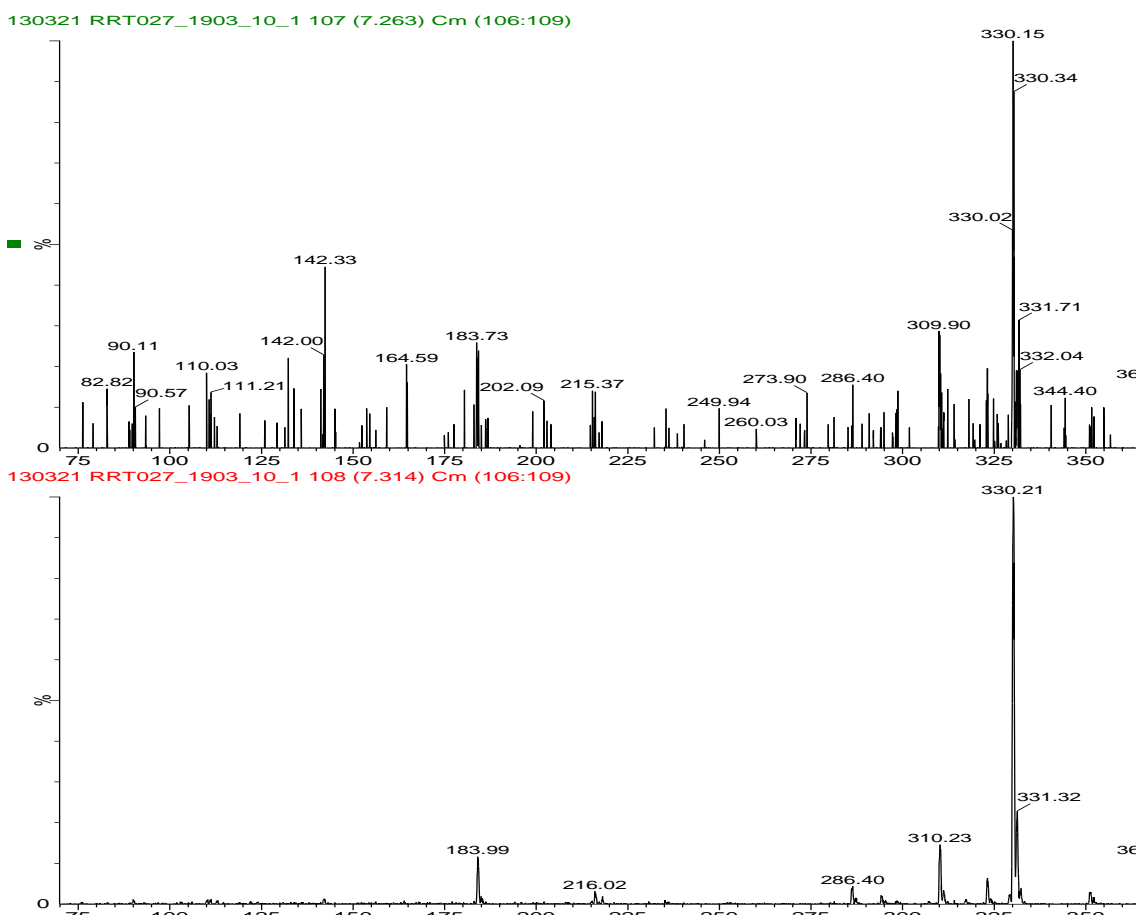
C	^{13}C	HMBC	C	^{13}C	HMBC
2	143,2	H-11	11	143,2	H-16
3a	n.d.	-	12	127,6	H-11, H-16
4	117,6	-	13	174,0	H-11, H-16, H-17,H-18
5	114,4	H-7	14	125,0	H-18
6	156,8	H-4, H-15	15	55,9	-
7	97,9	H-5	16	14,7	H-11
7a	136,7	H-4	17	62,1	-
8	n.d.	-			
9	151,6	H-11, H-18	18	12,6	-

n.d. – nije detektovan



Molekulska težina: 330

Slika 4.64 Poreklo cikličnog sulfenamida esomeprazola- d_2 u D_2O rastvorima



Slici 4.65 APCI/QqQ (gore) i ESI/QqQ (dole) maseni spektri proizvoda razgradnje esomeprazola u D₂O, snimano u deuterisanim mobilnim fazama. Molekulski jon na 330.21.

Radi dalje potvrde strukture i potpune karakterizacije, ciklični sulfenamid esomeprazola je sintetisan iz hidrohlorid - metanolnog rastvora esomeprazola, u stabilnijoj formi kao bortetrafluoridna so [139]. I u ovom slučaju, proizvod razgradnje je okarakterisan pomoću 1D i 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) spektroskopije i ESI/APCI/QqQ masene spektrometrije. Kako ova sinteza nije rađena u deuterijumskim uslovima, sada se signal H-8 može uočiti u NMR spektrima (Tabela 4.34). Količina supstance je u ovom slučaju bila dovoljna za snimanje ¹³C i DEPT spektara. U DEPT spektru se može uočiti prisustvo jedne metilenske grupe (C-8).

Tabela 4.34 ¹H NMR podaci, COSY i NOESY korelacije cikličnog sulfenamida esomeprazola sintetisanog u obliku bortetrafluoridne soli

H	¹ H	COSY	NOESY
4	7,46 <i>d</i> (9,0 Hz)	H-5	H-5, H-15
5	7,08 <i>dd</i> (9,0; 2,5 Hz)	H-4, H-7	H-4
7	7,07 <i>d</i> (2,5 Hz)	H-4	H-15
8	4,02 <i>s</i>	-	-
11	8,59 <i>s</i>	-	H-16
15	3,92 <i>s</i>	-	H-7, H-5
16	2,51 <i>s</i>	-	H-11, H-17
17	4,31 <i>s</i>	-	H-16, H-18
18	2,37 <i>s</i>	-	H-17

Tabela 4.35 ¹³C NMR podaci i HMBC korelacije cikličnog sulfenamida esomeprazola sintetisanog u obliku bortetrafluoridne soli

C	¹³ C	HMBC	C	¹³ C	HMBC
2	141,7	H-11	11	145,4	H-16
3a	131,7	H-7	12	127,6	H-11, H-16
4	117,7	-	13	173,4	H-11, H-16, H-17, H-18
5	114,8	H-7	14	130,8	H-8, H-18
6	157,2	H-4, H-7, H-15	15	55,9	-
7	97,5	H-5	16	14,7	H-11
7a	136,0	H-4	17	62,2	-
8	36,5	-	18	12,4	-
9	150,9	H-8, H-11, H-18			

Razlike u hemijskim pomezanjima između cikličnog sulfenamida esomeprazola se mogu objasniti različitim pH vrednostima uzoraka i različitim anjonima (pH = 6 za jedinjenje izolovano tehnikom semipreparativne HPLC u obliku kao formijatna i/ ili hloridna so, odnosno pH = 2 za sintetisano jedinjenje kao bortetrafluoridna so).

4.7 Putevi degradacije esomeprazola i njegovi glavni degradacioni proizvodi

Poreklo Nečistoće A, 5-Methoxy-1H-benzimidazole-2-thiola (označena sa „I“ na Slici 4.66) u finalnom proizvodu sinteze esomeprazola leži u činjenici da je ona jedan od polaznih materijala u njegovoj sintezi. Izvesna količina ovog polaznog materijala može ostati neizreagovana i na taj način prisutna u finalnom proizvodu. Rezultati izvedene foto degradacije iz ovog rada ukazuju da je ova komponenta, takođe, jedan od glavnih foto degradacionih proizvoda esomeprazola, uz izvesnu mogućnost nastajanja i u baznim uslovima razgradnje esomeprazola.

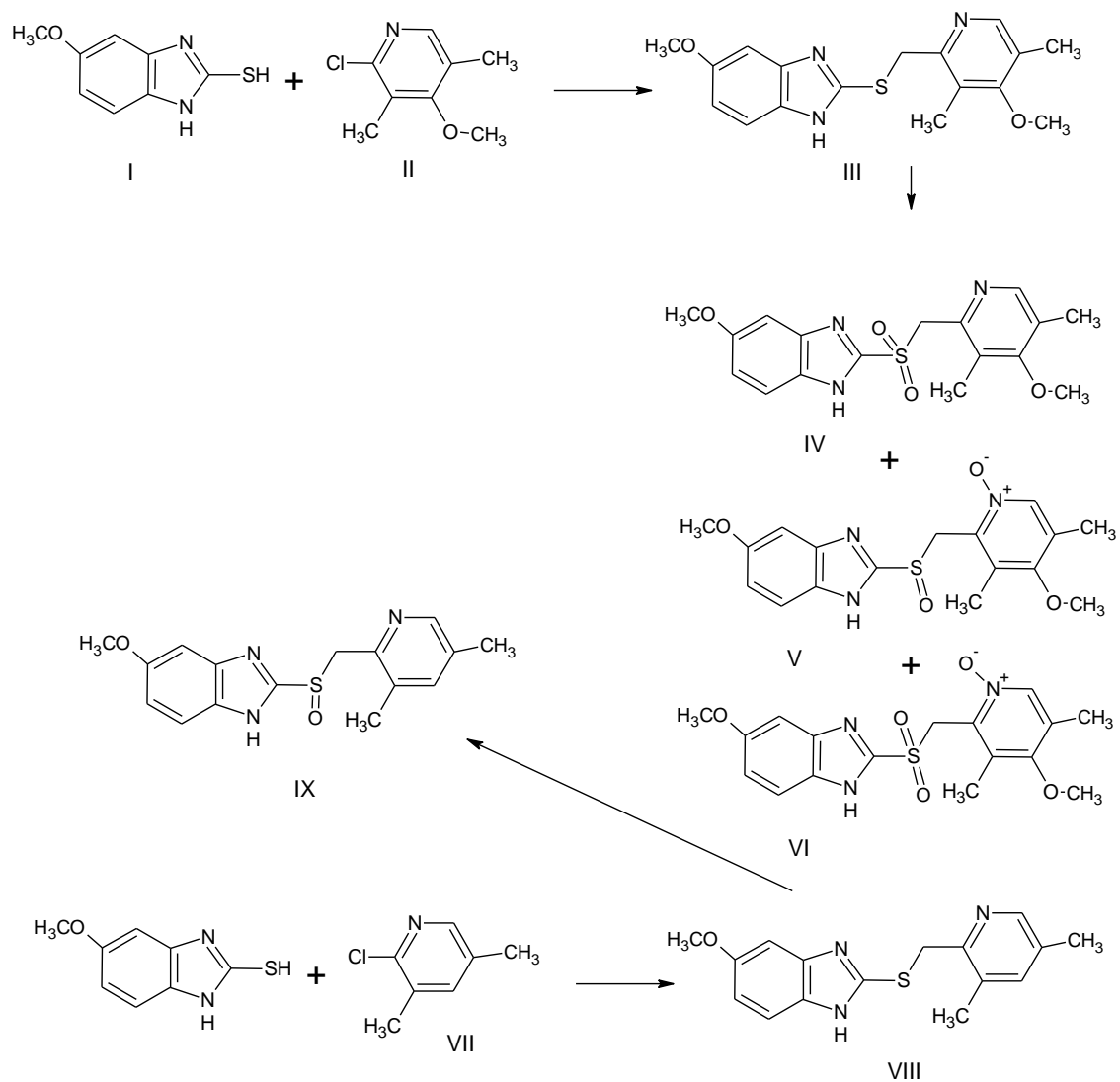
Nečistoća C je procesna nečistoća, 5-Methoxy-2-[[[4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl) methyl] sulphanyl]-1H-benzimidazol (označena sa „III“ Slici 4.57). Javlja se kao glavni intermedijer u procesu sinteze esomeprazole, tako da izvesna količina ovog intermedijera može ostati neizreagovana sa oksidirajućim reagensom javljajući se kao nečistoća u finalnom proizvodu sinteze. Međutim, ona je i jedan od glavnih razgradnih proizvoda pri kiselim i baznim uslovima razgradnje esomeprazole što smo pokazali u studijama forsirane degradacije u ovom radu.

Nečistoća D je, zajedno sa Nečistoćom E i Nečistoćom I, procesna nečistoća, (označene sa „IV“, „V“ i „VI“ Slici 4.66) proizvod prejakih uslova oksidacije intermedijera 5-Methoxy-2-[[[4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl) methyl] sulphanyl]-1H-benzimidazola. Međutim, uočeno je da se Nečistoća D javlja kao jedan od glavnih proizvoda razgradnje esomeprazola pri termalnim i

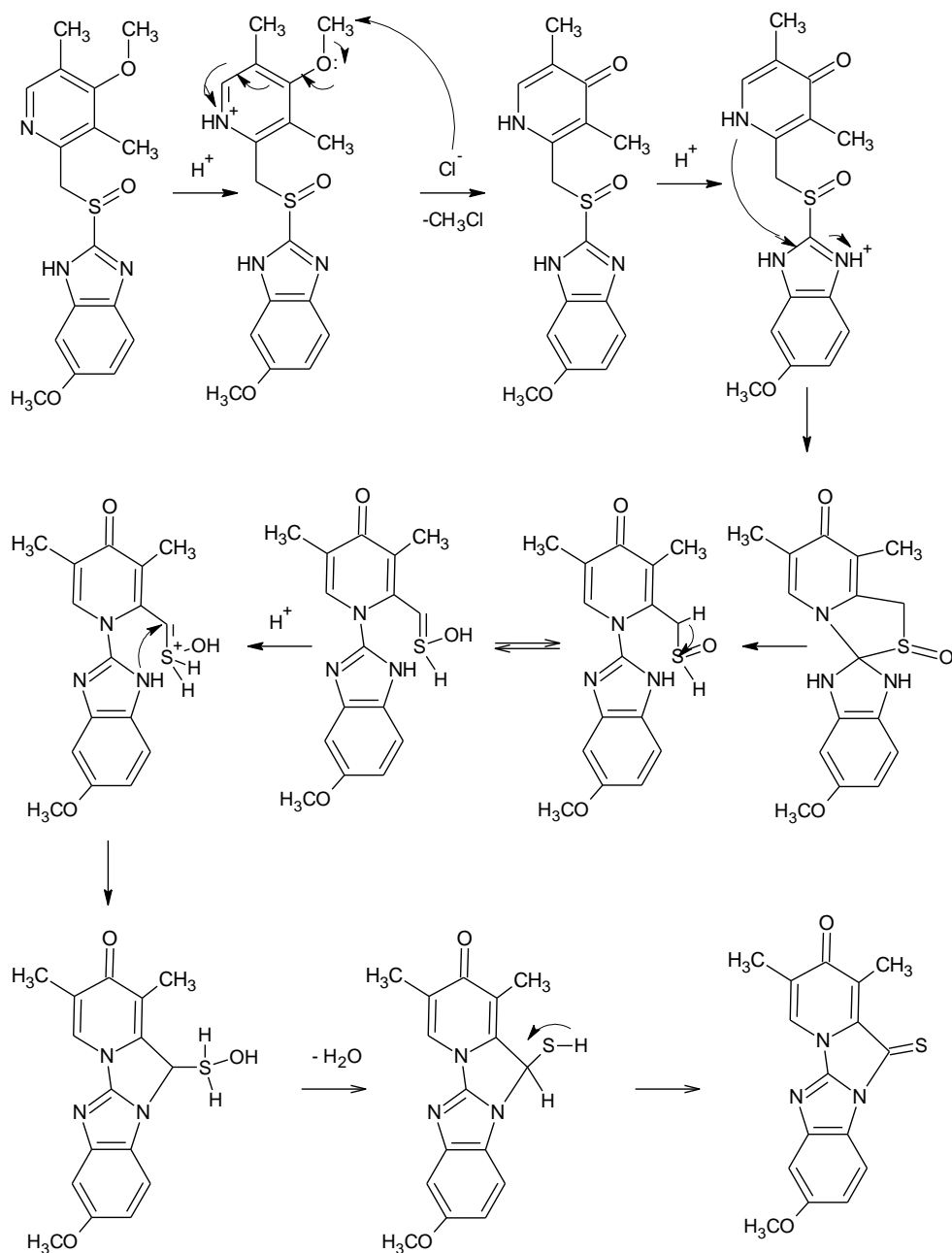
oksidativnim uslovima razgradnje, uz zapaženu mogućnost nastajanja u toku fotodegradacije i pod baznim uslovima razgradnjeesomeprazola. Izvesno nastajanje Nečistoće E i Nečistoće I uočeno je samo pri uslovima bazne razgradnjeesomeprazola.

Nečistoće F i G su čisto degradacioni proizvodi. Pojava ovih nečistoća zapažena je u najvećem stepenu pod uslovima kisele razgradnjeesomeprazole, u značajnom nivou pod uslovima termalne razgradnjeesomeprazole, ali i pri forodegradacijiesomeprazola. Pretpostavljeno je da one nastaju uklanjnjam metil grupe sa metoksi grupe piridninskog dela molekule i formiranjem tiokso cikličnog prstena. Detaljni pretpostavljeni mehanizam dat je na Slici 4.67. Pretpostavljeni mehanizam njihovog nastanka, ilustruje na najbolji način sklonostesomeprazola ka specifičnim hemijskim transformacijama, a na jednoj od njih se i bazira mehanizam njegovog dejstva u organizmu. Upravo proizvod jedne takve hemijske transformacijeomeprazola, ciklični sulfenamidomeprazola, koji nastaje u kiseloj sredini parijetalnih ćelija je odgovoran za biološku aktivnost leka.

N-metilomeprazol i 4-hidroksiomeprazol su glavni degradacioni proizvodi termalne razgradnjeesomeprazol natrijuma (čvrste supstance). Očigledno je da nastaju putem intra molekulske metilacije jednog od dva azotovih atoma imidazolovog prstena jedne molekuleesomeprazola. Metilacija se vrši prenosom metil grupe sa metoksi grupe na poziciji 4 piridinskog prstena druge molekuleesomeprazola, Slika 4.69. Dalje, 4-Hidroksiesomeprazol u baznim vodenim rastvorima (pH 10,5) se brzo transformiše u 4-Hidroksiomeprazol sulfon i 4-Hidroksiomeprazol sulfid što je prikazano na Slici 4.69.



Slika 4.66 Poreklo procesnih nečistoćaesomeprazola. „I“ -Nečistoća A (5-Methoxy-1H-benzimidazole-2-thiola); „II“ - 2-hlorometil-4-(metoksi)-3,5-dimethyl piridin „III“ - Nečistoća C; „IV“ - Nečistoća D ; „V“ - Nečistoća E; „VI“ - Nečistoća I; „VII“ - 2-hlorometil-3,5-dimethyl piridin „IX“ - Nečistoća B;

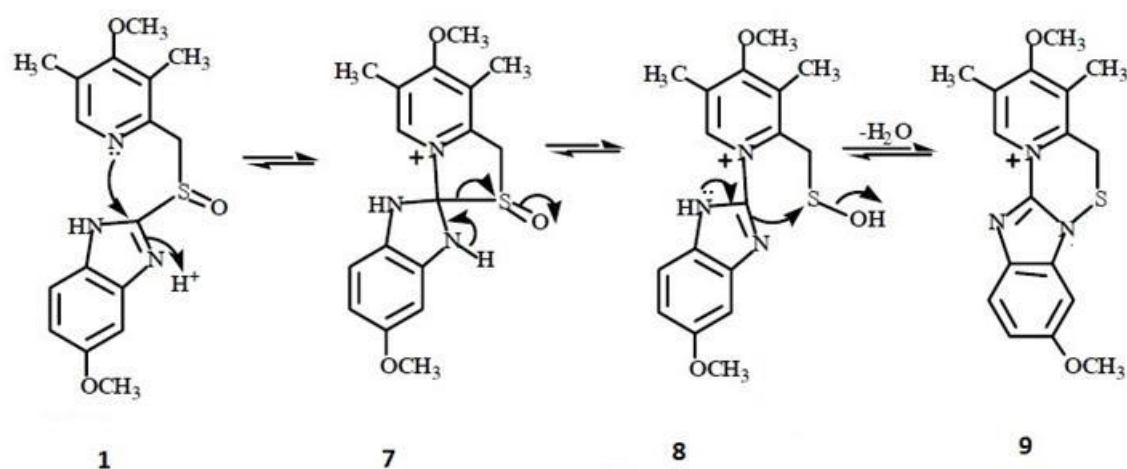


Slika 4.67 Pretpostavljeni put nastanka Nečistoće F (8-Methoxy-1,3-dimethyl-12-thioxopyrido[1,2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-one) i Nečistoće G (9-Methoxy-1,3-dimethyl-12-thioxopyrido [1,2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-one).

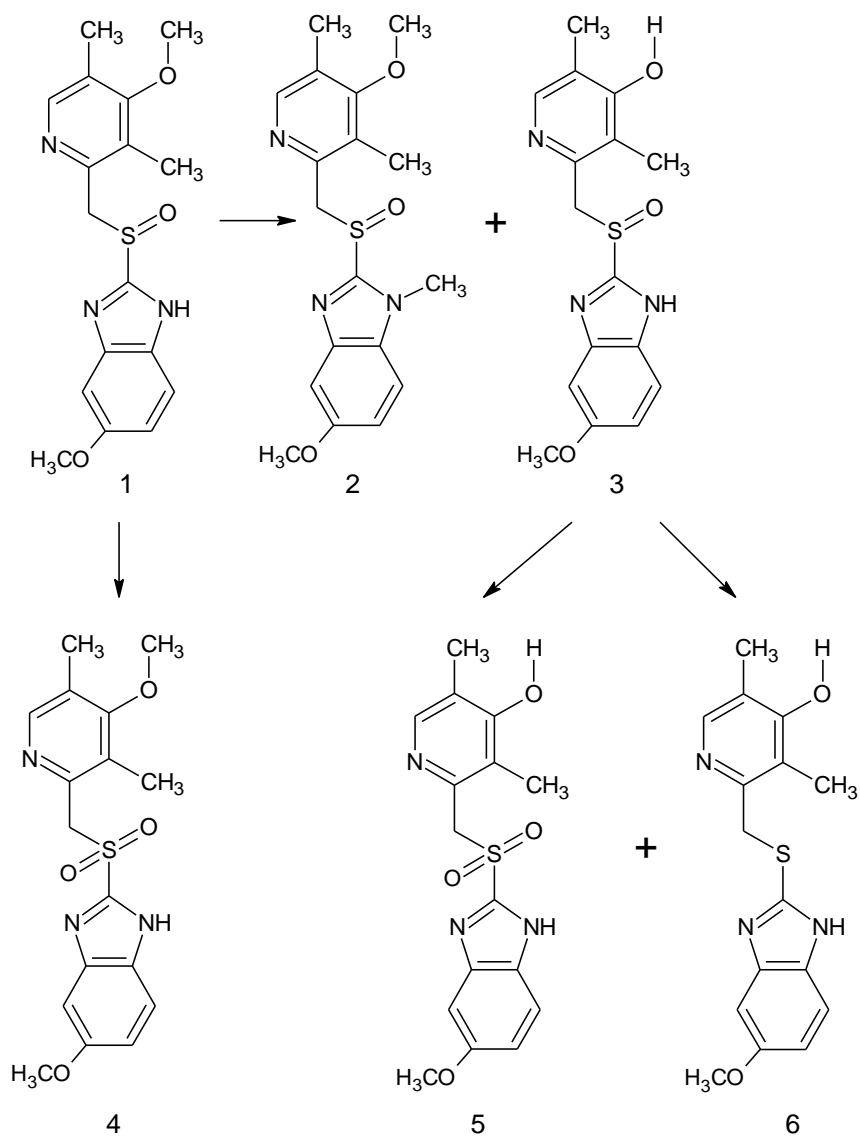
Pri kiselim i baznim uslovima razgradnje esomeprazola zapažena je pojava analoga sulfenamida omeprazole, koji je uočen i kao glavni razgradni proizvod u vodenim rastvorima esomeprazola pri koncentracijama 0,2, 0,4, 0,8 i

1,6 mg/ml, i pH vrednostna ovih rastvora od 9,3, 9,6, 9,7 i 9,9. Nikada do sad u literaturi nije navedena pojava ove hemijske vrste u slabo baznim vodenim rastvorima. Mehanizam nastajanja ove hemijske vrste u neutralnim i slabo kiselim uslovima je detaljno proučavan i dat je na Slici 4.68.

Od svih identifikovanih nečistoća koje su pomenute u ovom radu jedino su Nečistoća B i Nečistoća H čisto procesne nečistoće i ne javljaju se ni pod jednim uslovima kao razgradni proizvodiesomeprazola. Poreklo Nečistoće B prikazano na Slici 4.57 (označena sa „IX“). Kao procesna nečistoća 2-hlorometil-4-(metoksi)-3,5-dimethyl piridina („II“ na Slici 4.57) javlja se 2-hlorometil-3,5-dimethyl piridin („VII“ na Slici 4.57) koji kondenzacijom sa 2-[[[4-(methoksi)-3,5-dimetil-2- piridinil]metil]thio]-1H-benzimidazolom daje proizvod („VIII“ na Slici 4.57), koji se dalje oksiduje u Nečistoću B. Na sličan način Nečistoća H vodi svoje poreklo od 2-hlorometil-4-hloro-3,5-dimethyl piridina, procesne nečistoće 2-hlorometil-4-(metoksi)-3,5-dimethyl piridina.



Slika 4.68 Mehanizam formiranja cikličnog sulfenamida omeprazola (9), farmakološki aktivnog oblikaesomeprazola. Ova hemijska transformacija se dešava brzo u kiselim rastvorima [143]. Naši rezultati su pokazali da je ona moguća i slabo baznim vodenim rastvorima pH od 9,3-9,9.



Slika 4.69 U čvrstom satanju esomeprazol natrijuma (1) termalnim pospešenjem stvaraju se N-metil omeprazol izomeri (2) i 4-hidroksi esomeprazol (3). Oksidacijom iz vazduha stvara se omeprazol sulfon (4). Dalje, 4-Hidroksi esomeprazol (3) u baznim vodenim rastvorima (pH 10,5) se brzo transformiše u 4-Hidroksi omeprazol sulfon (5) i 4-Hidroksi omeprazol sulfid (6).

Od značajnijih degradacionih proizvoda, za koje nije izvršena tačna identifikacija, koje treba pomenuti je Nečistoća RRT 1.13 koji se javlja kao glavni razgradni proizvod fotodegradacije esomeprazola. Takođe, kiselom razgradnjom nastaju, hromatografski kasno eluirajući, dakle, izrazito nepolarni degradacioni proizvodi na RRT 1.60, RRT 1.63, RRT 1.67 i RRT 1.68. Njihov identitet, izvesno, treba tražiti u nekim od izomera disulfidnog dimera pomenutog od strane Brändström i sar koji su označili sa JJ [23,28]. Oni nastaju dimerizacijom analoga sulfenske kiseline omeprazola koja je u ravnoteži sa dominantno prisutnim analogom sulfenamida omeprazola (8 i 9 na Slici 4.68).

Na osnovu rezultata ispitivanja razgradnje esomeprazola u čvrstom stanju i dalje u baznim vodenim rastvorima može se ustanoviti put degradacije esomeprazola kojim se generišu najznačajniji degradacioni proizvodi pod normalnim uslovima čuvanja (temperatura 25 - 40°C, 55-75 % RH) (Slika 4.59). Neke od ovih komponenti nisu do sad bile nigde pomenute u literaturi (3, 5 i 6), a neke jesu, ali ne kao degradacioni proizvodi (2 i 4). Za ciklični sulfenamid omeprazola, čiji je mehanizam nastajanja detaljno proučavan i uspostavljen (Slika 4.60), nikada ranije nije izvešteno o njegovom nastajanju i u baznim vodenim rastvorima, što smo ovde nedvosmisleno pokazali.

U značajne degradacione proizvode možemo uvrstiti i (R)- omeprazol koji nastaje recematizacijom koja je posledica fotohemijske interkonverzije što je pokazano u ovoj tezi. Kako (R)- omeprazol ima dokazano nižu bioraspoloživost u ljudskom organizmu [2,3] može se dati preporuka zaštite od izlaganja svetlosti farmaceutskih preparata u kojima je aktivni princip esomeprazol.

5. ZAKLJUČAK

Uspešnim razvojem i međusobnim kombinovanjem više različitih hromatografskih i spektrometrijskih metoda, i teorije, proučeni su putevi degradacije esomeprazola natrijuma u čvrstom stanju, i rastvorima različitih koncentracija i pH vrednosti. Svaki od značajnih degradacionih proizvoda koji se javljaju pod ovim uslovima je hromatografski i spektrometrijski okarakterisan i objašnjen je mehanizam njegovog nastanka. Neki od okarakterisanih degradacionih proizvoda su prvi put pomenuti. Dosta publikovanih studija bavi se proizvodima transformacije omeprazola u kiseloj i neutralnoj sredini i uglavnom razlikuju od onih koje se proučavaju u ovoj disertaciji (prisutne procesne nečistoće i njihovo poreklo, oksidativni proizvodi, razgradni proizvodi supstance u čvrstom stanju i njihove dalje hemijske transformacije u baznim vodenim rastvorima). Sve poznate nečistoće esomeprazola su spektrometrijski okarakterisane.

U slučaju rešavanja identifikacije nepoznate nečistoće RRT 0.27 prevaziđen je problem njene izrazite nestabilnosti koja je onemogućavala izvođenje potrebnih merenja za njenu identifikaciju. Korišćenjem semipreparativne hromatografije uz upotrebu deuterio rastvarača i modifajera mobilne faze, uz ranije uočenu potrebnu stabilnost u samoj mobilnoj fazi, omogućilo je izvodljivost postupka njene izolacije i koncentrovanja u nivoima potrebnim za NMR merenja. Nakon njene identifikacije, kao cikličnog sulfenamida omeprazola, a na osnovu literaturnih podataka, ovaj postupak izolacije se pokazao kao najbolje rešenje za izolovanje ove komponente u dovoljno čistom obliku i u uslovima njene dovoljne stabilnosti za dalju strukturnu karakterizaciju. Ciklični sulfamid omeprazola je ključno jedinjenje za in vivo ponašanja omeprazola i razumevanje dejstva leka u samom organizmu [140]. Na osnovu literaturno dostupnih podataka njena identifikacija je potpuno potvrđena i ranijim opisanim načinima njene sinteze [139].

Zahvaljujući ovim ispitivanjima i formiranju pogodnih hromatografskih metoda, dalje je bilo moguće ispitivati ponašanje i stabilnost esomeprazola u raznim razvojnim farmaceutskim formulacijama, na osnovu čega se je i vršio konačan izbor formulacije. Ispitivanjima stabilnosti esomeprazola pod različitim kontrolisanim uslovima (ICH), samog ili u rastvorima (u ovom obliku se lek primenjuje) u različitim aplikacionim koncentracijama, dalo je mogućnost ustanovljavanja uslova čuvanja, roka trajanja i načina primene leka koje je garantovalo njegovo bezbedno korišćenje.

Više studija koje su sadržane u ovom radu su omogućile uspešnu registraciju farmaceutskih preparata sa aktivnim principom esomeprazol natrijuma. Deo rezultata ove teze je sadržan analitičkom delu registracione dokumentacije. Kako je prisustvo razgradnih supstanci nepoželjno i dozvoljeno u strogo definisanim granicama, uloženi su naporu u cilju osiguranja njihovog prisustva u što nižim koncentracijama. Razvojem pogodne farmaceutske formulacije, u preporučenim uslovima čuvanja i načinom njene dalje upotrebe (aplikacija putem injekcija i infuzija) osigurali smo proizvodnju efikasnog, kvalitetanog i bezbedanog leka za humanu upotrebu.

6. REFERENCE

1. R. Walia, Md. Hedaitullah, S. F. Naaz, K. Iqbal and H.S. Lamba, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 1 (2011) 565
2. T. Andersson, K. Röhss, E. Bredberg, M. Hassan-Alin, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15 (2001) 1563
3. L. Olbe, E. Carlsson, P. Lindberg, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2 (2003) 132
4. M. Kumar, K. Purandhar, K. Reddy, M. Reddy, K. Sreenath, (Dr. Reddy's Laboratories Limited) US20040077869, (2004)
5. A. A. Al-Badr, *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology VOL. 35*, Harry G. Brittain, Ed., Elsevier Inc, London, UK, 2010, p. 151
6. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London, UK, 2004, p. 1366
7. F. Wang, L. K. Montemayor, D. Che, S. E. Horne, (Apotex Pharmachem Inc.) US7786309 B2, (2010)
8. M. Bohlin, U. Noreland (Astrazeneca Ab) US8658799 B2, (2014)
9. P. Reddy, R. Reddy, M. Reddy, (Hetero Drugs Limited) EP2106397 B1, (2011)
10. T. M. Khomenko, K. P. Volcho, N. I. Komarova, N. F. Salakhutdinov, *Russ. J. Org. Chem.* 44 (2008) 124
11. P. Pitchen, M. Deshmukh, E. Dunach, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 8188
12. S. Zhao, O. Samuel, H. B. Kagan, *Tetrahedron* 43 (1987) 5135

13. P.Pitchen, C. J. France, I. M. McFarlane, C. G.Newton, D. M. Thompson, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994), 485
14. J.R. Demarest, D.D.F. Loo, *Ann. Rev. Physiol.* 52 (1990) 307
15. X. Yao, J. G. Forte, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 103
16. W. Kühlbrandt, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 282
17. E.C. Rabon, M.A. Reub`en, *Ann. Rev. Physiol.* 52 (1990) 321
18. C.S. Chew, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 7 (1991) 856
19. L.A. Dunbar, M.J. Caplan, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29617
20. G. Sachs, J.M. Shin, C. Briving, B. Wallmark, S. Hersey, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 (1995) 277
21. J.M. Shin, Y.M. Cho, G. Sachs , *J Am Chem Soc.* 126 (2004) 7800
22. M. Robinson, J. Horn, *Drugs.* 63 (2003) 2739
23. BRÄNDSTRÖM at al., *Acta Chem. Scand.* 43 (1989) 536
24. BRÄNDSTRÖM at al., *Acta Chem. Scand.* 43 (1989) 549
25. BRÄNDSTRÖM at al., *Acta Chem. Scand.* 43 (1989) 569
26. BRÄNDSTRÖM at al., *Acta Chem. Scand.* 43 (1989) 577
27. BRÄNDSTRÖM at al., *Acta Chem. Scand.* 43 (1989) 587
28. BRÄNDSTRÖM at al., *Acta Chem. Scand.* 43 (1989) 595
29. S. Noch, Y. Yokoyama, M. Narukawa, K. Ebine, M. Murahashi,

- Y.Kawakami, N.Asakawa, T.Sato, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 552
30. M.P. Brezeziska, *Acta Pol. Pharm.* 68 (2011) 753
 31. R. Yang, S. G. Schulman, P. J. Zavala, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 155
 32. A. Ekpe, T. Jacobsen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 1057
 33. Q. Dong, J. Zhu, Q. Sui, C. Tang, X. Wang, Y. Yu, *J Sep Sci.* 36 (2013) 1200
 34. R. M. Claramunt, C. Lopez, I. Alkorta, J. Elguero, R. Yang, S. Schulman
Magn. Reson. Chem. 42 (2004) 712
 35. R. Claramunt M., C. López, J. Elguero, *ARKIVOC V* (2006) 5
 36. P. M. Bhatta, G. R., Desiraju, *Chem. Commun.* 20 (2007), 2057
 37. O. Jip, Z. Wei, P. Jie, D. Zhiwei, L. Liya, L. Wenhan, *Chin. J. Magn.
Reson.* 23 (2000) 457
 38. A.M. Qaisi, M.F. Tutunji, L.F. Tutunji, *J. Pharm. Sci.* 95 (2005) 384
 39. S. McClean, E. O'Kane, V.N. Ramachandran, W.F. Smyth, *Anal. Chim. Acta*
292 (1994) 81
 40. J.R. Ames, P. Kovacic, *J. Electroanal. Chem.* 343 (1992) 443
 41. H. Knoth, H. Oelschlager, J. Volke, J. Ludvik, *Pharmazie* 52 (1997) 686
 42. D. Agbaba, D. Novovic, K. Karljickovic-Rajic, V. Marinkovic, *J. Planar.
Chromatogr. Modern TLC* 17 (2004) 169
 43. G.W. Sluggett, J.D. Stong, J.H. Adams, Z. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25
(2001) 357

44. C. Iuga, M. Bojita, S. Leucuta, *Farmacia*, 57 (2009) 534
45. S. Nandipati, V. K. Reddy, S. Uba, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, (2012) 225
46. Q. Dong , J. Zhu , Q. Sui , C. Tang , X. Wang , Y.Yu, *J. Sep. Sci.* 36, (2013) 1200
47. S.U. Nalwade, V.R. Reddy, D.D. Rao, N.K. Morisetti, *J Pharm Biomed Anal.* 57 (2012) 109
48. K.B. Borges , A.J. Sanchez , M.T. Pupo , P.S. Bonato , I.G. Collado, *J AOAC Int.* 93 (2010) 1811
49. M. Ribani, C. H. Collins, C. B.G. Bottoli , *J. Chromatogr. A*, 1156 (2007), 201.
50. Z.A. El-Sherif, A.O. Mohamed, M.G. El-Bardicy, M.F. El-Tarras, *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 814
51. A. Schubert, A.L. Werle, C.A. Schmidt, C. Codevilla, L. Bajerski, R. Chiappa, S.G. Cardoso, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 501
52. A. Ekpe, T. Jacobsen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 1057
53. B.A. Persson, P.O. Lagerstrom, I. Grundevik, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 108 (1985) 71
54. M.A. Amantea, P.K. Narang, *J. Chromatogr.* 426 (1988) 216
55. M. Motevalian, G. Saeedi, F. Keyhanfar, L. Tayebi, M. Mahmoudian, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 5 (1999) 265
56. G. Garcia-Encina, R. Farran, S. Puig, L. Martinez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 371

57. A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati, A. Khoddam, *Arzneimittelforschung* 56 (2006) 382
58. F.S. Murakami, A.P. Cruz, R.N. Pereira, B.R. Valente, M.A.S. Silva, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 113
59. N.L. Rezk, K.C. Brown, A.D. Kashuba, *J. Chromatogr. B*, 844 (2006) 314
60. M. Shimizu, T. Uno, T. Niioka, N. Yau-Furukori, T. Takahata, K. Sugawara, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 241
61. J. J. Berzas Nevado, G. Castaneda Penalvo, R. M. Rodriguez Dorado, V. Rodriguez Robledo, *Anal. Methods* 5 (2013) 3299
62. T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, R. Galera, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 100
63. P.S. Bonato, F.O. Paias, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 318
64. K. Balmer, B.A. Persson, P.O. Lagerstroem, *J. Chromatogr.* 660 (1994) 269
65. M. Enmark, J. Samuelsson, P. Forssen, T. Fornstedt *J. Chromatogr. A* 1240 (2012) 123
66. S. Vyas, A. Patel, K.D. Ladva, H.S. Joshi, A.H. Bapodra, *J Pharm Bioallied Sci.* 3 (2011) 310
67. L. Zanitti, R. Ferretti, B. Gallinella, F. La Torre, M.L. Sanna, A. Mosca, R. Cirilli, *J Pharm Biomed Anal.* 52 (2010) 665
68. R.M. Orlando, P.S. Bonato, *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 227
69. Q.B Cass V V Lima, R V Oliveira, N M Cassiana, a LG Degani, J Pedrazzoli, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 275

70. H. Kanazawa, A. Okada, M. Hygaky, H. Yakota, F. Mashige, K. Nakahara, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1817
71. J. Martens-Lobenhoffer, I.Reiche, U. Troger, K. Monkemuller, P.Malfertheiner, S. M. Bode-Boger, *J. Chromatogr. B*, 857 (2007) 301
72. P. S. Bonato, F. O. Paias, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 318
73. A. Karlsson, S. Hermansson, *Chromatographia* 44 (1997) 10
74. M.E. Andersson, D. Aslan, A. Clarke, J. Roerrade, G. hagman, *J. chromatogr. A* 1005 (2003) 83
75. K. Karljivic-Rajic, D. Novovic, V. Marinkovic, D. Agbaba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1019
76. D. Castro, M.A. Moreno, S. Torrado, J.L. Lastres, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 291
77. A. Riedel, C.G. Leopold, *Pharmazie.* 60 (2005) 126
78. U. Hofmann, M. Schwab , G. Treiber , U. Klotz, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 831(2006) 85
79. A. Tolonen, M.Turpeinen, J. Uusitalo, O. Pelkonen, *Eur J Pharm Sci.* 25 (2005) 155
80. E.J.WOOLF, B.K. Matuszewski, *J Chromatogr A.* 828 (1998) 229
81. I. Hultman, H. Stenhoff, M. Liljeblad, *J. Chromatogr. B* 848 (2006) 317
82. A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358
83. E.H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* 27 (1933) 1257

84. C.R. Lowe, P.G. Dean, *Affinity Chromatography*, John Wiley & Sons, London, UK, 1974
85. K.K. Stewart, R.F. Doherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70 (1973) 2850
86. S. Allenmark, in *Protein based phases in Chiral Separations by HPLC: Applications to Pharmaceutical Compounds*, A.M. Krstulovic Ed., Ellis Horwood, New York, 1989
87. S. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparations: Methods and Applications*, Ellis Horwood, New York, 1991
88. S. Allenmark, in *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, G. Subramanian, Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 1994
89. J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 253
90. D.S.Hage, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 459
91. F. Haddadian, E.J. Billiot, S.A. Shami, I.M. Warner, *J. Chromatogr. A* 858 (1999) 219
92. J.M.H. Kremer, J. Wilting, L.H.M. Janssen, *Pharmacol. Rev.* 40 (1988) 1
93. D. Haupt, C. Pettersson, D. Westlund, *Chirality* 7 (1995) 23
94. H. Shiono, A. Shibukawa, Y. Kuroda, T. Nakagawa, *Chirality* 9 (1997) 291
95. Y.Kuroda, A.Shibukawa, T. Nakagawa, *Anal. Biochem.* 268 (1999) 9
96. J.Haginaka, H.Matsunaga, *Enantiomer* 5 (2001) 37
97. V.R. Meyer, *J. Chromatogr.* 316 (1984) 113
98. B. Porsch, *J. Chromatogr. A* 658 (1994) 179

99. P. Renold, E. Madero , T. Maetzke, J. Chromatogr. A 908 (2001) 143
100. D. Wu, K. Lohse, H. C. Greenblatt, J. Chromatogr. A 702 (1995) 233
101. H. Kessler, M. Gehrke, Ch. Griesinger, Angew. Chem. Inf. Ed. Engl. 27 (1988) 490
102. T. Parella, Pulse Program Catalogue, Bruker BioSpin, 2004
103. G. Chen, B.N. Pramanik, Y.H. Liu, U.A. Mirza, J. Mass Spectrom. 42 (2007) 279
104. G. Chen, L.K. Zhang, B.N. Pramanik, in HPLC for Pharmaceutical Scientists, Y. Kazakevich, R. LoBrutto, Eds., Wiley, New York, 2007, p 281-346
105. M.YAMASHITA, J.B. Fenn, J. Phys. Chem. 88 (1984) 4451
106. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Science 246 (1989) 64
107. E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, Anal. Chem. 45 (1973) 936
108. MAMYRIN BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA, J. Exp. Theor. Phys. 64 (1973) 82
109. M. Guilhaus, J. Mass Spectrom. 30 (1995) 1519
110. E.O. Lawrence, N.E. Edlefsen, Science 72 (1930) 376
111. M.B. Comisarow, A.G. Marshall, Chem. Phys. Lett. 25 (1974) 282
112. M.Hardman, A.A. Makarov, Anal. Chem. 75 (2003) 1699

113. Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430
114. A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2113
115. A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, S. Horning, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 977
116. R.G. Cooks, J.H. Beynon, R.M. Caprioli, G.R. Lester. *Metastable Ions*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1973
117. F.W. McLafferty, *Science* 214 (1981) 280
118. M.C. Garcia, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 111
119. N. Ohashi, S. Furuuchi, M. Yoshikawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 325
120. M.A. Olsen, P.G. Cummings, S. Kennedy-Gabb, B.M. Wagner, G.R. Nicol, B. Munson, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5070
121. D.Q. Liu, C.E. Hop, M.G. Beconi, A. Mao, S.H. Chiu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1832
122. W. Lam, R. Ramanathan, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 345
123. A. Tolonen, M. Turpeinen, J. Uusitalo, O. Pelkonen, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (2005) 155
124. J.C. Wolff, A.M. Laures, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3769
125. T.J. Novak, R. Helmy, I. Santos, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 161

126. D.Q. Liu, C.E.C.A Hop, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 1
127. G. Chen, A. Khusid, I. Daaro, P. Irish, B.N. Pramanik, J. Mass Spectrom. 42 (2007) 967
128. G. Chen, I. Daaro, B.N. Pramanik, J.J. Piwinski, J. Mass Spectrom. 44 (2009) 203
129. J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman, Edt, Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics , 9th Edn., McGraw Hill, New York, USA, 1996
130. S. Görög, Ed, Identification and Determination of Impurities in Drugs, Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands, 2000, p. 1-748
131. S. Ahuja, Impurities Evaluation of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, New York, 1998
132. S. Husain, R.N. Rao, in Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Z. Deyl, I. Miksik, F. Tagliaro, E. Tesarova, Eds., Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands, 1998, p. 834
133. ICH Q3B: Impurities in New Drug Products (2006)
134. M. Mathew, V. Das Gupta, R.E. Bailey, Drug Dev. Ind. Pharm. 21 (1995) 965
135. ICH Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures: Definitions and terminology (1994)
136. ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology (1996)
137. V. Kazekevich, R. LoBrutto, HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (2007), 455-502

138. M. DellaGreca, M.R. Iesce, L. Previtiera, M. Rubino, F. Temussi, M. Brigante;
Chemosphere 63 (2006) 1087
139. P. Linberg , P. Nordberg , T. Alminger , A. Brandstrom, B. Wallmark, J.
Med. Chem., 29 (1986) 1327
140. R. B. Silverman, The organic chemistry of drug Design and drug action,
2nd Edition, Elsevier Inc. London, UK, 2004, p. 527

BIOGRAFIJA AUTORA

Aleksandar D. Pavlović je rođen 25. 01. 1970. godine u Leskovacu, Republika Srbija. Srednju školu, sa zvanjem Tehničara za analitičku hemiju, završava 1988. godine u Lebanu. Na Fakultetu za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu diplomira 1998. godine sa prosečnom ocenom 9,03 i ocenom 10 na Diplomskom radu. Doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu je upisao školske 2010/2011 godine i do 2013. godine je položio sve ispite predviđene nastavnim planom doktorskih studija, sa prosečnom ocenom 9,57.

Od 1998. godine u zvanju samostalnog istraživača radi u Odeljenju analitike, Centara za istraživanje i razvoj, Farmaceutске i Hemijske Industrije "Zdravlje" Leskovac. 2001. Godine počinje sa radom za "Remedica Ltd." Pharmaceutical Industry, u Limassol, Cyprus u njihovom , R&D Departmentu u zvanju Senior Analyst. Od 2003. godine u novoosnovanom Odeljenju razvoja analitike, Sektor istraživanja i razvoja, Hemofarm AD, Vršac, počinje sa radom kao viši stručni saradnik, sa trenutnim zvanjem samostalnog nosilaca projekta.

Aktivni član je u Srpskom hemijskom društvu i Društvu fizikohemičara Srbije. U toku trajanja doktorskih studija učestvovao je u više uspešnih projekata razvoja i registracije novih generičkih lekova za Srpsko i EU tržište.

Oblasti interesovanja kandidadata su hromatografske, spektrohemijske i elektrohemije metode koje se koriste u ispitivanju kvaliteta aktivnih farmaceutskih supstanci i gotovih farmaceutskih proizvoda, njihovih nečistoća i degradacionih proizvoda, studijama forsirane degradacije, u optimizaciji formulacija kroz *in vitro* ispitivanja brzine otpuštanja aktivnih supstanci iz farmaceutskih doznih oblika, ispitivanje stabilnosti i utvrđivanje roka trajanja gotovih proizvoda i sl. U razvoju, optimizaciji i validaciji analitičkih metoda koristi savremene principe hemometrije uz korišćenje najsavremenijih softverskih paketa za tu namenu.

Radovi u međunarodnim naučnim časopisima (M23):

A.D.Pavlović, Lj. M. Ignjatović, S. Z. Popov, A. R. Mladenović, I. Stanković, Journal of the Serbian Chemical Society, Application of gas chromatography analysis to quality control of residual organic solvents in clopidogrel bisulphate, (2014), doi: 10.2298/JSC131120013P

N. Djordjević Filijović, A. Pavlović, K. Nikolić, D. Agbaba, Acta Chromatographica, Validation of an HPLC method for determination of aripiprazole and its impurities in pharmaceuticals, 26 (2014) 13

N. Djordjević Filijović, M. D. Antonijević, A.Pavlović, I.Vučković, Katarina Nikolić, D. Agbaba. Drug Development and Industrial Pharmacy, The stress stability of olanzapine: studies of interactions with excipients in solid state pharmaceutical formulations, (2014), doi: 10.3109/03639045.2014.884114

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

N.Đorđević Filijović, A.Pavlović, D.Agbaba, Stress stability of olanzapine in its dosage forms: projection of drug product shelf-life. EUROanalysis 16 th. European Conference on Analytical Chemistry. Belgrade, 11-15 September 2011. Book of Abstract page 86.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (M63):

M. Đokić, J. Božić, A.Pavlović, Procena efekta laktoze monohidrat i anhidrovane laktoze na tablete sa trenutnim oslobađanjem koje sadrže atipične psihotike, V kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 13 do 17 oktobar 2010. Arhiv za farmaciju 2010, vol. 60, br. 5, str. 689-694

A. D. Pavlović, D. M. Čebzan, Postavljanje specifikacije za nečistoće u aktivnim supstancama i gotovim proizvodima, Simpozijum farmaceutskog društva Srbije "Nečistoće u farmaceutskim proizvodima", Vršac, 1-2.11. 2007. Zbornik radova str. 71-73

V. M. Jovanović, D. M. Čebzan, A.D. Pavlović, Razvoj HPLC metode za praćenje nečistoća azitromicina, Simpozijum farmaceutskog društva Srbije "Nečistoće u farmaceutskim proizvodima", Vršac, 1-2.11. 2007. Zbornik radova str. 123-125

D. Čebzan, A. Pavlović, A. Mladenović, V. Jovanović, S. Trijić, J. Kokanović, B. Parulović, B. Stupar, Plackett-Burman dizajn eksperimenta i validacija HPLC metode za određivanje srodnih supstanci kod lansoprazol kapsula, IV Kongres farmaceuta Srbije. sa međunarodnim učešćem, 28. novembra do 02. decembra 2006. Arhiv za farmaciju 2006, vol. 56, br. 5, str. 696-697

D. Čebzan, Ž. Aćimović, A. Pavlović, J. Kokanović, A. Mladenović, V. Jovanović, S. Trijić, B. Stupar, Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje srodnih supstanci kod sumatriptan film tableta. IV Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 28. novembra do 02. decembra 2006. Arhiv za farmaciju 2006, vol. 56, br. 5, str. 692-693

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Александар Драгомир Павловић

број уписа 2010/0308

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Течно-хроматографска и спектрометријска карактеризација и одређивање
есомепразола, његових нечистоћа и деградационих
производа

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07/05/14

A. Pavlovic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александар Драгомир Павловић

Број уписа 2010/0308

Студијски програм Физичка хемија

Наслов рада Течно-хроматографска и спектрометријска карактеризација и одређивање есомепразола, његових нечистоћа и деградационих производа

Ментори

Др Љубиша Игњатовић, Ванредни професор Факултета за физичку хемију,
Универзитета у Београду

Др Влатка Вајс, Редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у
Београду

Потписани Александар Д Павловић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07/05/14

A. Pavlovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Течно-хроматографска и спектрометријска карактеризација и одређивање
есомепразола, његових нечистоћа и деградационих
производа

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.


Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07105/14



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.