

Факултет за физичку хемију

(Број захтева)

(Датум)

Образац 2.  
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
Веће научних области  
природних наука

### З А Х Т Е В

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 3. Статута Универзитета у Београду (Гласник Универзитета", број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **дипл. физикохем. Александра (Драгомир) Павловића, студента докторских студија.**

КАНДИДАТ: **дипл. физикохем. Александар (Драгомир) Павловић, студент докторских студија,** пријавио је докторску дисертацију под називом: **"Течно-хроматографска и спектрометријска карактеризација и одређивање есомепразола, његових нечистоћа и деградационих производа"**.

Универзитет је, дана 12.09.2013. године, својим актом, 02 број: 61206-3986/2-13 МЦ од 12.09.2013. године, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **"Течно-хроматографска и спектрометријска карактеризација и одређивање есомепразола, његових нечистоћа и деградационих производа"**.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације **дипл. физикохем. Александра (Драгомир) Павловића, студента докторских студија,** образована је на седници Наставно-научног већа Факултета одржаној 15.05.2014. године, одлуком Наставно-научног већа Факултета, број 556/1 од 15.05.2014. године, у саставу:

Име и презиме члана Комисије	звање	научна област
1) др Љубиша Игњатовић	ванредни професор	<b>физичка хемија - контрола и заштита животне средине</b>
2) др Влатка Вајс	редовни професор	<b>органичка хемија - природни производи</b>
3) др Мирослав Кузмановић	ванредни професор	<b>физичка хемија - спектрохемија</b>
4) др Марко Даковић	доцент	<b>физичка хемија - радиохемија и нуклеарна хемија</b>

Наставно-научно веће Факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **20.06.2014.** године.

Прилог:

1. Извештај Комисије са предлогом,
2. Одлука Наставно-научног већа Факултета о усвајању извештаја,
3. Примедбе дате у току стављања извештаја на увид јавности, уколико је таквих примедби било.

**Д е к а н**  
**Факултета за физичку хемију**  
**Проф. др Шћепан Миљанић**

Na osnovu članova 103. i 104. Statuta Univerziteta u Beogradu - Fakulteta za fizičku hemiju, Nastavno-naučno veće Fakulteta, na IX redovnoj sednici, održanoj 20.06.2014. godine, donosi sledeću

## O D L U K U

**1.-** Prihvata se pozitivni izveštaj Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata **dipl. fizikohem. Aleksandra (Dragomir) Pavlovića, studenta doktorskih studija**, pod nazivom: **"Tečno-hromatografska i spektrometrijska karakterizacija i određivanje esomeprazola, njegovih nečistoća i degradacionih proizvoda"**, u sastavu:

- 1) dr Ljubiša Ignjatović, vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju,
- 2) dr Vlatka Vajs, redovni profesor, Hemijski fakultet,
- 3) dr Miroslav Kuzmanović, vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju,
- 4) dr Marko Daković, docent Fakultet za fizičku hemiju.

**2.-** Univerzitet je, dana 12.09.2013. godine, svojim aktom, 02 broj: 61206-3986/2-13 MC od 12.09.2013. godine, dao saglasnost na predlog teme doktorske disertacije koja je glasila: **"Tečno-hromatografska i spektrometrijska karakterizacija i određivanje esomeprazola, njegovih nečistoća i degradacionih proizvoda"**.

**3.-** Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:

Deo rezultata istraživanja iz oblasti problematike ove teze autor je već publikovano u naučnim časopisima i materijalima naučnih skupova, a spisak tih publikacija je sledeći:

D1. Radovi u međunarodnim naučnim časopisima (M23):

1. 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

2. 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

3. 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

**4.-** Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu o urađenoj doktorskoj disertaciji dostavlja se Univerzitetu u Beogradu – Veću naučnih oblasti prirodnih nauka, radi davanja saglasnosti na isti.

**5.-** Po dobijenoj saglasnosti iz tačke 2., kandidat može da pristupi odbrani doktorske disertacije.

Odbrana doktorske disertacije je javna. Datum i mesto odbrane se oglašavaju na Web lokaciji Fakulteta i oglasnoj tabli Fakulteta, najmanje tri dana pre odbrane.

Doktorska disertacija se brani pred komisijom, koja po završenoj odbrani ocenjuje kandidata, utvrđujući da je "odbranio" ili "nije odbranio" disertaciju.

**Odluku dostaviti:**

- kandidatu,
- Komisiji,
- Stručnom veću  
Univerziteta,
- Arhivi Fakulteta.

**D e k a n**  
**Fakulteta za fizičku hemiju**

**Prof. dr Šćepan Miljanić**

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FAKULTETA ZA FIZIČKU HEMIJU**

**Predmet:** Izveštaj komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije studenta doktorskih studija Aleksandra (Dragomir) Pavlovića

Odlukom Nastavno-naučnog veća Fakulteta za fizičku hemiju, sa VIII redovne sednice održane 15. 05. 2014. god., imenovani smo za članove Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Aleksandra (Dragomir) Pavlovića, pod naslovom:

**„Tečno-hromatografska i spektrometrijska karakterizacija i određivanje esomeprazola, njegovih nečistoća i degradacionih proizvoda”**

Kandidat Aleksandar (Dragomir) Pavlović, diplomirani fizikohemičar i student na doktorskim studijama Fakulteta za fizičku hemiju, je temu pod navedenim naslovom prijavio na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 17. 05. 2013. godine. Ova tema je odobrena odlukom Nastavno-naučnog veća Fakulteta za fizičku hemiju na X redovnoj sednici održanoj 12. 07. 2013. godine. Na osnovu te odluke Veće naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu je 12.09.2013. god. dalo saglasnost da se prihvati predložena tema doktorske disertacije.

Aleksandar (Dragomir) Pavlović je položio sve planom i programom predviđene ispite na doktorskim studijama i urađenu doktorsku disertaciju predao Fakultetu za fizičku hemiju. Nakon pregleda i analize ove disertacije podnosimo Veću sledeći

**I Z V E Š T A J**

**A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija Aleksandra (Dragomir) Pavlovića je napisana na 174 strane formata A4, sa proredom 1,5. Podeljena je u 6 delova i sadrži 82 slike, 42 tabele i 140 literaturnih navoda. Disertacija sadrži sledeća poglavlja: *Uvodni deo* (38 strana), *Cilj rada* (3 strane), *Eksperimentalni deo* (24 strane), *Rezultati i diskusija* (96 strana), *Zaključak* (2 strane), *Literatura* (11 strana), *Biografija autora sa spiskom radova* (4 strane), kao i: *Naslovnu stranu na srpskom jeziku*, *Naslovnu stranu na engleskom jeziku*, *Stranu sa informacijama o mentorima i članovima komisije*, *Izjavu zahvalnosti*, *Stranu*

*sa podacima o doktorskoj disertaciji na srpskom jeziku, Stranu sa podacima o doktorskoj disertaciji na engleskom jeziku, Sadržaj, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada, Izjavu o korišćenju.*

U *Uvodnom delu* dat je detaljan opis ispitivane aktivne farmaceutske supstance esomeprazola, njegovih fizičko-hemijskih osobina i mogućih načina njegove sinteze. Opisan je mehanizam dejstva inhibitora protonske pumpe (PPIs), grupe lekova kojima esomeprazol pripada, i objašnjeno je njegovo farmakološko ponašanje. Detaljno je prikazan literaturni pregled ranijih proučavanja esomeprazola (omeprazola) koja se tiču njegovog hemijskog ponašanja, proučavanja njegove strukture (ispoljavanja tautomerizma) u rastvorima i čvrstom stanju korišćenjem NMR spektroskopije i elektrohemijaskog ponašanja, njega i njemu srodnih supstanci. Takođe, navedeni su rezultati publikacija, sa posebnim osvrtom na istraživanja koja su sprovedena u okviru ove disertacije, u kojima je proučavano hromatografsko ponašanje i određivanje esomeprazola i njegovih potencijalno prisutnih nečistoća. Poseban osvrt je dat na publikacije u kojima je opisan razvoj hiralno selektivnih hromatografskih metoda kojima je bilo moguće utvrditi hiralnu čistoću esomeprazola. Takođe, pomenuti su značajni detalji iz publikacija u kojima su opisane korišćene LC-MS, LC-MS/MS metode za proučavanje ovog jedinjenja.

U posebnom delu ovog poglavlja opisane su primene analitičkih, hiralno selektivnih i preparativnih hromatografskih metoda, 1D i 2D NMR eksperimenti, i korišćenje masene spektrometrije spregnute sa tečnom hromatografijom, a koje su bile korišćene u istraživanjima koja su sprovedena u okviru ove disertacije.

U poglavlju *Cilj rada* ove doktorske disertacije kandidat u kratkim crtama navodi značaj proučavanja čistoće i ponašanja ispitivanog jedinjenja, kao cilj postavlja potrebu za postavljanjem osetljivih, selektivnih, efikasnih analitičkih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje esomeprazola i njegovih nečistoća, ukratko izlaže željeni ishod koji bi bio ostvaren datim istraživanjem i navodi fundamentalni i praktični značaj i doprinos disertacije.

U poglavlju *Eksperimentalni deo* su opisane za ovu namenu razvijene metode, primenjene u okviru ove disertacije i navedeni korišćeni reagensi, hemikalije i instrumenti. Dati su detaljni postupci eksperimentalnih izvođenja, obrade eksperimentalnih rezultata, kao i procedure pripreme svih rastvora za analizu i validaciju razvijenih analitičkih tečno-hromatografskih metoda. Opisani su načini rada primenjeni u spektrofotometrijskoj, NMR spektroskopskoj i maseno spektrometrijskoj karakterizaciji esomeprazola i njegovih najznačajnijih nečistoća. Opisane su korišćene semipreparativne tečno-hromatografske metode korišćene u prikupljanju nepoznatih razgradnih proizvoda esomeprazola, i LC-MS metode koje su korišćene za merenje njihovih molekulskih masa. Takođe, dati su detaljni postupci eksperimentalnih izvođenja i procedure pripreme rastvora za analizu, u okviru izvođenja studije ubrzane

razgradnje ispitivanog jedinjenja.

U poglavlju *Rezultati i diskusija* su prikazani rezultati razvoja i validacija RP-HPLC metode za određivanje srodnih supstanci esomeprazola i RP-HPLC hiralno selektivne metode. Izvedena je studija ubrzane degradacije i opisana pojava degradacionih proizvoda esomeprazola pri različitim uslovima degradacije. U sklopu izvedene studije stabilnosti uočeni su glavni degradacioni proizvodi čvrstog esomeprazol natrijuma i oni koji se javljaju u njegovim rastvorima različitim koncentracija i pH vrednosti. Detaljno su prezentirani rezultati spektrometrijske karakterizacije esomeprazola i njegovih nečistoća. Prezentirani su i rezultati (određivanje strukture) studije NMR, LC-MS identifikacije glavnih nepoznatih degradacionih proizvoda esomeprazola. Detaljno je objašnjeni putevi degradacije esomeprazola i poreklo i način nastajanja svakog od njegovih glavnih degradacionih proizvoda. Ovde su komentarisani i objašnjeni eksperimentalno dobijeni rezultati, koji su sumirani u delu *Zaključak*.

U delu *Literatura* je dat spisak citiranih radova.

Na kraju doktorske disertacije je prikazana *Biografija* i *Spisak radova* koji su objavljeni iz dela rezultata sprovedenih istraživanja, kao i Spisak ostalih radova kandidata.

## **B. Opis postignutih rezultata**

U okviru ove Doktorske disertacije, za potrebe istraživanja profila nečistoća esomeprazola, razvijena je pogodna RP-HPLC metoda da bi se omogućila pouzdana detekcija svih procesnih i degradacionih nečistoća esomeprazola. 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 mobilne faze bio je sa što višom 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 zapreminskom 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 toku 40 minuta. Rastvarač za uzorke je odabran tako da omogući potpuno rastvaranje esomeprazola i njegovih nečistoća i što veću stabilnost rastvora (što viša pH vrednost: odabrana pH = 11,0).

Sve 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 on-line degazerom mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje je vršeno korišćenjem analitičke 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 metanola u odnosu 85:15) uz radnu temperaturu od 35 °C i protokom mobilne faze od 1,0 ml/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski na 280 nm. Snimanje hromatograma i njihova analiza vršena je korišćenjem EZChrom Elite hromatografskog softvera u sklopu OpenLab softverske platforme. Kalibracija instrumenta je izvršena korišćenjem aktuelne koncentracije esomeprazola referentnog rastvora i usrednjenih površina pikova esomeprazola dobijenih njegovim tri puta ponovljenim injektovanjima. Nakon identifikacije pikova nečistoća (na osnovu relativnih retencionih vremena) svaki pik je kvantikovano korišćenjem postojeće kalibracije za esomeprazol. Za poznate nečistoće korišćeni su ustanovljeni relativni faktori odgovora (u okviru validacionih ispitivanja linearnosti metode), dok se za nepoznate nečistoće i identifikovane koje nisu mogle biti dobijene u čvrstom stanju koristio pretpostavljeni faktor odgovora vrednosti 1,0. Detaljna validacija metode je rađena u skladu sa ICH preporukama. 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. Linearnost metode je potvrđena injektovanjem standardnih rastvora koji su bili u osam koncentraciona nivoa, u opsegu od 0.02 % - a 1.0 % za esomeprazol i deset njegovih nečistoća. Površine pikova se pokoravaju jednačinama oblika  $y = ax + b$ , gde  $b$  (presek sa y osom) nije bio statistički značajno različit od nule u limitima pouzdanosti od 95 %. Kvadrat korelacionog koeficijenta ( $R^2$ ) je bio u svim slučajevima ne manji od 0,9994. Na osnovu odnosa nagiba dobijenih pravih za ispitivane nečistoće i esomeprazola utvrđeni su relativni faktori odgovora čija upotreba omogućava tačnu kvantifikaciju bez dalje upotrebe njihovih referentnih standarda. Za procenu limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) svakog od analita pravljeno je standardno rastvor sa svim analitima u nivou od oko 0,8 µg/ml. 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 puta, odnosno 10 puta viši od nivoa šuma, i one nisu više od 0,283 µg/ml i 0,085 µg/ml koliko su dobijene za pik esomeprazola. Tačnost metode je ispitivana na osnovu analize uzoraka koji su opterećeni svakim od ispitivanih jedinjenja u tri različita poznata koncentraciona nivoa (1,6, 2,4 i 3,2 µg/ml) koji su pripremljeni svaki u triplikatu. Dobijene srednje vrednosti po svakom od navedenih koncentracionih nivoa



za ispitivanja jedinjenja se kreću u opsegu 101,4-105,7%, 101,1-106,5% i 99,8-103,2%. Ponovljivost metode (preciznost metode) je ispitana analiziranjem šest test rastvora koji su opterećeni nečistoćama u nivou od oko 2,4 µg/ml na koncentraciju esomeprazola u rastvoru. RSD vrednostu za ponovljivost određivanja nečistoća u ovih šest testiranih rastvora je bila u opsegu 0,29-4,23%. Ispitivana je i stabilnost korišćenih poredbenog i test rastvora. Izveden zaključak je da se poredbeni rastvor može koristiti na sobnoj temperaturi u toku dva dana. Za test rastvor je najbolje hromatografski analizirati sveže pripremljeni rastvor, dok se isti može injektovati najviše nakon jednog sata pod uslovom da je čuvan u frižideru na +4 °C. Ispitana je i robusnost metode i izveden zaključak je da pH pufera mobilne faze ima glavni uticaj na hromatografsko ponašanje. Takođe, ni jedan od ispitivanih hromatografskih parametara nema statistički značajnih efekata na kvantifikaciju nečistoća esomeprazola, što ukazuje na to da je hromatografska metoda koju je kandidat razvio zadovoljavajuće robusna.

Zbog mogućnosti neželjene recematizacije esomeprazola javila se potreba i za razvojem hiralno selektivne HPLC metode da bi se stekalo uvid u hiralnu čistoću ispitivane supstance i uticaja uslova čuvanja na njenu hiralnu čistoću. Ova metoda je razvijena 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  $\alpha$ 1-acid glikoprotein (AGP) vezan za 5,0 µm silika sverne čestice koristi kao hiralni selektor. Hromatografsko razdvajanje je optimizovano tako da sem zadovoljavajućeg odvajanja pika (R)-omeprazola od znatno većeg pika esomeprazola (koji je u oko 500 puta većoj koncentraciji), postoji zadovoljavajuće odvajanje i od drugih razgradnih proizvoda esomeprazola. Hiralno selektivno hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem analitičke CHIRAL AGP C18 kolone (5 µm, 150 × 4,0 mm) korišćenjem izokratskih uslova sa mobilnom fazom koja se sastojala od smeše fosfatnog pufera pH 6,0 i metanola u odnosu 75:25, pri protoku od 0,4 ml/min, na temperaturi od 25 °C. Referenti standard (R)-omeprazola dobijen je od Union Quimica Farmaceutica (Španija), a recemat omeprazola nabavljen kao Omeprazol CRS od European Pharmacopoeia. Validacija metode je rađena u skladu sa preporukama iz ICH smernica. Validacijom je demonstrirana specifičnost, linearnost, tačnost, ponovljivost i preciznost, limiti detekcija i kvantifikacija, i robusnost metode za R-omeprazol. Detaljni validacioni rezultati su u radu prezentirani tabelarno. Linearnost metode je potvrđena injektovanjem rastvora koji su bili u osam koncentracionih nivoa, u koncentracionom opsegu od 0,32 - 16 µg/ml za R-omeprazol i linearnom regresijom dobijeni su kvadrati korelacionog koeficijenta ( $R^2$ ) od 0,99997. Utvrđene su LOQ i LOD vrednosti od 0,091 i 0,027 µg/ml. Tačnost metode je ispitivana na osnovu analize uzoraka koji su opterećeni R-omeprazolom u pet različitih poznatih koncentracionih nivoa (0,192, 0,64, 1,92, 3,2, 4,48 µg/ml) koji su pripremani svaki u triplicatu. Dobijene vrednosti pojavljivosti su bile u opsegu 97,4-105,0 % sa srednjaom vrednošću 99,5% uz RSD od 2,5%. Preciznost metode je ispitivana kao ponovljivost metode (u toku dana) i

rigidnost (u toku različitih dana) analiziranjem po šest rastvora u dva dana (S-omeprazol u koncentracionom nivou 640 ug/ml), koji su opterećeni R-omeprazolom u nivou od oko 0,2 % (oko 1,28 ug/ml). RSD vrednosti za ponovljivost određivanja R-omeprazola u ove dve serije od šest određivanja su bile 1,3 i 2,0 % dok je RSD svih 12 određivanja bio 2,5 %. U ispitivanju stabilnosti test i poredbenog rastvora je primećena pojava sekundarnih pikova, ali selektivnost metode nije njima ugrožena i bilo je moguće hromatografski analizirati test rastvor čuvan nakon dva dana na sobnoj temperaturi bez uticaja na dobijeni rezultat. Usled prisutne razgradnje esomeprazola poredbeni rastvor može da se čuva, zaštićen od svetlosti, najduže jedan dan. Ispitivanjem robusnosti metode utvrđeno je da sadržaj metanola u mobilnoj fazi ima glavni uticaj na hromatografsko ponašanje. Utvrđeno je da ni jedan od ispitivanih hromatografskih parametara nema statistički značajnog efekata na kvantifikaciju R-omeprazola. Zaštićen od svetlosti, esomeprazol-natrijum u čvrstom stanju 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 stabilnosti ukazuju na recematizaciju pokrenutu uticajem svetlosti u značajnom nivou.

Za namenu izolacije i kolektovanja nepoznatih razgradnih proizvoda okarakterisanih relativnim retencionim vremenima (RRT 0,42, RRT 0,48, i RRT 0,81) razvijena je semipreparativna HPLC metoda. Hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Zorbax Eclipse XDB semipreparativne kolone (1,8 µm, 250 × 9,4 mm), korišćenjem gradijentnog programa (0 min 10 %B, 15 min 50 %B, 15,01 min 10 %B, 18 min 10 %B) sa mobilnom fazom A (0,64 g/l Amonijum formijat, pH=8,5, NH<sub>4</sub>OH) i mobilnom fazom B (acetonitril) uz radnu temperaturu od 35 °C i protok mobilne faze od 4,0 ml/min. U slučaju izolacije nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,27 zbog njene izrazite polarnosti razvijena je i korišćena drugačija semipreparativna HPLC metoda. Kod nje je hromatografsko razdvajanje postignuto korišćenjem Zorbax Eclipse XDB semipreparativne kolone (1,8 µm, 250×9,4mm) uz korišćenje gradijentnog programa sa mobilnom fazom A i mobilnom fazom B uz radnu temperaturu od 35 °C i protok mobilne faze od 4,0 ml/min. Korišćeni gradijentni program bio je: 0 min 10 %B, 7,5 min 15 %B, 7,6 min 70 %B, 12 min 70 %B, 12,1 min 10 %B, 15 min 10 %B. U slučaju korišćenja mobilne faze sa deuterijumskim rastvaračima mobilna faza A pravljen je rastvaranjem 0,4875g mravlje kiseline-d<sub>2</sub> u 1000 ml deuterium oksida i podešavanjem pH vrednosti na 8,5 sa amonijak-d<sub>4</sub> deuterooksidnim rastvornom. Kao mobilna faza B korišćen je acetonitril-d<sub>3</sub>.

Određivanje tačnih masa nepoznatih nečistoća RRT 0,42, RRT 0,48, RRT 0,81 i poznatih nečistoća, kao MS/MS eksperimentima, u cilju ispitivanja puteva fragmentacije esomeprazola i njegovih nečistoća rađeno je zahvaljujući njihovom prethodnom tečno-hromatografskom razdvajanju. LC-ESI/ToF snimanja su rađena na masenom spektrometru 6210 Time-of-Flight LC-MS system (Agilent Technologies) i u maseni spektrometar su unošeni pomoću Agilent Technologies 1200 Series HPLC

instrumenta. LC-ESI/APCI/QqQ snimanja rađena su na masenom spektrometru Xevo TQD i u maseni spektrometar unošeni pomoću ACQUITY H-Class UPLC instrumenta (Waters, Milford, Massachusetts). Ovo hromatografsko razdvajanje je omogućeno korišćenjem Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HT kolone (1,8  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  4,6 mm) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (0,64g/l amonijum formijat pH= 7.0 sa  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 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 0 min 90 %B, 15 min 50 %B, 15,01 min 90%B, 18 min 90%B.

Molekulske mase nepoznatih nečistoća RRT 0,42 i RRT 0,46 (4-OH-omeprazol sulfoksid i 4-OH-omeprazol sulfon) potrebne za njihovu identifikaciju određivane su hromatografskim razdvajanjem reakcione smeše koja je pravljena tako što je u zasićen rastvor 4-OH-omeprazol sulfida u metanolu (oko 5 mg u 450  $\mu\text{l}$  rastvarača) dodata je ekvimolarna količina mCPBA. Ova metoda je korišćena i za merenje masa poznatih nečistoća i za ova LC-ESI/ToF merenja korišćen je njihov rastvor u koncentracionom nivou svake od njih od oko 1  $\mu\text{g/ml}$ . Takođe, ova hromatografska metoda je korišćena u MS/MS eksperimentima u cilju ispitivanja puteva fragmentacije esomeprazola i njegovih nečistoća. Uzorak koji je sadržavao smešu esomeprazola i njegovih nečistoća u koncentracionom nivou od oko 1 $\mu\text{g/ml}$  (za svaku komponentu) je uveden u LC-ESI/APCI/QqQ sistem. ESI+ve jonizacioni sprektar svake od komponente pokazivao je protonovane molekulske jone (M+1). Fragmentacioni put roditeljskih molekulskih jona je praćen skaniranjem produkt-jona nakon CID izazvane fragmentacije sa helijimom kao nosećim gasom. Na osnovu MS/MS merenja postulirani su fragmentacioni putevi esomeprazola i nekih od njegovih nečistoća.

Za potrebe strukturnih određivanja nepoznate nečistoće RRT 0,27 korišćena je LC-MS kompatibilna metoda u kojoj je hromatografsko razdvajanje omogućeno pomoću Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HT kolone (1,8  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  4,6 mm i.d.) korišćenjem gradijentnog programa sa mobilnom fazom A (0,64 g/l Amonijum formijat pH= 8,5 sa  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) i mobilnom fazom B (acetonitril) uz radnu temperaturu od 35 °C i protok mobilne faze od 1,0 ml/min. Korišćeni gradijentni program bio je: 0 min 10%B, 7,5 min 15%B, 7,6 min 70%B, 12 min 70%B, 12,1 min 10%B, 15 min 10%B. Na hromatogramu 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 najintenzivniji pik nastalih razgradnih proizvoda je poticao od nepoznate razgradne RRT 0,27.

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  $\mu\text{g/ml}$ . Korišćena spektrofotometrijska kvarcna kiveta omogućavala je optički put od 10 mm i spektri su snimani u opsegu 190-1100 nm. Iako su u pitanju veoma strukturno slična

jedinjenja, očigledan je uticaj prisustva ili odsustva supstituenata na prisutne hromofore koji rezultuje različitim UV-Vis spektrima. Prisustvo izrazite, izdvojene apsorpcione trake pri višim talasnim dužinama (321 nm) kod Nečistoće A (5-Metoksi-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.

Struktura esomeprazola i 11 ispitivanih uzoraka nečistoća esomeprazola je određena pomoću 1D i 2D NMR spektroskopije. 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 DMSO-d<sub>6</sub> (sem nečistoća F i G koje su rastvarane u CDCl<sub>3</sub> uz dodatak DMSO-d<sub>6</sub>). HMBC eksperimenti su optimizovani za  $nJCH = 8$  Hz and  $1JCH = 145$  Hz. <sup>13</sup>C NMR spektri su snimani na istom instrumentu na 125 MHz. Asignacija <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR signala je urađena uz pomoć snimljenih HSQC, HMBC i NOESY 2D NMR spektara. 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. Čvorni 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. Rezultati asignacija i odgovarajuća hemijska pomeranja asigniranih <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR signala prikazana za svih 11 ispitivanih jedinjenja u tabelarno uz ilustrativni prikaz nekih od snimljenih <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC i HMBC NMR spektara.

### **Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

U seriji od šest radova Brändström i sar. opsežno ispituju hemijske reakcije omeprazola i njegovih analoga u odsustvu i prisustvu 2-Merkaptoetanolu. Eksperimenti su osmišljeni i fokusirani na hemijsku simulaciju in-vivo ponašanje omeprazola i objašnjenje mehanizma njegovog dejstva u organizmu gde 2-merkaptoetanol pretstavlja model enzima protonske pumpe. Razgradni proizvodi omeprazola koji se pominju u ovom opsežnom istraživanju su proizvodi transformacije omeprazola koji se javljaju u kiseloj 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-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, <sup>1</sup>H-NMR i maseno spektrometrijskih merenja. Brezeziska [30] je ispitivala uticaj temperature i relativne vlažnosti vazduha na stabilnost omeprazola u čvrstom stanju. Promenu njegove 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. 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<sup>+</sup> 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 pretpostavljen je degradacioni put esomeprazola.

U ovom radu uspešnim razvojem i međusobnim kombinovanjem više različitih hromatografskih i spektrometrijskih metoda, i teorije, po prvi put su detaljno proučeni 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.

esomeprazol natrijum u čvrstom stanju je izlagan 24 sata termalnom tretiranju na 110 °C, (izloženo vazduhu, grejna ploča) i 25 °C, 30 °C i 40 °C tokom 36 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.i 36 meseca). Hromatografski profil nečistoća dobijen opisanom RP-HPLC metodom ukazivao je na pojavu i porast tri glavna razgradna proizvoda sa relativnim retencionim vremenima RRT 0.48, RRT 1.16, i RRT 0.81. Ovi degradacioni proizvodi kasnije su identifikovani kao 4-hidroksi omeprazol, omeprazol sulfon i N-metil omeprazol. Iz studije 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.

Poreklo Nečistoće A, 5-Methoxy-1H-benzimidazole-2-thiola leži u činjenici da je ona jedan od polaznih materijala u sintezi esomeprazola. 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. 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 prizvodu 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, 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 razgradnje esomeprazola. Izvesno nastajanje Nečistoće E i Nečistoće I uočeno je samo pri uslovima bazne razgradnje esomeprazola. Nečistoće F i G su čisto degradacioni proizvodi. Pojava ovih nečistoća zapažena je u najvećem stepenu pod uslovima kisele razgradnje esomeprazole, u značajnom nivou pod uslovima termalne razgradnje esomeprazole, ali i pri forodegradaciji esomeprazola. Pretpostavljeno je da one nastaju uklanjanjem metil grupe sa metoksi grupe piridninskog dela molekule i formiranjem tiokso cikličnog prstena. Pretpostavljeni mehanizam njihovog nastanka, ilustruje na najbolji način sklonost esomeprazola ka specifičnim hemijskim transformacijama, a na jednoj od njih se i bazira mehanizam njegovog dejstva u organizmu. Upravo proizvod jedne takve hemijske transformacije omeprazola, ciklični sulfenamid omeprazola, koji nastaje u kiseloj sredini parijetalnih ćelija je odgovoran za biološku aktivnost leka. 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. Oni nastaju dimerizacijom analoga sulfenske kiseline omeprazola koja je u ravnoteži sa dominantno prisutnim analogom sulfenamida omeprazola.

Uprkos činjenici da su esomeprazol, odnosno omeprazol, dugo i, naizgled, u svakom aspektu proučavana jedinjenja, nije poznata studija u okviru koje je definisan mehanizam njihove degradacije u svetlu njihove dalje farmaceutske upotrebe, što je, u okviru ove disertacije, detaljno prikazano. Svako od nečistoća utvrđena je struktura što je bio jedan od neophodnih preduslova u za dalju registraciju gotovih farmaceutskih proizvoda u kojima esomeprazol ulazi kao aktivni princip. Detaljno su prezentirani rezultati spektrometrijske karakterizacija esomeprazola i njegovih nečistoća. Dalje su prezentirani rezultati (određivanje strukture) studije NMR, LC-MS identifikacije glavnih nepoznatih degradacionih proizvoda esomeprazola. Detaljno je objašnjeni putevi degradacije esomeprazola i poreklo i način nastajanja svakog od njegovih

glavnih degradacionh proizvoda. RP-HPLC metoda koja je razvijena i validirana za namenu kvalitativnog i kvantitativnog određivanja nečistoća esomeprazole ušla u registracionu dokumentaciju gotovih farmaceutskih proizvoda koji se baziraju na esomeprazolu i time će se koristiti u rutinskoj kontroli kvaliteta čistoće proizvoda. Na osnovu utvrđenih relativnih faktora odgovora omogućena je tačnu kvantifikaciju nečistoća bez upotrebe njihovih referentnih standarda. Na sličan način razvijena RP-HPLC hiralno selektivna metoda koristi će se za kontrolu kvaliteta hiralne čistoće proizvoda. Zahvaljujući ovim ispitivanjima i formiranju pogodnih hromatografskih metoda, dalje je bilo moguće ispitivati ponašanje i stabilnost esomeprazole u raznim razvojnim farmaceutskim formulacijama, na osnovu čega se je i vršio konačan izbor formulacije. Ispitivanjima stabilnosti esomeprazole 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.

#### **D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze**

Deo rezultata istraživanja iz oblasti problematike ove teze autor je već publikovano u naučnim časopisima i materijalima naučnih skupova, a spisak tih publikacija je sledeći:

##### **D1. Radovi u međunarodnim naučnim časopisima (M23):**

1. **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
2. 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
3. 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

##### **D2. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):**

1. 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.

##### **D3. Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (M63):**

1. 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

2. **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, 71-73
3. 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
4. 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
5. 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



## E. Zaključak

Na osnovu izložene analize doktorske disertacije Aleksandra (Dragomir) Pavlovića, komisija je došla do zaključka da postoji originalan i značajan naučni doprinos u oblasti fizičko-hemijskih nauka. Deo rezultata istraživanja iz oblasti problematike ove teze kandidat je publikovao u vidu 3 naučna rada u međunarodnim časopisima i 6 saopštenja da domaćim i međunarodnim naučnim skupovima.

Imajući u vidu rezultate do kojih je kandidat došao u svom istraživanju, kao i njihov naučni i praktični značaj, predlažemo Nastavno-naučnom veću Fakulteta za fizičku hemiju da disertaciju Aleksandra (Dragomir) Pavlovića pod naslovom:

**„Tečno-hromatografska i spektrometrijska karakterizacija i određivanje esomeprazola, njegovih nečistoća i degradacionih proizvoda“**

prihvati i da odobri njenu javnu odbranu u cilju sticanja naučnog stepena *doktor fizičko-hemijskih nauka*.

### Članovi komisije:

1. Dr Ljubiša Ignjatović

Vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

2. Dr Vlatka Vajs

Redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. Dr Miroslav Kuzmanović

Vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

4. Dr Marko Daković

Docent, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu