

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Aleksandar R. Mladenović

**PROUČAVANJE STABILNOSTI  
DONEPEZIL-HIDROHLORIDA  
RAZLIČITIM ANALITIČKIM METODAMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Aleksandar R. Mladenović

**INVESTIGATION OF DONEPEZIL-  
HIDROCHLORIDE STABILTY USING  
VARIOUS ANALYTICAL METHODS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

---

Dr Slobodan D. Petrović, redovni profesor  
Tehnološko-metalurškog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Milka L. Avramov Ivić, naučni savetnik  
IHTM Institut za elektrohemiju  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Vlatka Vajs, redovni profesor  
Hemijskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Sote Vladimirov, redovni profesor  
Farmaceutskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Saša Drmanić, vanredni profesor  
Tehnološko-metalurškog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

## *Zahvalnica*

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na IHTM-u, u Institutu za elektrohemiju i Centru za hemiju IHTM, na katedri za Organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu i laboratoriji Razvoja analitike farmaceutsko-hemijske industrije Hemofarm A.D. STADA u Vršcu.*

*Želeo bih da se zahvalim svima koji su doprinijeli da ovaj rad dobije konacnu formu. Mentoru, dr Slobodanu Petroviću, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu najsrdačnije zahvaljujem na iskrenom i sveobuhvatnom angažovanju, sugestijama i podršci u toku doktorskih studija koji je i u najvećoj meri doprineo uspešnoj realizaciji ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Milki Avramov Ivić, naučnom savetniku IHTM za veliki doprinos u toku realizacije rada, stručnu pomoć i savete prilikom eksperimentalnog rada u vezi sa elektrohemijskim ispitivanjem.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Vlatki Vajs, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, na pruženoj mogućnosti da deo eksperimenatalnih određivanja bude urađen u Centaru za hemiju. Posebnu zahvalnost dugujem dr Milki Jadranin i dr Dejanu Godevcu iz Centra za hemiju na pomoći u eksperimentalnoj analizi.*

*Takođe bih se zahvalio i dr Soteu Vladimirovu, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta i dr Saši Drmaniću, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta na stručnoj pomoći i savetima u izradi doktorske disertacije.*

*Želim da izrazim svoju zahvalnost kolegama iz Sektora Istraživanja i Razvoja kompanije Hemofarm A.D. STADA na podršci i pomoći.*

*Na kraju bih se zahvalio svojoj majci, ocu i bratu na bezuslovnoj ljubavi, poverenju i podršci koju mi pružaju svih ovih godina.*

## **Proučavanje stabilnosti donepezil-hidrohlorida različitim analitičkim metodama**

### **IZVOD**

Predmet ove doktorske disertacije je proučavanje stabilnosti donepezil-hidrohlorida, ispitivanjem razgradnih proizvoda nakon različitih uslova forsirane razgradnje. Stabilnost donepezil-hidrohlorida kako u čistom tako i u komercijalnom obliku je ispitivana sprovođenjem studije forsirane razgradnje. Uzorci za ispitivanje su radi toga bili podvrgnuti kiseloj i alkalnoj hidrolizi, oksidaciji i razgradnji pri zagrevanju kao i elektrohemijskoj razgradnji.

Ispitivana je i elektrohemijska aktivnost donepezil-hidrohlorida u čistom obliku. Elektrohemijske reakcije su praćene pomoću različitih elektrohemijskih metoda (ciklične voltometrije i voltometrije sa pravougaonim impulsima) na elektrodi od zlata. Za analizu elektrolita u elektrohemijskim eksperimentima korišćene su i druge analitičke metode (HPLC, MS i NMR) radi potvrde podataka dobijenih elektrohemijskim ispitivanjima i objašnjenja procesa elektrohemijske oksidacije i predviđanja stabilnosti donepezil-hidrohlorida.

Naučni cilj ovog rada je da se ispitivanjem stabilnosti odgovarajućim transformacijama donepezil-hidrohlorida razviju metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida u rastvorima i da se analizom dobijenih rastvora nakon određenih reakcija forsirane razgradnje utvrdi priroda transformacija ispitivanog molekula. U tom cilju izvršena je karakterizacija dobijenih razgradnih proizvoda korišćenjem HPLC tehnika, IR i UV-Vis spektrofotometrije, LC-MS merenjima i 1D i 2D NMR spektroskopskih metoda. Proizvodi dobijeni oksidativnom razgradnjom koji su identifikovani predstavljaju proizvode metabolizma u ljudskom organizmu. Takođe, dobijeni eksperimentalni rezultati su upoređeni sa in-silico predviđenim razgradnim proizvodima uz pomoć softvera za predviđanje hemijskih reakcija. U ovom radu su ispitivani i razgradni proizvodi, koji se literaturno ne pominju u ranijim radovima kao razgradni proizvodi, a proizvodi su transformacije donepezila u oksidaciji u prisustvu oksidacionog sredstva i posebno proizvodi nastali elektrohemijskim transformacijama.

Rezultati koji će proisteći iz istraživanja treba da doprinesu razvoju novih selektivnih, osetljivih, efikasnih, HPLC i elektrohemijskih metoda za kvalitativno i

kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida u čistim (aktivna farmaceutska supstanca) i različitim komercijalnim oblicima, uključujući i biološke uzorke.

**Ključne reči:** donepezil-hidrohlid, stabilnost, forsirana razgradnja, HPLC, LC-MS, NMR, ciklična voltometrija, voltometrija sa pravougaonim impulsima, in-silico predviđanje razgradnje.

**Naučna oblast:** Hemijske nauke.

**UDK broj:** 615:543.

## **Investigation of donepezil-hydrochloride stability using various analytical methods**

### **ABSTRACT**

The subject of this doctoral thesis is investigation of donepezil hydrochloride stability, by examination of the degradation products formed under different forced degradation conditions. The stability of donepezil hydrochloride both in pure form and in the commercial form is examined by conducting forced degradation studies. Samples were subjected to an acidic and alkaline hydrolysis, oxidation, degradation under thermal conditions as well as the electrochemical degradation.

Electrochemical activity of donepezil hydrochloride in a pure form was also investigated. Electrochemical reactions are monitored using various electrochemical methods (cyclic voltammetry and square wave voltammetry) on a gold electrode. For the analysis of electrolytes in electrochemical experiments other analytical methods (HPLC, MS and NMR) were used to confirm the obtained data in electrochemical experiments, to evaluate the involved process of electrochemical oxidation and to predict donepezil hydrochloride stability.

The scientific objective of this paper is to investigate the stability and transformations of donepezil hydrochloride involved in order to develop methods for qualitative and quantitative determination of donepezil hydrochloride in solutions and by analyzing the obtained solutions under a certain forced degradation conditions to determine the nature of the transformation of the tested molecule. In this intention the characterization of degradation products was performed using the HPLC technique, IR and UV-Vis spectrophotometry, LC-MS measurements and 1D and 2D NMR spectroscopic methods. Products obtained by the oxidative degradation which have been identified are products of metabolism in the human body. Also, the obtained experimental results were compared with in-silico predicted degradation products with the help of software for predicting chemical reactions. In this study, the degradation products were examined, which are not mentioned in the literature earlier works as degradation products, which are obtained by transformation of donepezil under oxidation conditions in the presence of an oxidizing agent or products of electrochemical transformations.

The results that arised from this research should contribute to the development of new selective, sensitive, efficient, HPLC and electrochemical methods for the qualitative and quantitative determination of donepezil hydrochloride in pure (as active pharmaceutical ingredient) and a variety of commercial forms including biological samples.

**Keywords:** donepezil-hydrochloride, stability, forced degradation, HPLC, LC-MS, NMR, cyclic voltammetry, square wave voltammetry, in-silico predicted degradation.

**Scientific field:** Chemical sciences.

**UDC number:** 615:543.



## SKRAĆENICE

ACh	acetylcholine	acetilholin
AChE	acetylcholinesterase enzyme	enzim acetilholinesteraza
AD	Alzheimer's disease	Alchajmerova bolest
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku
API	active pharmaceutical ingredient	aktivna farmaceutska supstanca
APPI	atmospheric pressure photoionization	fotojonizacija na atmosferskom pritisku
BDE	bond-dissociation energy	energija disocijacija veza
BuChE	butyrylcholinesterase	butirilholinesteraza
CAMEO	Computer Assisted Mechanistic Evaluation of Organic reactions	Mehanistička evaluacija organskih reakcija potpomognuta računarom
CDMCPE	$\beta$ -cyclodextrin modified carbon paste electrode	$\beta$ -ciklodekstrin modifikovana elektroda od ugljenične paste
CE	capillary electrophoresis	kapilarna elektroforeza
ChE	cholinesterase	holinesteraza
CHEIs	acetylcholinesterase inhibitors	inhibitori holinesteraza
CI	chemical ionization	hemijska jonizacija
CID	collision-induced dissociation	disocijacija izazvana sudarima
CL	chemiluminescence	hemiluminescencija
$^{13}\text{C}$ NMR	$^{13}\text{C}$ nuclear magnetic resonance	nuklearna magnetna rezonancija ugljenikovog izotopa $^{13}\text{C}$
COSY	correlated spectroscopy	korelisana spektroskopija
CPE	carbon paste electrode	elektroda od ugljenične paste

CV	cyclic voltammetry	ciklična voltometrija
DAD	diode array detector	Fotodiodni detektor
DELPHI	Degradation Expert Leading to Pharmaceutical Insight	Ekspertski sistem za predviđanje razgradnje farmaceutskih supstanci
DPV	differential pulse voltammetry	diferencijalna pulsna voltometrija
ECD	electrochemical detector	elektrohemijski detektor
ECD	electron-capture dissociation	disocijacija zahvatom elektrona
EI	electron ionization	elektronska jonizacija
EMA	European Medicines Agency	Evropska Medicinska Agencija
ESI	electrospray ionization	elektrosprej jonizacija
ESI-LC-TOF	electrospray ionization – liquid chromatography- time-of-flight mass spectrometry	elektrosprej jonizacija-tečna hromatografija- masena spektroskopija na bazi vremena preleta
ETD	electron-transfer dissociation	disocijacija prenosom elektrona
FDA	Food and Drug Agency	Agencija za hranu i lekove
FL	fluorescence	fluorescencija
FMO	frontier molecular orbital	granična molekulska orbitala
FTICR	Fourier transform ion cyclotron resonance	maseni analizator jon ciklotronske rezonancije sa Furijeovom transformacijom
FT-MS	Fourier transform based mass spectrometry	masena spektrometrija sa Furijeovom transformacijom
FT-OT	Fourier tranform-orbitrab	maseni analizator orbitrap sa Furijeovom transformacijom
GC	gas chromatography	gasna hromatografija
GCE	glassy carbon electrode	elektroda od staklastog ugljenika
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation	heteronukelarna korelisana spektroskopija preko više hemijskih veza
HMDE	hanging mercury drop electrode	kapljuća živina elektroda

<sup>1</sup> H NMR	<sup>1</sup> H nuclear magnetic resonance	nuklearna magnetna rezonancija vodonikovog izotopa <sup>1</sup> H
HPLC	high performance liquid chromatography	visokoefikasna tečna hromatografija
HOMO	highest occupied molecular orbital	najviša popunjena molekulska orbitala
HR/MS	high resolution mass spectrometry	masena spektrometrija visoke rezolucije
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation	heteronuklearna jedno-kvantna korelisana spektroskopija
IC50	half maximal inhibitory concentration	koncentracija pri kojoj se ispoljava polovina maksimalnog inhibitornog dejstva leka
ICH	International conference on harmonisation	Internacionalna konferencija o harmonizaciji
IR	infrared	infracrvena
IS	internal standard	interni standard
IT	ion trap	jonski trap
LC	liquid chromatography	tečna hromatografija
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry	tečna hromatografija-masena spektrometrija
LC-MS-MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	tečna hromatografija-tandem masena spektrometrija
LLOQ	lower limit of quantification	donji nivo limita kvantifikacije
LOD	limit of detection	limit detekcije
LOQ	limit of quantification	limit kvantifikacije
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital	najniža nepopunjena molekulska orbitala
MO	molecular orbital	molekulska orbitala
MS	mass spectrometry	masena spektrometrija
MS-MS	tandem mass spectrometry	tandem masena spektrometrija
m/z	mass to charge ratio	odnos mase i naelektrisanja
NMR	nuclear magnetic resonance	nuklearna magnetna rezonanca

NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy	spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta
PDA	photodiode array	fotodiodni detektor
QQQ	triple quadrupole	trostruki kvadrupol
Q-TOF	quadrupole time-of-flight mass spectrometer	hibridni maseni spektrometar tipa kvadrupol - maseni detektor na bazi vremena preleta
RC	regenerated cellulose	regenerisana celuloza
RID	refractive index detector	detektor referaktivnog indeksa
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography	reverzno-fazna visoko efikasna tečna hromatografija
RP-LC	reversed-phase liquid chromatography	reverzno-fazna tečna hromatografija
RRF	relative response factor	relativni faktor odgovora
RRT	relative retention time	relativno retenciono vreme
RSD	relative standard deviation	relativna standardna devijacija
Rt	retention time	retenciono vreme
SCE	saturated calomel electrode	zasićena kalomelova elektroda
SFC	supercritical fluid chromatography	natkritična hromatografija
SID	surface-induced dissociation	disocijacija izazvana sudarima sa površinom
s/n	signal to noise	odnos signala i šuma bazne linije
SPE	solid-phase extraction	čvrsto-tečna ekstrakcija
SRM	single reaction monitoring	praćenje izabrane reakcije
SWV	square wave voltammetry	voltometrija sa pravougaonim impulsima
TLC	thin layer chromatography	tanko-slojna hromatografija
TMFE	thin mercury film electrode	elektroda presvučena tankim filmom žive

TOCSY	total correlation spectroscopy	totalna korelaciona spektroskopija
TOF	time-of-flight	maseni detektor na bazi vremena preleta
USP	United States Pharmacopeia	Američka Farmakopeja
UV-VIS	ultraviolet-visible	ultraljubiča-vidljiva
2D IT	two-dimensional linear ion trap	dvodimenzionalni linearni jonski trap
3D IT	three-dimensional triple quadrupole linear ion trap	trodimenzionalni linearni jonski trap

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO .....	3
2.1 Inhibitori holinesteraze u terapiji Alchajmerove bolesti .....	3
2.1.1 Mehanizam inhibicije enzima holinesteraze.....	5
2.1.1.1 Acetilholinesteraze - Struktura i katalitička aktivnost.....	5
2.1.2 Reverzibilni i progresivni inhibitori .....	7
2.1.3 Reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze.....	8
2.1.4 Farmakokinetička svojstva inhibitora acetilholinesteraza .....	9
2.1.5 Donepezil-hidrohlorid (fizičko-hemijske i farmakološke osobine).....	9
2.2. Identifikacija i poreklo nečistoća u farmaceutskim proizvodima.....	13
2.3. Analitičke metode ispitivanja lekova .....	15
2.3.1 Elektrohemijske metode .....	15
2.3.1.1 Voltometrija .....	15
2.3.1.1.1 Ciklična voltometrija .....	17
2.3.1.1.2 Pulsne metode.....	19
2.3.1.1.3 Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV, square-wave voltammetry).....	20
2.3.2 Spektroskopske metode .....	21
2.3.3 Separacione metode.....	22
2.3.3.1 Tečna hromatografija (LC).....	22
2.3.3.1.1 Reverzno fazna HPLC (RPLC) .....	24
2.3.3.1.2 Normalno fazna HPLC .....	24
2.3.3.1.3 Primena tečne hromatografije HPLC u analizi lekova .....	25
2.3.3.1.4 Validacija HPLC metoda.....	25
2.3.4 Tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC-MS) .....	28
2.3.5 Primena analitičkih metoda za određivanje donepezil-hidrohlorida .....	29
2.3.5.1 Metode elektrohemijskog određivanja donepezil-hidrohlorida.....	29
2.3.5.2 Metode spektrofotometrijskog određivanja donepezil-hidrohlorida.....	30
2.3.5.3 Primena hromatografskih HPLC metoda za određivanje donepezil-hidrohlorida .....	31
2.4 Stabilnost farmaceutskih preparata.....	38
2.4.1 Faktori koji utiču na stabilnost farmaceutskih proizvoda.....	39

2.4.2	Studije stabilnosti .....	40
2.4.3	Studije forsirane razgradnje .....	41
2.4.3.1	Studije forsirane razgradnje gotovih farmaceutske proizvoda .....	43
2.4.4	Hemija razgradnje farmaceutske proizvoda .....	44
2.4.4.1	Hidrolitička razgradnja .....	44
2.4.4.2	Oksidativna razgradnja .....	46
2.4.4.3	Termička razgradnja .....	48
2.4.4.4	Fotohemijska razgradnja .....	50
2.4.5	Eksperimentalni uslovi izvođenja studije forsirane razgradnje .....	51
2.4.5.1	Termička razgradnja .....	51
2.4.5.2	Hidrolitička razgradnja .....	51
2.4.5.3	Fotolitička razgradnja .....	52
2.4.5.4	Oksidativna razgradnja .....	52
2.5	Upotreba hromatografije i on-line strukturne identifikacije nečistoća korišćenjem tečne hromatografije-masene spektroskopije LC-MS .....	52
2.5.1	Izbor ESI, APCI ili APPI metode jonizacije .....	53
2.5.2	Maseni analizatori .....	54
2.5.3	Tandem masena spektrometrija .....	56
2.6	Izdvajanje i identifikacija nečistoća i proizvoda razgradnje .....	57
2.6.1	Metode izdvajanja .....	57
2.6.2	Preparativna HPLC .....	59
2.7	Primena NMR spektroskopije za karakterizaciju strukture .....	62
2.7.1	Jednodimenzionalni NMR eksperimenti .....	63
2.7.2	Dvodimenzionalni NMR eksperimenti .....	63
2.7.2.1	2D Korelaciona spektroskopija (COSY) .....	63
2.7.2.2	Inverzni heteronuklearni 2D NMR eksperimenti: HSQC i HMBC .....	64
2.8	Softverski programi za predviđanje razgradnje farmaceutske supstanci .....	65
2.8.1	Predviđanje stabilnosti farmaceutske supstanci prema oksidaciji .....	69
2.9	Cilj istraživanja .....	70
3.0	EKSPERIMENTALNI DEO .....	71
3.1	Materijali .....	71
3.2	Priprema rastvora potrebnih za validaciju metode .....	72

3.2.1 Linearnost metode .....	72
3.2.2 Tačnost metode.....	73
3.2.3 Preciznost metode.....	74
3.2.4 Stabilnost rastvora .....	74
3.2.5 Robustnost metode .....	74
3.3 Postupci forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida.....	76
3.3.1 Priprema uzoraka donepezil-hidrohlorida za ispitivanje forsirane razgradnje tečnom hromatografijom (HPLC) .....	76
3.3.1.1 Termička razgradnja donepezil-hidrohlorida .....	76
3.3.1.2 Kisela hidroliza donepezil-hidrohlorida .....	76
3.3.1.3 Alkalna hidroliza donepezil-hidrohlorida.....	77
3.3.1.4 Oksidacija donepezil-hidrohlorida .....	77
3.3.1.5 Elektrohemijska razgradnja donepezil-hidrohlorida .....	77
3.3.2 Priprema uzoraka komercijalnog proizvoda donepezil tableta za ispitivanje forsirane degradacije tečnom hromatografijom (HPLC).....	78
3.3.2.1 Termička razgradnja donepezil tableta.....	78
3.3.2.2 Kisela hidroliza donepezil tableta.....	78
3.3.2.3 Bazna hidroliza donepezil tableta.....	79
3.3.2.4 Oksidacija donepezil tableta.....	79
3.3.3 Priprema uzoraka za ispitivanje forsirane degradacije tečnom hromatografijom- masenom spektrometrijom (HPLC/MS).....	80
3.3.3.1 Termička razgradnja donepezil-hidrohlorida .....	80
3.3.3.2 Alkalna hidroliza donepezil-hidrohlorida.....	80
3.3.3.3 Oksidacija donepezil-hidrohlorida .....	81
3.3.4 Priprema uzoraka donepezil-hidrohlorida za elektrohemijska ispitivanja cikličnom voltametrijom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima .....	82
3.4 Aparati i uređaji .....	83
3.5 Metode.....	84
3.5.1 Ciklična voltometrija .....	84
3.5.2 Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV) .....	84
3.5.3 Tečna hromatografija.....	84
3.5.3.1 RP-HPLC metoda za određivanje srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida....	84
3.5.3.1.1 Aparatura i hromatografski uslovi.....	84



3.5.4 LC-MS metoda za određivanje srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida .....	85
3.5.4.1 Aparatura i hromatografski uslovi .....	85
3.5.5 HPLC semi-preparativna tečna hromatografija .....	86
3.5.5.1 Aparatura i hromatografski uslovi .....	86
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	88
4.1 Validacija metode .....	88
4.1.1 Linearnost .....	88
4.1.2 Limiti detekcije i kvantifikacije .....	89
4.1.3 Preciznost metode .....	89
4.1.4 Tačnost metode .....	90
4.1.5 Stabilnost rastvora .....	94
4.1.6 Robusnost metode .....	95
4.2 Ispitivanje proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida i komercijalnog proizvoda donepezil tableta pri različitim uslovima forsirane razgradnje primenom tečne hromatografije .....	99
4.2.1 Elektrohemijska razgradnja aktivne supstance donepezil-hidrohlorida .....	106
4.3 Ciklična voltometrija i elektrohemijska oksidacija donepezila na elektrodi od zlata .....	108
4.3.1 Izdvajanje glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje primenom semi-preparativne HPLC .....	109
4.3.2 Strukturna karakterizacija nepoznatog proizvoda elektrohemijske razgradnje ...	111
4.3.3 Analiza mehanizma nastajanja hidroksi derivata donepezila u elektrohemijskoj reakciji .....	113
4.3.4 Kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida voltametrijom sa pravougaonim impulsima na elektrodi od zlata .....	114
4.4 Ispitivanje forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida primenom tečne hromatografije-masene spektroskopije .....	116
4.4.1 Karakterizacija proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida primenom tečne hromatografije-masene spektroskopije .....	118
4.5 Semi-preparativno izdvajanje i strukturna karakterizacija proizvoda razgradnje nastalih oksidativnom razgradnjom donepezil-hidrohlorida .....	123
4.5.1 Strukturna karakterizacija razgradnog proizvoda RRT 0,48 .....	124
4.5.2 Strukturna karakterizacija razgradnog proizvoda RRT 0.58 .....	126

4.5.3 Predloženi putevi oksidativne razgradnje donepezil-hidrohlorida u vodenom rastvoru u prisustvu vodonik-peroksida .....	128
4.6 Poređenje eksperimentalno dobijenih podataka sa softverskim podacima rezgradnje donepezila.....	130
5. ZAKLJUČAK.....	138
6. LITERATURA .....	141
7. PRILOG.....	150
8. BIOGRAFIJA KANDIDATA .....	172
9. IZJAVA O AUTORSTVU .....	174
10. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE .....	175
11. IZJAVA O KORIŠĆENJU .....	176

## 1. UVOD

Alchajmerova bolest (AD), je jedan od najtežih bolesti koja se javlja kod starijih osoba. Alchajmerova bolest se opisuje kao neurodegenerativno oboljenje centralnog nervnog sistema koju karakteriše klinička slika progresivne demencije, sa intelektualnim padom, poremećajima memorije i kognitivnih funkcija. Za sada ne postoje lekovi koji bi značajnije uticali na tok bolesti i sve dosadašnje terapije samo ublažavaju pojedine simptome čineći ih podnošljivijim za bolesnike i njihovu okolinu. Glavna grupa lekova koji se danas koriste u terapiji ove bolesti su inhibitori acetilholinesteraze. Acetilholinesteraza (AChE) je jedan od najbitnijih enzima u familiji serinskih hidrolaza, katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetilholina, koji igra ključnu ulogu u kognitivnoj funkciji mozga. Holinergički deficit je odgovoran za postojeću kliničku sliku Alchajmerove bolesti. Jedna od glavnih terapijskih strategija koja se koristi u terapiji Alchajmerove bolesti je inhibicija biološke aktivnosti AChE čime se postiže povećanje nivoa acetilholina u mozgu, te se poboljšava holinergička transmisija, a samim tim pažnja, pamćenje i ponašanje [1].

Donepezil-hidrohlorid pripada klasi reverzibilnih inhibitora acetilholinesteraze. Donepezil-hidrohlorid, na osnovu literaturnih podataka i njegove hemijske strukture, predstavlja relativno stabilan molekul. Stabilnost donepezil-hidrohlorida kao aktivne supstance i u komercijalnom obliku, ispitivana je sprovođenjem studija forsirane razgradnje u uslovima kisele i alkalne hidrolize, oksidacije, termičke i elektrohemijske razgradnje.

Proučavanje proizvoda razgradnje donepezila (DP) koji su dobijeni u studiji forsirane razgradnje je urađeno korišćenjem razvijene "stability indicating" RP-HPLC metode, kao i korišćenjem modifikovane LC-MS kompatibilne metode koja je korišćena za identifikaciju razgradnih proizvoda u uzorcima forsirane razgradnje primenom masene spektrometrije visoke rezolucije. Iz masenog spektra su dobijene precizne mase iz kojih su izvedene molekulske formule supstance leka i razgradnih proizvoda i dokazana je specifičnost metode.

U ovom radu je ispitivano i elektrohemijsko ponašanje aktivne supstance donepezil-hidrohlorida i za ispitivanje korišćene su ciklična voltometrija i voltometrija sa pravougaonim impulsima. Elektrohemijski eksperimenti su sprovedeni u različitim

elektrolitima. HPLC je korišćena za analizu elektrolita tokom hemijskih reakcija. Za predviđanje stabilnosti prema oksidaciji i prepoznavanje procesa razgradnje molekula putem oksidacije izvršena je elektrohemijska razgradnja dugotrajnom ciklizacijom potencijala u elektrohemijskoj ćeliji. Glavni proizvod razgradnje koji je nastao tokom eksperimenta ciklične voltametrije sa donepezil-hidrohloridom na elektrodi od zlata u fosfatnom puferu je izolovan preparativnom HPLC, i izvršena je njegova strukturna karakterizacija korišćenjem MS i NMR tehnika.

U cilju ispitivanja stabilnosti donepezil-hidrohlorida i puteva transformacije molekula, posebno su proučavani i proizvodi razgradnje koji nastaju u uslovima oksidativne razgradnje pod uticajem vodonik-peroksida. Značajni proizvodi oksidativne razgradnje koji se javljaju pod ovim uslovima su izolovani korišćenjem semi-preparativne hromatografske tehnike radi strukturne identifikacije primenom masene spektrometrije i NMR spektroskopije.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1 Inhibitori holinesteraze u terapiji Alchajmerove bolesti

Ne postoje lekovi koji usporavaju ili sprečavaju progresiju Alchajmerove bolesti. Lekovi koji su trenutno odobreni od strane regulatornih agencija, kao što su američka agencija FDA i Evropska medicinska agencija (EMA), za terapiju kognitivnih manifestacija Alchajmerove bolesti i poboljšanje kvaliteta života pacijenata su: takrin (Cognex®), Donepezil (Aricept®), Rivastigmin (Exelon®) i Galantamin (Razadine®, ranije poznat kao Reminil®). Ova četiri leka koji pripadaju grupi inhibitora holinesteraze (CHEIs), su odobrena za lečenje blagih do umerenih simptoma Alchajmerove bolesti koji mogu da kontrolišu simptome i uspore njenu progresiju [2]. Inhibitori holinesteraze povećavaju količinu acetilholina koji je na raspolaganju za neuronsku transmisiju zahvaljujući sposobnosti da reverzibilno ili ireverzibilno inhibiraju aktivnost ChE.

Takrin (Cognex®), je prvi inhibitor acetilholinesteraze koji je odobren 1993, i predstavljao je veliki preokret u terapiji bolesti za koju se smatralo da ne postoji terapija. Međutim, danas je njegova klinička upotreba ograničena, zbog njegove hepatotoksičnosti [3]. Takrin je lek na bazi akridina i reverzibilno inhibira acetilholinesterazu (AChE) i butirilholinesterazu (BuChE) [4].

Donepezil-hidrochlorid (E2020, Aricept®) je bio drugi lek odobren od strane US FDA za primenu u terapiji koja ublažava simptome Alchajmerove bolesti u ranoj fazi bolesti. Donepezil pripada klasi reverzibilnih inhibitora derivata piperidina koji pokazuje visoku selektivnost prema enzimu AChE u odnosu na BuChE. Donepezil se vezuje za anjonski centar enzima, a pored reverzibilne inhibicije izaziva i indirektnu stimulaciju nikotinskih i muskarinskih receptora povećanjem nivoa acetilholina u sinapsama i ekstra-neuronske koncentracije acetilholina, noradrenalina i dopamina.

Rivastigmin (Exelon®), je odobren od strane FDA u 2000. Kao i takrin, vrši inhibiciju i AChE i BuChE [5]. Ispitivanjima je pokazano da rivastigmin selektivno inhibira holinesteraze u delovima mozga koji su najviše zahvaćeni holinergičkim deficitom u AB.

Galantamin je alkaloid koji se dobija sintetičkim putem, ili iz lukovica i cveta biljki *Galanthus caucasicus*, *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) i srodnih rodova. Pokazuje visoku in-vitro inhibiciju aktivnosti AChE sa IC50 vrednostima od 1.07 $\mu$ m [6].

Fizičko-hemijska svojstva ChE inhibitora određuju njihovo ponašanje i sposobnost distribucije u čovekovom organizmu. Oni su po strukturi tercijarni amini i kao takvi imaju sposobnost da prođu kroz krvno-moždanu barijeru (BBB). Svi inhibitori ChE imaju tercijarnu ili kvaternernu amino grupu, pošto im je neophodna katjonska struktura za vezivanje za aktivni centar enzima. pKa vrednosti tercijarnih amina omogućavaju protonovanje amino grupe na fiziološkoj pH vrednosti.

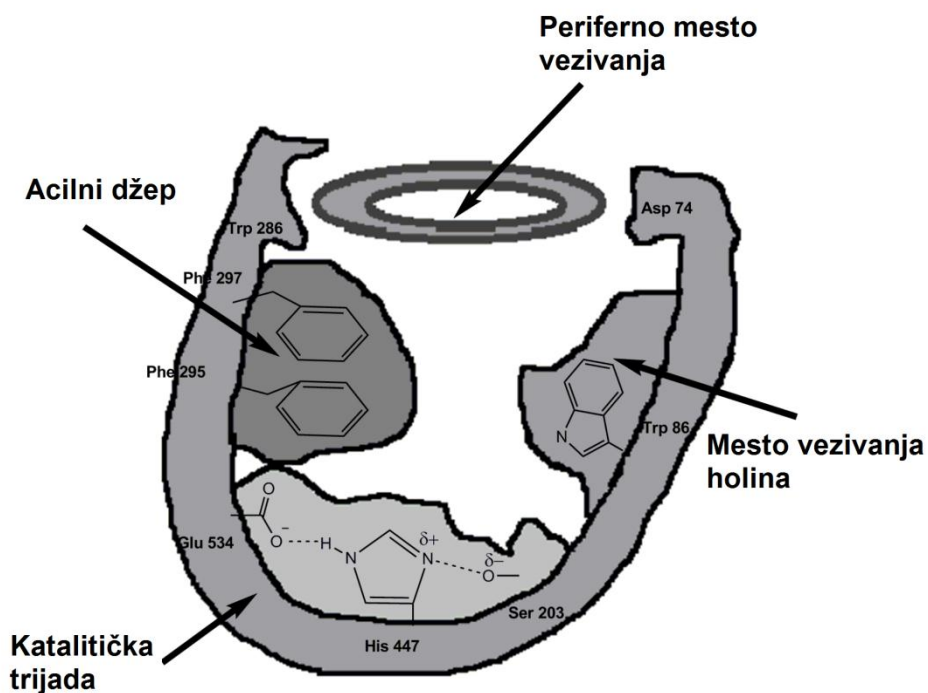
Tabela 1. Fizičko-hemijske osobine donepezila i nekih od inhibitora AChE

	fizistigmin	donepezil	galantamin
Komercijalni nazivi lekova	Eserine	Aricept	Reminyl
Molekulska masa (g/mol)	275.4	379.5	368.3
pKa	1.8, 7.9	8.9	8.2
LogP	1.6	1.09	4.7

## 2.1.1 Mehanizam inhibicije enzima holinesteraze

### 2.1.1.1 Acetilholinesteraze - Struktura i katalitička aktivnost

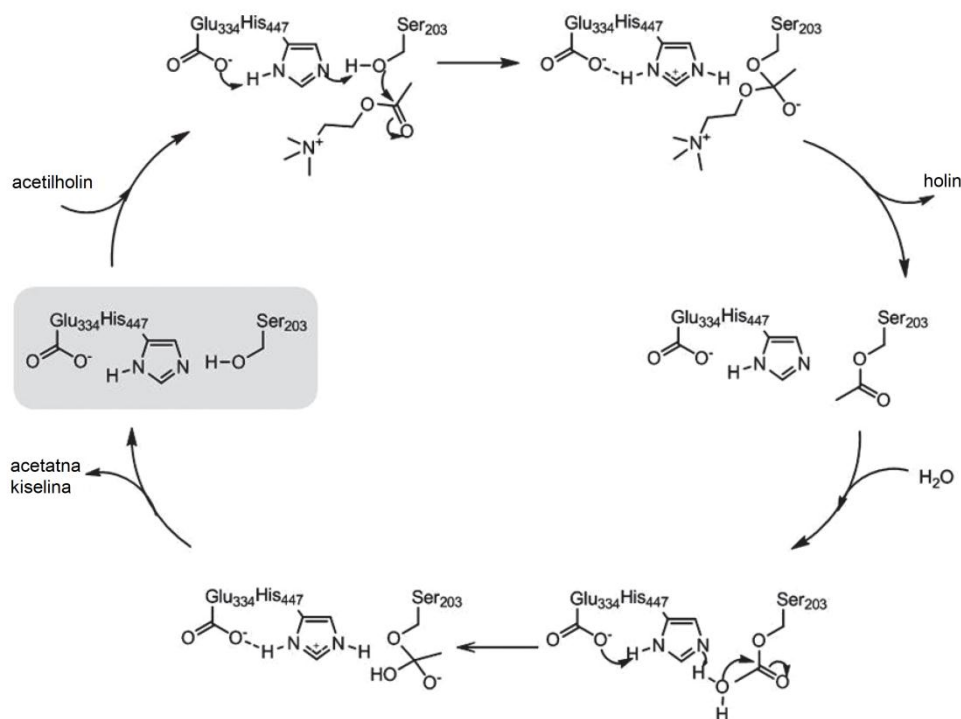
AChE je serinska hidrolaza koja se nalazi u neuromišićnim spojnicama i holinergičkim moždanim sinapsama. Njena osnovna biološka funkcija je terminacija transmisije impulsa u holinergičkim sinapsama putem hidrolize neurotransmitera ACh na acetat i holin. AChE enzim je  $\alpha/\beta$  protein koji je sačinjen od 537 amino kiselina koje obrazuju 12  $\beta$ -ravni i 14  $\alpha$  heliksa. Aktivno mesto molekula enzima se nalazi u šupljini dužine 20 Å i širine oko 5 Å [7]. Pomoću kristalografskih ispitivanja specifičnosti vezivanja liganada koristeći eksperimente ciljane mutageneze, identifikovane su četiri regije koje čine aktivno mesto enzima: a) katalitičko mesto (katalitička trijada s oksianjonskom šupljinom), b) holinsko mesto (katjon- $\pi$  mesto) važno za stabilizaciju pozitivnog naelektrisanja kvaternarnog dela holinskih supstrata, c) acilni džep u kome se smešta acilni deo supstrata i d) periferno mesto koje se nalazi na ivici šupljine (slika 1) [8].



Slika 1. Šematski prikaz aktivnog mjesta holinesteraza sa naznačenim strukturnim regijama

Katalitička trijada se nalazi na dnu šupljine, čine je aminokiseline Ser203, His447 i Glu334 koje direktno učestvuju u katalizi. Na anjonski deo ovog aktivnog mesta dolazi do vezivanja pozitivno naelektrisanog kvaternernog aminskog dela acetilholina, kao i kvaternernih liganada koji se koriste kao konkurentni inhibitori ovog enzima.

Mehanizam hidrolize supstrata acetilholina (ACh), prikazan je na slici 2 [9]. Hidroliza holinesterazama se odigrava u tri stupnja koji obuhvataju nastajanje Mihaelisovog kompleksa, acilovanje enzima i njegovo deacilovanje vodom. Procesi acilovanja i deacilovanja odvijaju se preko tetraedarskoga prelaznog stanja koji čine aktivni serin i supstrat. Reakcijom hidrolize karboksilnog estra nastaje acil-enzim i slobodni holin, a u sledećem stupnju acil-enzim podleže nukleofilnom napadu molekula vode uz učestvovanje His447 i dolazi do oslobađanja acetatne kiseline i regeneracije slobodnog enzima.



Slika 2. Reakcioni stupnjevi u hidrolizi acetilholina kataliziranog holinesterazama. Broj aminokiselina odnosi se na položaj aminokiseline u humanoј AChE.



Pored ovog aktivnog mesta i mesta vezivanja holina, AChE sadži i periferno anjonsko aktivno mesto vezivanja. Periferno mjesto humane AChE čine aminokiselinski lanci tirozina na položajima 72 i 124 i triptofan na položaju 286. Ove aminokiseline su važne za specifičnost inhibicije AChE sa ostalim kvaternim ligandima koji se ponašaju kao nekonkurentni ili konkurentni inhibitori ovog enzima. Periferno mesto je odgovorno i za alosterni mehanizam inhibicije AChE pri visokim koncentracijama acetilholina.

Poznavanje AChE strukture je veoma važno za razumevanje katalitičke efikasnosti i molekulskih osnova za specifičnost vezivanja ACh, kao i razumevanje mehanizma reakcija, a u svrhu dizajna novih efikasnih inhibitora enzima.

### **2.1.2 Reverzibilni i progresivni inhibitori**

Inhibitori acetilholinesteraze, pored ostalih grupa lekova, su klasa jedinjenja koja se dosledno pokazala efikasnim u lečenju kognitivnih i funkcionalnih simptoma Alchajmerove bolesti [10, 11]. Inhibitori su hemijska jedinjenja koji blokiraju aktivnost enzima, a njihovo delovanje može biti reverzibilno ili ireverzibilno. Na osnovu mehanizma inhibicije, AChE inhibitori se mogu podeliti u dve grupe: ireverzibilne i reverzibilne.

Reverzibilni inhibitori se nekovalentno vezuju za aktivno mesto holinesteraze (takrin, rivastigmin i dr.) ili se vezuju za periferno mesto enzima (galantamin i dr.). Takođe postoje i inhibitori koji se istovremeno reverzibilno vezuju za oba mesta na enzimu kao što je donepezil.

Ireverzibilni inhibitori deluju tako što se kovalentno vezuju za serin katalitičke trijade čime je onemogućena normalna hidroliza supstrata ACh. Da bi neki inhibitor bio ireverzibilan njegova struktura mora biti strukturno slična strukturi prelaznog stanja koje se javlja u enzimu u toku katalitičkog ciklusa i kovalentno se vezati za aminokiselinu koja učestvuje u reakciji sa supstratom. Ireverzibilni inhibitori AChE nemaju terapijski značaj u lečenju AB bolesti, pošto ireverzibilno inhibiraju enzim i onemogućavaju normalnu razgradnju ACh.

### 2.1.3 Reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze

Imajući u vidu postojanje dva aktivna vezna mesta enzima AChE, postoje dva predložena mehanizma reverzibilne inhibicije, odnosno konkurentni i nekonkurentni. Teoretski, konkurentni inhibitori se vezuju za katalitički centar i sprečavaju vezivanje acetilholina za enzim. Nekonkurentni inhibitori se vezuju za periferni aktivni centar enzima, sprečavajući da supstrat priđe katalitičkom aktivnom centru, ali ne na direktan način, već zahvajući dejstvu sternog efekta. Pošto se nekonkurentni inhibitori ne vezuju za katalitički aktivni centar enzima oni neće uticati ni na vezivanje molekula ACh sa katalitičkim centrom enzima. Ako se inhibitor veže za oba aktivna centra, katalitički i periferni, dolazi do kombinovane konkurentno-nekonkurentne inhibicije. Dok je inhibitor vezan za enzim, isključena je mogućnost istovremenog vezivanja substrata za enzim, tako da dolazi do konkurentne reakcije vezivanja substrata i inhibitora sa katalitičkim aktivnim centrom. Dok se supstrat katalitički konvertuje u proizvod, inhibitor nije pod katalitičkim uticajem enzima i koncentracija inhibitora se ne menja.

Reverzibilni inhibitori se vezuju za aktivno mesto (takrin, huperzin A) ili za periferno mesto enzima (galntamin) ili istovremeno za oba mesta. Prema tome inhibicija može biti posledica: a) konformacijske promene enzima uzrokovane vezivanjem inhibitora, b) elektrostatičkih interakcija pozitivno naelektrisanih inhibitora sa katjonskim delom supstrata u toku katalitičke reakcije ili c) sternih i/ili elektrostatičkih smetnji ulasku supstrata u aktivni centar enzima. Zajedničko strukturno obeležje svih potentnih inhibitora holinesteraza jeste prisutnost pozitivnog naelektrisanja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata, što olakšava ulazak i smeštanje inhibitora u aktivno mesto enzima. Izduženi ligandi koji imaju dva aromatska prstena ili dve pozitivno naelektrisane molekule udaljene 10 Å do 12 Å mogu se istovremeno vezati za holinsko i periferno mesto enzima kao donepezil [12].

Na osnovu specifičnosti supstrata, holinesteraze se dele na AChE i BuChE. AChE ima ulogu u hidrolizi ACh, dok se BuChE nalazi u glijalnim ćelijama i njena uloga je nedovoljno poznata. Studije strukture ovog kompleksa daju racionalno objašnjenje zašto E2020 ima visok afinitet i visok stepen selektivnosti prema AChE enzimu u odnosu na BuChE. Visoki stepen selektivnosti je posledica interakcije između E2020 i aromatskog ostatka koji učestvuje u prepoznavanju acetilholina na dnu

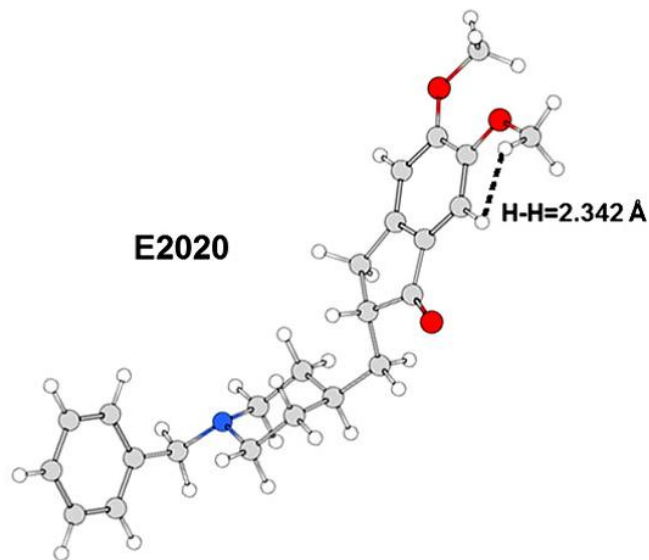
šupljine, Trp84, interakcije sa drugim aromatskim ostatkom na sredini šupljine, Phe330 i interakcije sa trećim aromatskim ostatkom, Trp279 koja čini anjonski centar na vrhu šupljine enzima. Na osnovu ove činjenice da poslednje dva aromatska ostatka koja postoje kod AChE, a nisu prisutni u BuChE, uzrokuju selektivnost koja je važna u kliničkim razmatranjima dejstva leka, pošto inhibicija BuChE može dovesti do sporednih dejstva leka.

#### **2.1.4 Farmakokinetička svojstva inhibitora acetilholinesteraza**

Inhibitori acetilholinesteraze imaju različita farmakokinetička svojstva. Metabolizam ovih lekova takrina, donepezila i galantamina se odigrava u jetri pomoću citohrom P450 sistema (CYP1A2-, CYP2D6-, CYP3A4-enzimi), dok se rivastigmin metaboliše putem C oksidacije. Farmakokinetičkim studijama nije pokazana potencijalna interakcija donepezila sa lekovima koji se metabolišu CYP1A2-, CYP2D6-, CYP3A4-enzimima kao što su memantin, risperidon, sertralin, levodopa, teofilin, furosemid, cimetidin, varfarin i digoksin [13-15]. Poluvreme eliminacije je različito i kreće se od 2-4 sata (takrin) do 4-6 sati (rivastagmin, galantamin) i 73 sata (donepezil). Bioraspoloživost pri oralnoj primeni ima maksimalnu vrednost za galantamin (100%) sa najmanjim procentom vezivanja za proteine plazme (10-20%) za razliku od donepezila (96%) [16-21].

#### **2.1.5 Donepezil-hidrohlorid (fizičko-hemijske i farmakološke osobine)**

Donepezil-hidrohlorid ima empirijsku formulu  $C_{24}H_{29}NO_3HCl$  i molarnu masu od 415,96. Donepezil-hidrohlorid je beli kristalni prah koji je dobro rastvoran u hloroformu, rastvoran u vodi i glacijalnoj sirćetnoj kiselini, slabo rastvoran u etanolu i acetonitrilu i praktično nerastvoran u etilacetatu i n-heksanu. Donepezil ima tercijernu amino grupu koja se nalazi na piperidnskom prstenu i koja je sposobna da prihvati proton ( $pK_a=8,9$ ).



Slika 3. Optimizovana struktura Donepezila (E2020) dobijena korišćenjem B3LYP/6-31+G(d,p)

Mehanizam dejstva donepezila kod pacijenata sa demencijom Ajchajmerovog tipa nije u potpunosti objašnjen. Ovaj lek pripada supstancama koje se reverzibilno vezuju i inaktiviraju enzim acetilholinesteraze i na taj način vrše inhibiciju hidrolize acetilholina. Kao rezultat, koncentracija acetilholina u holinergičkim sinapsama se povećava. Donepezil je otkriven od strane farmaceutske kompanije Eisai-Japan, koja je primenom skrininga pronašla *N*-benzilpiperazin derivat koji je pokazivao AChE inhibitornu aktivnost [22-24]. Primenom različitih modifikacija i ispitivanjima aktivnosti, *N*-benzilpiperazin je zamenjen sa *N*-benzilpiperidinom što je dalo dramatičan porast u anti-acetilholinesteraznoj aktivnosti i vodilo otkrivanju Donepezila. Donepezil je pokazao bolju efikasnost, minimalne neželjene efekte i visoku selektivnost. E2020 reverzibilno i specifično inhibira AChE formiranjem kompleksa u kome *N*-benzilpiperidinska grupa verovatno intereaguje sa anjonskim centrom, koji prepoznaje kvaternerna amonijum grupa acetilholina. In vitro eksperimentalni podaci i eksperimenti na životinjama ukazuju da je inhibitorna aktivnost donepezil relativno specifična prema enzimima acetilholinesteraze u mozgu u odnosu na enzime butirilesteraze u perifernim tkivima. Klinička ispitivanja su pokazala da inhibicija butirilholinesteraze može biti povezana sa neželjenim sporednim efektima dejstva leka. *N*-benzilpiperidinski derivati su veoma selektivni prema AChE u odnosu na butirilholinesterazu BuChE (IC<sub>50</sub> za AChE je 5,7 nM, dok je za BuChE je oko 7000 nM).

## Apsorpcija

Najviša koncentracija donepezila u plazmi se postiže otprilike 3 do 4 sata nakon peroralne primene. Koncentracije u plazmi i površina ispod krive povećavaju se srazmerno s dozom. Poluvreme eliminacije je približno 70 sati, tako da primena višestrukih doza jednom na dan rezultira u postupnom približavanju stanju dinamičke ravnoteže. Stanje dinamičke ravnoteže postiže se u toku od 3 nedelja od početka terapije. Kada se postigne stanje dinamičke ravnoteže, koncentracije donepezil hidrohlorida u plazmi i farmakodinamička aktivnost pokazuju vrlo malu varijabilnost u toku dana. Hrana ne utiče na apsorpciju donepezil-hidrohlorida.

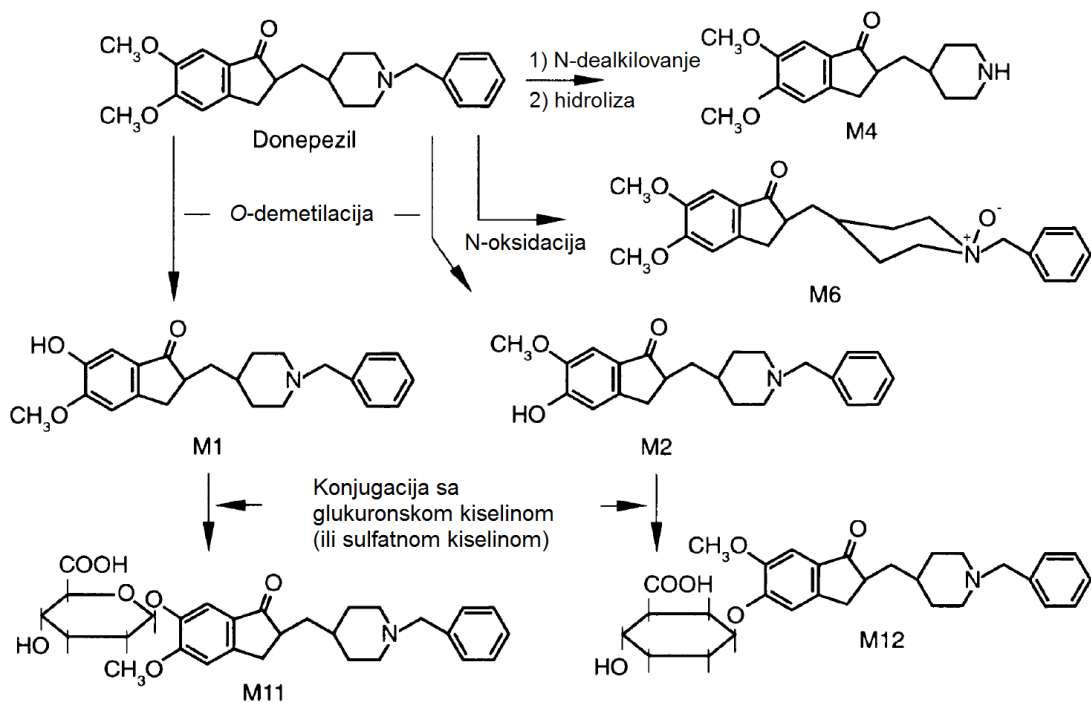
## Raspodela

Oko 95% donepezil-hidrohlorida se veže za albumine plazme. Nije poznat plazma protein koji veže njegov aktivni metabolit 6-O-desmetil donepezil. Raspodela donepezil-hidrohlorida u različitim tkivima tela nije dovoljno ispitana. Ipak, u studiji sprovedenoj na zdravim muškim ispitanicima, 240 sati nakon primene doze od 5 mg <sup>14</sup>C-obebeženog donepezil-hidrohlorida, oko 28% obebeženog donepezil-hidrohlorida ostalo je neotkriveno. Ovo ukazuje na to da donepezil-hidrohlorid i/ili njegovi metaboliti mogu ostati u telu više od 10 dana [14].

## Metabolizam/Izlučivanje

Donepezil-hidrohlorid se metaboliše u jetri sistemom citohroma P450 pod uticajem izoenzima CYP2D6 i CYP3A4, pri čemu nastaje više metabolita donepezila, od kojih četiri predstavljaju glavne metabolite koji nastaju putem tri osnovna metabolička puta: *O*-demetilacijom nastaju M1 i M2 koji parcijalnom glukoronizacijom prelaze u metabolite M11 i M12, *N*-dealkilacijom i hidrolizom nastaje metabolit M4 i *N*-oksidacijom nastaje metabolit M6 (slika 4). Nakon primene doze od 5 mg <sup>14</sup>C-označenog donepezil-hidrohlorida, radioaktivnost u plazmi, izražena u procentu primenjene doze, je bila prisutna kao nepromenjen donepezil-hidrohlorid (30 %), 6-O-desmetil donepezil M1 (11% - jedini metabolit koji pokazuje aktivnost sličnu donepezil-

hidrohloridu), donepezil cis-N-oksidi M6 (9 %), 5-O-desmetil donepezil M2 (7 %) i glukuronid konjugat 5-O-desmetil donepezila M12 (3 %) [14].



Slika 4. Predloženi putevi metabolizma donepezila [14]

Kod životinja je utvrđeno da donepezil ostaje u nepromenjenom obliku i da u nervnom tkivu nisu detektovani njegovi metaboliti. U krvnoj plazmi, urinu i žuči najveći broj metabolita donepezila su O-glukuronidi [14].

U zdravim ispitanicima glavni put eliminacije leka i njegovih metabolita je renalni, 79% donepezila se eliminiše putem urina, a 21% putem fecesa. Donepezil je glavni eliminacioni proizvod u urinu. Nema podataka koji bi ukazivali na enterohepatični ciklus donepezil-hidrohlorida i/ili njegovih metabolita. Koncentracija donepezila u plazmi se smanjuje s vremenom poluživota od oko 70 sati.

## 2.2. Identifikacija i poreklo nečistoća u farmaceutskim proizvodima

Nečistoća u farmaceutskom proizvodu leku, definisana je od strane Ineternacionalne Konferencije za Harmonizaciju ICH (Q3B), kao svaka komponenta leka čiji hemijski identitet neodgovara aktivnoj farmaceutskoj supstanci ili ekscipijensima u leku [25, 26]. Na osnovu ICH vodiča, nečistoće koje mogu biti prisutne u farmaceutskim proizvodima se mogu podeliti u sledeće kategorije:

1. Organske nečistoće,
2. Neorganske nečistoće i
3. Rezidualni rastvarači.

Organske nečistoće mogu nastati u procesu proizvodnje i/ili u toku čuvanja farmaceutskog proizvoda. One mogu biti identifikovane i neidentifikovane, isparljive ili neisparljive, a po poreklu mogu biti polazni materijali, intermedijeri, proizvodi razgradnje, sporedni proizvodi i reagensi ili katalizatori koji se koriste u procesu sinteze farmaceutskih proizvoda.

Neorganske nečistoće vode poreklo iz proizvodnih procesa. One takođe mogu biti identifikovane i neidentifikovane, a u njih se ubrajaju: neorganski reagensi, teški metali, neorganske soli i ostali neorganski materijali.

Rezidualni rastvarači su isparljive organske hemijske supstance koje se koriste u proizvodnji aktivne supstance, ekscipijenasu ili gotovog proizvoda.

Bezbednost jednog leka, odnosno doznog oblika, ne zavisi samo od toksikoloških karakteristika aktivne supstance, već i od toksikoloških karakteristika nečistoća u leku, uključujući i proizvode razgradnje aktivne supstance. Kao rezultat toga, strukture proizvoda razgradnje u nivou iznad propisanih limita za identifikaciju moraju biti određene, a njihova količina mora biti pažljivo praćena i kontrolisana tokom razvoja jednog leka.

Analitičkim ispitivanjem se vrši potvrđivanje predložene strukture nove hemijske vrste i obezbeđuje njen kvalitet i potrebna čistoća. Ovim se osigurava odsustvo neželjenih efekta od različitih nečistoća koje mogu kontaminirati proizvod kao što su sporedni proizvodi, interakcioni proizvodi ili proizvodi razgradnje jednog leka. Profil nečistoća predstavlja ključni podatak na osnovu kojeg regulatorne agencije vrše procenu kvaliteta, bezbednosti i efikasnosti leka prilikom podnošenja dokumentacije za

registraciju leka. Da bi se postigli i ostvarili ovi zahtevi neophodno je razviti širok spektar analitičkih testova koji se odnose na fizičko-hemijsku prirodu leka koji se testira koji će obezbediti kvalitet i bezbednost primene leka. Neophodno je razviti optimalnu analitičku metodologiju koja prati sve poznate i nepoznate nečistoće. Nepoznate nečistoće mogu nastati u reakcijama razgradnje i neophodno je poznavanje organske hemije i teoretski sagledati moguće reakcije i interakcije jedinjenja koji bi mogli nastati u materijalu (aktivna supstanca, farmaceutski ekscipijensi i rastvarači koji su korišćeni u proizvodnji farmaceutskog proizvoda). Pored toga, promene mogu nastati i u toku roka trajanja u zavisnosti od uslova čuvanja farmaceutskih proizvoda u njihovoj ambalaži ili pakovanju [27].

Informacije koje se dobijaju iz farmaceutskih analitičkih ispitivanja su osnov za razvoj i proizvodnju novih lekova. Ovi podaci se dobijaju u analitičkim ispitivanjima i izveštavaju se na različite načine sa ciljem da pokažu kvalitet, čistoću, i stabilnost ispitivanog novog leka ili leka sa tržišta. Podaci takođe doprinose i boljem razumevanju promena koje mogu nastati u sintezi, formulaciji leka i proizvodnji farmaceutskog oblika kroz razvoj novog leka ili modifikacije nakon registracije i odobrenja za puštanje na tržište.

U farmaceutskoj industriji analitička ispitivanja imaju veoma važnu ulogu u istraživanju i razvoju novih lekova i njima se vrši praćenje aktivnosti da bi se osiguralo da novi lek ispunjava utvrđene standarde, da je stabilan i da ispunjava zahteve i specifikacije kvaliteta u svom roku trajanja. Nakon što se lek odobri od strane regulatornih vlasti, na osnovu dokumentacije kojom se potvrđuje da su sve serije novog proizvoda po propisanim standardima uz korišćenje odobrenih sastojaka i proizvodnih procesa, on postaje odgovornost farmaceutskih analitičara u odeljenju kontrole kvaliteta ili obezbeđenja kvaliteta proizvođača. Na osnovu ovoga farmaceutska analiza predstavlja veoma važan proces u obezbeđivanju identiteta, bezbednosti, efikasnosti i kvaliteta farmaceutskog proizvoda [28].



## 2.3. Analitičke metode ispitivanja lekova

### 2.3.1 Elektrohemijske metode

Voltametrijske metode imaju visoku osetljivost i veoma širok linearni koncentracioni opseg za ispitivanje neorganskih i organskih molekula ( $10^{-12}$  do  $10^{-1}$  M). Voltametrijske metode se rutinski koriste za kvantitativno određivanje rastvorenih neorganskih i organskih materija. Voltametrijske metode se mogu koristiti u različitim istraživanjima, uključujući fundamentalna proučavanja procesa oksidacije i redukcije u različitim medijumima, adsorpcionih procesa na površinama, reakcionih mehanizama, kinetike procesa transfera elektrona, kao i difuziju i termodinamička svojstva solvatisanih molekula. Voltametrijske metode se primenjuju i za određivanje jedinjenja od farmaceutskog interesa, a kao detektori povezani sa HPLC-om, predstavljaju efikasnu tehniku za analize kompleksnih smeša.

Elektrohemijske metode koje se koriste u elektroanalitici lekova su:

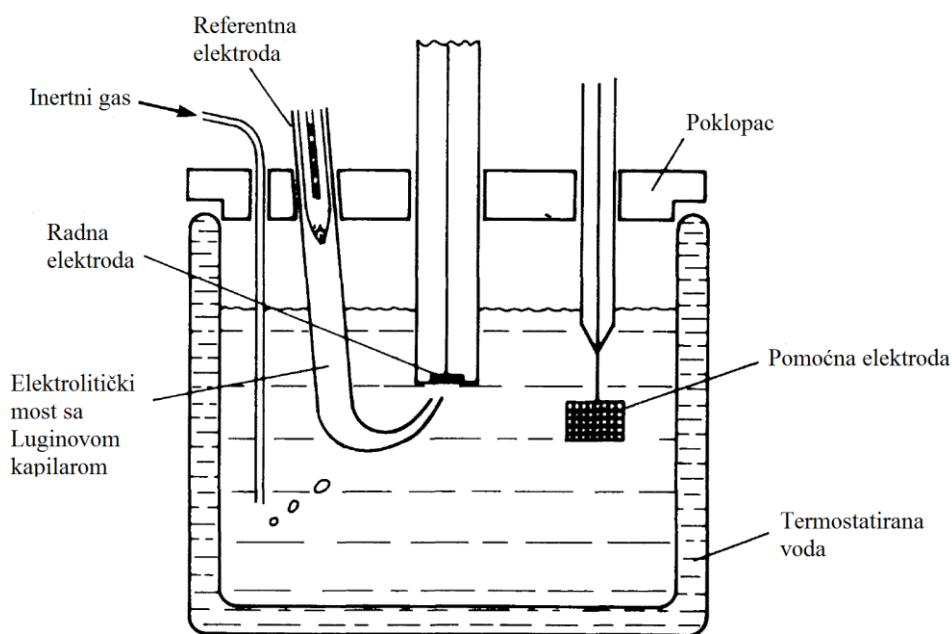
1. Voltametrija sa linearnom promenom potencijala,
2. Ciklična voltametrija,
3. „Stripping“ voltametrija sa taloženjem i rastvaranjem,
4. Diferencijalna pulsna voltametrija i normalna pulsna voltametrija,
5. „Square wave“ voltametrija – voltametrija sa pravougaonim impulsima [29, 30].

#### 2.3.1.1 Voltametrija

Voltametrija je elektrohemijska metoda u kojoj se koriste različite radne elektrode, npr HDME (kapljuća živina elektroda), TMFE (elektroda presvučena tankim filmom žive), GCE (elektroda od staklastog ugljenika), CPE (elektroda od ugljenične paste), Pt (platinska elektroda), Ag (elektroda od srebra), Au (elektroda od zlata) i dr. [29]. Voltametrija obuhvata skup elektroanalitičkih metoda kod kojih se merenjem jačine struje u zavisnosti od zadatog napona na stacionarnoj radnoj elektrodi dobijaju podaci o analitu [30].

U voltometriji se na radnu elektrodu koja se nalazi u elektrohemijskoj ćeliji dovodi promenjivi potencijal koji se naziva ekscitacioni potencijal. Ekscitacioni potencijal proizvodi struju koja prolazi kroz elektrohemijsku ćeliju u toku reakcije analita na radnoj elektrodi. Struja koja se dobija na radnoj elektrodi se sastoji od dve komponente, Faradejske struje, koja potiče od redukcije ili oksidacije analita na radnoj elektrodi i nefaradejske (kapacitivne ili kondenzatorske struje) koja nastaje usled pražnjenja elektrohemijskog dvostrukog sloja koji nastaje na površini radne elektrode [30]. Kondenzatorska ili kapacitivna struja nastaje zbog postojanja sloja između naelektrisanja na površini radne elektrode i suprotnog naelektrisanja na jonima ili dipolima rastvarača koji se nalaze neposredno uz samu elektrodu [31].

Voltometrijski sistem čine tri elektrode koje se nalaze u osnovnom elektrolitu u kome je rastvoren ispitivani analit. Jedna od elektroda predstavlja radnu elektrodu na kojoj se održava određeni potencijal ili se linearno menja sa vremenom. Radna elektroda predstavlja elektrodu na kojoj se odigrava ispitivana reakcija analita. Radna elektroda je uglavnom od inertnih metala kao što su plemeniti metali zlato, platina ili staklasti ugljenik i pirolitički grafit. Drugu elektrodu predstavlja referentna elektroda. [30]. Referentna elektroda se u elektrohemijsku ćeliju uvodi preko elektrolitičkog mosta sa Luginovom kapilaram. Vrh kapilare je postavljen na malom rastojanju od radne elektrode kako bi se otpornost elektrolita između elektrode i vrha kapilare bila svela na zanemarljivu vrednost, a mereni potencijal odgovarao vrednosti stvarnog elektrodnog potencijala koji se meri ili primenjuje na elektrodi. Referentna elektroda se pomoću elektrolitičkog mosta odvaja od elektrolita u elektrohemijskoj ćeliji, da ne bi došlo do mešanja elektrolita iz referentne elektrode i obrnuto [31]. Treća elektroda je pomoćna elektroda koja je često žica od platine ili zlata ili posuda sa živom čija je uloga da u sistemu omogući protok struje od izvora kroz elektrolit do radne elektrode. Na slici 5 je prikazana elektrohemijska ćelija koja se koristi za elektrohemijska merenja.



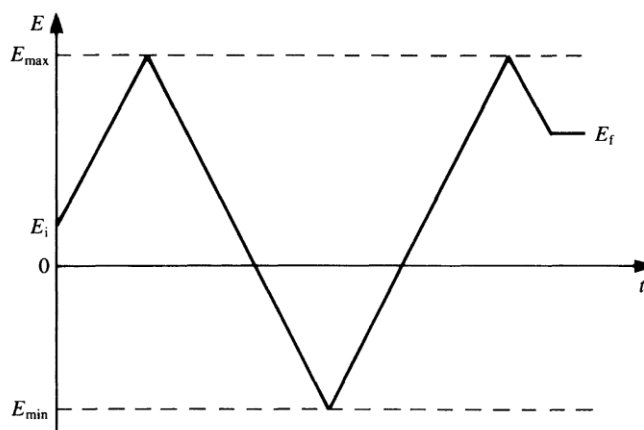
Slika 5. Šematski prikaz elektrohemijske ćelije sa tri elektrode [29]

Voltametrijskim tehnikama se dobija voltamogram koji predstavlja „elektrohemijski spektar“ koji pokazuje potencijale na kojima se odigravaju oksidacioni i redukcionni procesi, opisuje pojavu adsorpcije elektraktivnih vrsta i daje informacije o učešću homogenih reakcija u elektrohemijjskom procesu i slične informacije o ponašanju ispitivanog sistema [31].

#### 2.3.1.1.1 Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija predstavlja metodu kojom se vrši ispitivanje elektrohemijjskog sistema u celini, svih procesa koji se u njemu odigravaju u datom opsegu potencijala. Za ispitivanje svih procesa u sistemu u voltametriji se koristi jednostruko ili višestruko ponavljanje trougaonog pulsa potencijala koji se menja linearno u datom opsegu. Kada potencijal dostigne vrednost na kojem se određeni proces može odigrati primetnom brzinom, dolazi do naglog eksponencijalnog rasta vrednosti struje koja prolazi kroz sistem. Na usporavanje porasta vrednosti struje kroz sistem utiče pojava difuzione polarizacije, nakog čega struja dostiže maksimalnu vrednost. Posle dostizanja maksimalne vrednosti registrovane struje, struja koja je nastala u tom procesu pada na nultu vrednost, a registrovana struja ostaje na nekoj

minimalnoj vrednosti (određena kapacitetom elektrohemijskog dvosloja) ukoliko nije dostignut potencijal na kome se odigrava sledeći proces [31].



Slika 6. Linearna promena potencijala sa vremenom kod ciklične voltametrije.  $E_i$ -početni potencijal,  $E_f$ -krajnji potencijal,  $E_{min}$ -najmanji potencijal,  $E_{max}$ -najveći potencijal [29]

Snimanje cikličnih voltamograma se vrši tako što se u sistemu reverzno menja potencijal od vrednosti  $E_{max}$  do vrednosti  $E_{min}$  i ponovo do vrednosti  $E_{max}$  odgovarajućom brzinom skeniranja (sweep rate ( $dE/dt=v$ )) (slika 6).

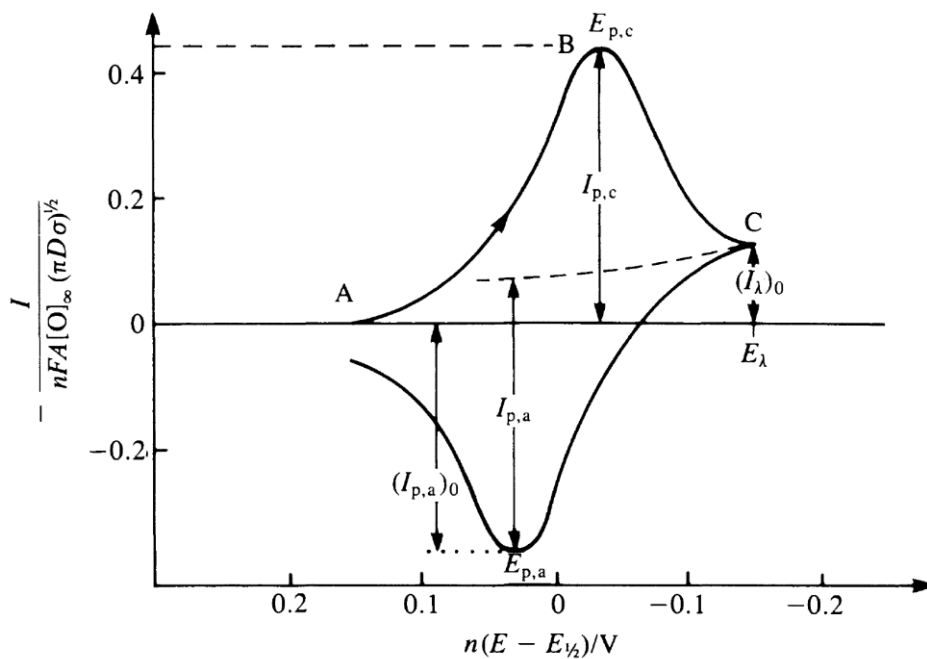
Za snimanje procesa oksidacije sistemu se zadaje početni elektrodni potencijal na kome se ne odigrava proces oksidacije a u toku snimanja se menja prema pozitivnijim vrednostima. Obrnuto za proces redukcije se zadaje početni elektrodni potencijal na kome se ne odigrava proces redukcije, a zatim se elektrodni potencijal menja prema negativnijim vrednostima. Elektrodni potencijal, u toku promene od početne do krajnje vrednosti, u datom trenutku se može opisati sledećom jednačinom:

$$E(t)=E_i +vt$$

Nakon postizanja krajnje vrednosti elektrodnog potencijala koja se za snimanje oksidacionog procesa obično postavlja na vrednost nešto nižu od potencijala oksidacije osnovnog elektrolita, elektrodni potencijal se vraća na početnu vrednost. Elektrodni potencijal, u toku promene od krajnje do početne vrednosti, u datom trenutku se može opisati sledećom jednačinom:

$$E(t)=E_i-vt$$

U toku vraćanja elektrodnog potencijala na početnu vrednost dolazi do redukcije vrste koja je oksidovana u direktnom snimanju. Brzina promene potencijala v ili brzina skeniranja kreće se od nekoliko mV/s do nekoliko stotina mV/s. Izgled cikličnog voltamograma za reverzibilni proces prikazan je na slici 7.



Slika 7. Izgled cikličnog voltamograma reverzibilnog procesa [29]

Kod voltametrijskog eksperimenta reduktivni proces se odigrava pri negativnoj vrednosti struje, a oksidacioni pri pozitivnoj vrednosti. Svaki proces u voltametrijskom eksperimentu je okarakterisan potencijalom vrha maksimuma struje i maksimumom vrednosti struje na voltamogramu [31].

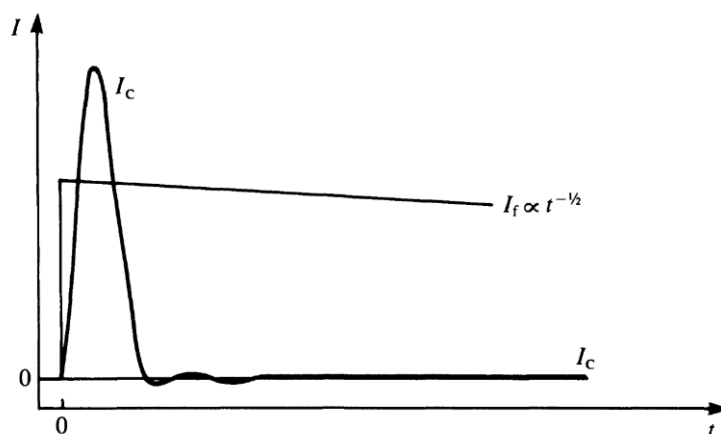
### 2.3.1.1.2 Pulsne metode

Nedostaci nekih voltametrijskih metoda se prevaziđeni razvojem novih pulsnih elektrohemijskih metoda kao što su voltametrija sa pravougaonim impulsima, normalna i diferencijalna pulsna voltametrija. Povećanje osetljivosti određivanja elektrohemijskih metoda se postiže povećanjem odnosa signala i šuma, tj. odnosa Faradejske i kondenzatorske struje ( $I_F/I_C$ ). Pristup koji se odnosi na delimično eliminisanje kondenzatorske struje (uglavnom izazvane periodičnim punjenjem i pražnjenjem dvostrukog sloja) u elektrohemijskom eksperimentu doveo je do pojave pulsnih

elektrohemijskih metoda. Kod ovih metoda se elektrodni procesi pobuđuju na različite načine korišćenjem periodičnih promena potencijala pravougaonih talasa sa konstantnom ili rastućom amplitudom  $\Delta E_A$ . Kao rezultat primene stepena potencijala na radnoj elektrodi, pri kraju trajanja impulsa ( $t_p$ ) uglavnom se meri Faradejska struja, dok je kapacitivna struja skoro potpuno nestala. Zavisnost kapacitivne struje u toku vremena primene impulsa je data jednačinom:

$$I_C = \frac{\Delta E_A}{R} \exp(-t/RC)$$

Gde je  $I_C$ -kapacitivna struja,  $\Delta E_A$ -amplituda impulsa,  $R$ -otpor pražnjenja,  $t$ -vreme primene impulsa,  $C$ -kapacitet dvostrukog sloja radne elektrode.

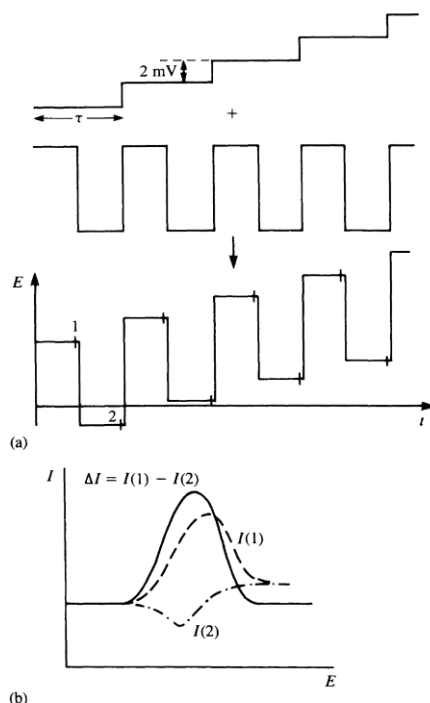


Slika 8. Promena struja savremenom primenom stepena potencijala na radnoj elektrodi,  $I_F$  Faradejska i  $I_C$  kapacitivna struja [29]

### 2.3.1.1.3 Voltometrija sa pravougaonim impulsima (SWV, square-wave voltammetry)

Metoda sa pravougaonim impulsima se uspešno primenjuje u ispitivanju različitih analita na inertnim elektrodama od plemenitih metala, staklastog grafita i na različitim modifikovanim elektrodnim površinama. Za voltometriju sa pravougaonim impulsima postupak merenja je opisan na jednoj živinoj kapi korišćenjem relativno velike amplitude primenjenog impulsa ( $\Delta E_A = 50\text{mV}$ ) i sa brzom promenom potencijala. Kod ove metode, meri se struja na (obično stacionarnoj) radnoj elektrodi dok se menja potencijal između radne i referentne elektrode. Oblik ukupnog potencijala predstavlja superpoziciju pravougaonog talasa sa relativno velikom amplitudom i stepena

potencijala (Slika 9) [29]. Struja se meri dvaput u toku svakog ciklusa, jednom na početku polaznog pulsa i drugi put na kraju pulsa suprotnoga smera, u tačkama 1 i 2. Polazni puls proizvodi katodnu struju, a povratni puls stvara anodnu struju. Razlika tih struja srazmerna je koncentraciji analita u elektrolitu. Najveća prednost SWV voltametrije je velika brzina snimanja što omogućuje i njenu primenu u elektrohemijskoj detekciji kod HPLC [32].



Slika 9. Voltametrija sa pravougaonim impulsima: a) Šema primene potencijala b) Zavisnost struja-potencijal [29]

### 2.3.2 Spektroskopske metode

Sledeće spektroskopske tehnike mogu se koristiti u analizi aktivnih supstanci i farmaceutskih proizvoda, a većina njih se primenjuje i za detekciju i određivanja u hromatografskim analizama:

- Ultravioletna spektroskopija (UV),
- Infracrvena spektroskopija (IR),
- Masena spektrometrija (MS),
- Nuklearna magnetna rezonanca (NMR) [27].

UV spektrofotometrija (UV) na određenoj talasnoj dužini predstavlja metodu sa slabom selektivnošću analize, međutim primenom modernih dioda arej detektora (PDA) moguće je da se simultano dobiju apsorbanca odnosno spektralni podaci u određenom opsegu talasnih dužina što obezbeđuje veću pouzdanost i selektivnost analize.

Infracrvena spektrofotometrija (IR) pruža konkretne informacije o postojećim funkcionalnim grupama, što obezbeđuje selektivnost metode i omogućava kvantifikaciju sa ograničenim mogućnostima na niskim nivoima detekcije.

Masena spektrometrija (MS) je tehnika koja daje odlične strukturne informacije, i u zavisnosti od rezolucije masenog analizatora moguće je razlikovati molekule sa vrlo malim razlikama u molekulskoj masi.

Nuklearno magnetna rezonantna spektroskopija (NMR) daje detaljne informacije o strukturi molekula i izuzetno je korisna metoda za karakterizaciju nepoznatih jedinjenja i nečistoća.

### **2.3.3 Separacione metode**

Najčešće korišćene metode koje se koriste za razdvajanje nečistoća i proizvoda razgradnje u farmaceutskoj analizi su:

- Kapilarna elektroforeza (CE),
- Hiralna hromatografija,
- Gasna hromatografija (GC),
- Tečna hromatografija visokog pritiska (HPLC),
- Natkrična hromatografija (SFC),
- Tankoslojna hromatografija (TLC).

#### **2.3.3.1 Tečna hromatografija (LC)**

Hromatografija je fizička metoda razdvajanja pri kojoj su komponente koje se razdvajaju raspoređene između dve faze, stacionarne faze i mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje se ostvaruje kada komponente u smeši različito intereaguju sa mobilnom i/ili stacionarnom fazom i na taj način imaju drugačija vremena



zadržavanja. Selekcijom odgovarajućih stacionarnih faza i sastava mobilne faze moguće je ostvariti zadovoljavajuću rezoluciju između analita koji se analiziraju. Hromatografsko razdvajanje kod koga se koristi konstantan sastav mobilne faze u toku vremena se naziva izokratsko razdvajanje, a kod koga se sastav mobilne faze menja u toku vremena se naziva gradijentno razdvajanje. Kod visokoeфикаsne tečne hromatografije (HPLC, High pressure liquid chromatography) visoku ефикаsност razdvajanja obezbeđuje primena visokog pritiska (do 400 bar) i korišćenje gusto pakovanih stacionarnih faza sa česticama (3-10 μm) sa velikom specifičnom površinom. Razvoj HPLC metode ima za cilj pronalaženje hromatografskih parametara radi dobijanja zadovoljavajućih uslova razdvajanja odnosno rezolucije  $R_s$ . U analitičkoj terminologiji rezolucija  $R_s$  između pikova je rezultat selektivnosti ili faktora razdvajanja, retencionog vremena pika i performasni kolone i data je jednačinom:

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1) \frac{k}{(1 + k)} \sqrt{N}$$

gde je  $\alpha$  faktor razdvajanja (selektivnost) =  $k_2/k_1$  za  $k_2 > k_1$ ,  $k_1$  i  $k_2$  su faktori kapaciteta supstance 1 i 2, respektivno, a  $N$  je teoretski broj podova.

Osnovni parametri optimizacije faktora razdvajanja i rezolucije u hromatografskoj analizi se ostvaruju:

- odgovarajućom selekcijom stacionarne faze,
- odgovarajućom selekcijom mobilne faze (odabir sastava mobilne faze i pH vrednosti), i
- odabirom temeperature razdvajanja.

Tečnom hromatografijom se mogu kvalitativno i kvantitativno analizirati manje ili više složene smeše hemijskih jedinjenja rastvorenih u rastvaraču koji predstavlja mobilnu fazu. Kvalitativna analiza ili identifikacija se zasniva na poređenju vremena zadržavanja nepoznatog jedinjenja i referentnih materijala. Kvantitativna analiza kod visokoeфикаsne tečne hromatografije se zasniva na poređenju intenziteta odgovora analita (visina ili površina ispod pika) u uzorku koji se analizira sa intenzitetom odgovora analita u poznatoj koncentraciji u standardnom rastvoru pod identičnim eksperimentalnim uslovima [35].

Osnovna podela HPLC metoda razdvajanja se može izvršiti na osnovu polarosti korišćene stacionarne i mobilne faze na reverzno faznu i normalno faznu visokoefikasnu tečnu hromatografiju.

#### **2.3.3.1.1 Reverzno fazna HPLC (RPLC)**

Procenjuje se da se u oko 80-90% slučajeva u HPLC razdvajanjima primenjuje reverzno fazni režim. Razdvajanje u ovom režimu se izvodi primenom nepolaro hemijski modifikovanih stacionarnih faza. Hidrofobna površina ovih pakovanja (stacionarnih faza) se dobija kovalentnim vezivanjem alkilnih liganada kao što su C1, C4, C8, C12 za površinske silanolne grupe stacionarne faze. U ovom režimu male promene u površinskim interakcijama izazivaju značajne promene u hromatografskoj selektivnosti, a sastav mobilne faze ima glavni uticaj na retenciono zadržavanje analita u reverzno-faznoj hromatografiji. Sastav eluenta (mobilne faze), tip organskog rastvarača, pH, koncentracija pufera su parametri čijom varijacijom je moguće ostvariti efikasno razdvajanje analita u HPLC metodama razdvajanja. Vrednost pH mobilne faze utiče na jonizaciju analita i time na njegovu hidrofobnost i retenciono zadržavanje u HPLC. U ovim sistemima polarniji analiti se eluiraju brže od manje polarnih [35].

#### **2.3.3.1.2 Normalno fazna HPLC**

Za razliku od reverzno fazne hromatografije, za normalno-faznu hromatografiju se koriste polarne stacionarne faze, a hromatografsko zadržavanje analita se ostvaruje primenom nepolarnih rastvarača. Stacionarna faza je ili neorganski adsorbent kao što je silicijum-dioksid ili aluminijum-dioksid ili polarno modifikovana stacionarna faza koja sadrži funkcionalne grupe kao što su cijano, diolne ili amino grupe vezane za silicijumsku bazu. Mobilna faza je obično smeša organskih rastvarača. Kako polaritet mobilne faze opada, retenciono vreme zadržavanja analita u normalno faznoj hromatografiji se povećava [35].

### **2.3.3.1.3 Primena tečne hromatografije HPLC u analizi lekova**

Analizom lekova u formulacijama ili biološkim tečnostima dobijaju se podaci u kontroli kvaliteta, farmakokinetici, farmakodinamici, farmakologiji i toksikologiji jednog leka. Različite metode se koriste za razdvajanje i analize lekova. HPLC metode imaju najvažniju i najrasprostranjeniju primenu za analizu lekova u farmaceutskoj industriji. HPLC metode imaju visoku osetljivost i selektivnost i lako su primenjive za analizu uzorka u vodenim ratvorima. Pored toga HPLC može kombinovati različite metode detekcije uključujući ultravioletnu spektrometriju, masenu spektrometriju, fluorescentnu spektroskopiju (FL), hemiluminescentnu spektroskopiju (CL), detekciju referaktivnog indeksa (RID) i elektrohemijsku detekciju (ECD). HPLC analize lekova u formulacijama se uglavnom izvode korišćenjem UV detekcije, dok se EC, MS, FL i CL detekcija zbog izuzetne osetljivosti koriste za analize lekova u biološkim uzorcima u kojima nivo koncentracije može biti u opsegu od  $10^{-6}$ - $10^{-12}$  [36].

### **2.3.3.1.4 Validacija HPLC metoda**

HPLC metode koje se koriste u analizama u farmaceutskoj industriji moraju biti validirane. Validacija se može definisati kao postupak kojim se ispituje određena analitička metoda u cilju dokazivanja njene valjanosti za određenu primenu. Za analitičke metode u farmaceutskoj industriji validacija se izvodi na osnovu preporuka USP (United States Pharmacopeia) i ICH (International conference on Harmonisation) [37, 38].

Hromatografska analiza obuhvata složenu proceduru koja se sastoji od uzorkovanja, pripreme uzorka, instrumentalnog merenja i obrade rezultata. Postupkom validacije se svaki stupanj u analitičkoj proceduri, priprema uzorka i instrumentalno merenje, ispituje i utvrđuje efekat njegove varijacije na validnost analitičke metode.

Analitički parametri koji se ispituju u validacionim postupcima su:

- specifičnost /selektivnost,
- linearnost,
- opseg,

- preciznost,
- tačnost,
- limit kvantifikacije,
- limit detekcije,
- robustnost.

Kombinacijom tih parametara oblikuje se plan validacije za svaku metodu.

### ***Selektivnost***

Selektivnost predstavlja mogućnost razdvajanja određene komponente u odnosu na druge komponente u sistemu. Za kriterijum selektivnosti se postavlja uslov da rezolucija između dva najbliža pika na hromatogramu ne bude manja od 1,5.

### ***Linearnost***

Linearnost metode u datom opsegu predstavlja direktnu proporcionalnost između detektovanog signala i koncentracije supstance u rastvoru. Kriterijum linearnosti u datom opsegu jeste regresioni korelacioni koeficijent ( $r$ ) koji treba da bude  $r > 0,999$ , a odsečak na ordinati ne treba značajno da odstupa od nule. Za ispitivanje linearnosti se koristi najmanje pet standardnih rastvora čija je koncentracija u opsegu 50-150% od očekivane koncentracije supstance u uzorku.

### ***Opseg metode***

Opseg analitičke metode predstavlja interval između gornjeg i donjeg nivoa koncentracije supstance u kome se analiza može izvršiti sa određenom tačnošću, preciznošću i linearnošću.

### ***Tačnost metode***

Ispitivanjem tačnosti analitičke metode se potvrđuje stepen saglasnosti između dobijene vrednosti u analitičkom postupku i stvarne vrednosti. Za određivanje tačnosti se koriste standardni uzorci u najmanje tri različita koncentraciona nivoa supstance u uzorcima sa tri ponavljanja analize svakog koncentracionog nivoa. Koncentracije uzorka treba da se nalaze u opsegu metode, a jedan uzorak treba da ima koncentraciju koja je bliska limitu kvantifikacionog određivanja. Tačnost se izražava kao procenat

prinosa analitičke metode (recovery) za poznatu dodatnu količinu supstance u uzorku. Za tip analize određivanja nečistoća i proizvoda razgradnje koncentracioni nivoi treba da obuhvataju opseg od 50-150%, dok srednja vrednost za „recovery“ treba da bude  $100 \pm 10\%$ .

### ***Preciznost metode***

Preciznost metode predstavlja stepen rasipanja dobijenih rezultata u seriji analitičkih određivanja istog homogenog uzorka. Preciznost metode se izražava preko standardne devijacije ili koeficijenta varijacije. Za ispitivanje preciznosti se koriste najmanje šest ponovljenih analiza. Kao kriterijum za preciznost metode koeficijent varijacije RSD za šest ponovljenja merenja treba imati vrednost manju od 10%.

### ***Limit detekcije***

Limit detekcije predstavlja najnižu koncentraciju ispitivane supstance koja se može detektovati u uzorku. Postoji nekoliko načina određivanja limita detekcije: vizuelno, na osnovu odnosa signala i šuma bazne linije ( $s/n$ ) i na osnovu standardne devijacije signala i nagiba kalibracione prave. Odnos  $s/n$  se određuje merenjem signala supstance u uzorku koja je prisutna u poznatoj koncentraciji i signala u uzorku u kome nije prisutna ispitivana supstanca, pri čemu se određuje najniža koncentracija koju je moguće detektovati. Za limit detekcije se uzima vrednost koncentracije za koju je  $s/n=3$ .

### ***Limit kvantifikacije***

Limit kvantifikacije predstavlja granicu kvantifikativnog određivanja supstance u uzorku i ona predstavlja najmanju količinu supstance u uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti sa dovoljnom preciznošću i tačnošću. Limit kvantifikacije se određuje na analogan način kao i limit detekcije, koristeći  $s/n=10$ .

### ***Robustnost metode***

Robustnost metode predstavlja meru pouzdanosti analitičke metode u toku njene upotrebe i definiše se kao njena sposobnost da ostane nepromenjena pri malim namernim varijacijama analitičkih parametara. Tipični analitički parametri koji se mogu

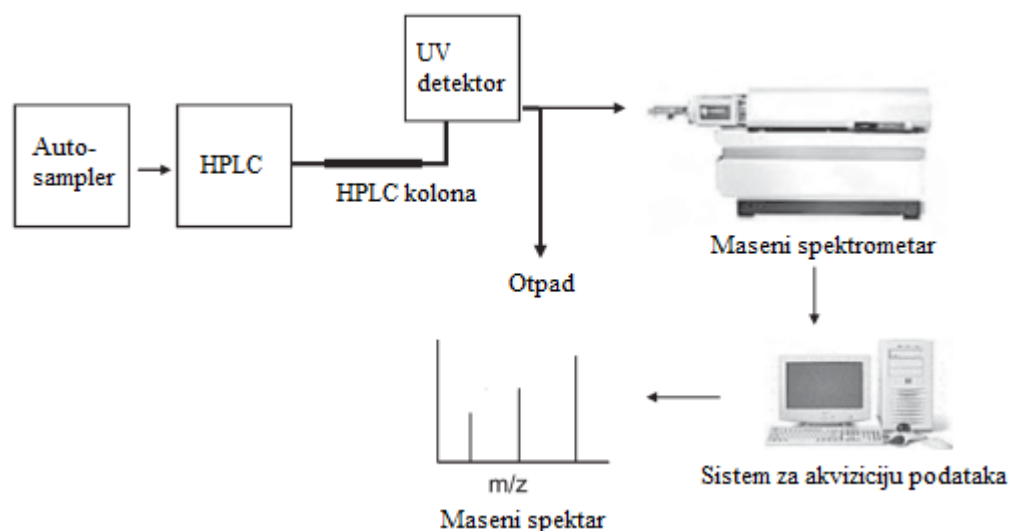
varirati su vreme ekstrakcije, sastav i protok mobilne faze, talasna dužina detekcije, temperatura kolone, itd.

#### **2.3.4 Tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC-MS)**

Zbog svoje brzine, selektivnosti i osetljivosti i kompatibilnosti sa reverzno faznom hromatografijom, LC-MS i tandem tehnike MS-MS postale su neophodne analitičke tehnike u analizi lekova. LC-MS je, takođe, obezbedio veliku podršku u razvoju i validaciji hromatografskih metoda, na primer potvrđivanje čistoće pika. Velika prednost ove tehnike je u tome što daje informaciju o molarnoj masi, a na nekim instrumentima je moguće dobiti i strukturne fragmente i empirijske formule, bez potrebe za izolacijom željene supstance.

Uvođenjem termosprej jonizacije 1980. omogućeno je prvo komercijalno izvođenje dovoljno pouzdanih LC-MS instrumenata. Od 1989. se uvodi i elektrosprej jonizacija (ESI), kao tehnika za jonizaciju molekula velikih molarnih masa. Početkom 1990., eksperimenti sa jonizacijom na atmosferskom pritisku (API) su pokazali dobre rezultate i u kratkom vremenu su se pojavili prvi komercijalni sistemi koji koriste nove tehnike jonizacije ESI i APCI. ESI i APCI su najčešće primenjene tehnike jonizacije za LC-MS u farmaceutskoj analizi. Obe tehnike se izvode na atmosferskom pritisku.

Određivanje niskih koncentracija aktivnih supstanci i biomarkera u biološkim uzorcima pruža mogućnost za ispitivanje efikasnosti i toksičnosti lekova. Prednost HPLC-MS tehnike u odnosu na HPLC-UV, FL i ECD tehnike je u tome da se MS analizom može identifikovati analit u prisustvu ko-eluirajućih nečistoća. Zbog visoke osetljivosti i selektivnosti HPLC-MS metode se rutinski koriste u farmakokinetičkim studijama za kvantifikaciju analita i biomarkera u biološkim uzorcima.



Slika 10. Šematski prikaz LC/MS sistema

Tandem MS (MS/MS), tehnike kod kojih su dva masena analizatora povezana preko kolizione ćelije u kojoj se izvodi fragmentacija jona, predstavljaju još osjetljiviju i selektivniju metodu određivanja. MS/MS analizom je moguće razdvojiti i odrediti komponente koje imaju istu molarnu masu i dobiti dodatne informacije koje povećavaju pouzdanost primenjene metode. Primena HPLC-MS/MS detekcije je dovela do razvoja brzih i osjetljivih metoda za analizu mnogih vrsta lekova [39-41].

### 2.3.5 Primena analitičkih metoda za određivanje donepezil-hidrohlorida

#### 2.3.5.1 Metode elektrohemijskog određivanja donepezil-hidrohlorida

Rao i saradnici su publikovali jednostavnu i osjetljivu voltametrijsku metodu za određivanje donepezil-hidrohlorida na elektrodi od ugljenične paste koja je modifikovana  $\beta$ -ciklodekstrinom (CDMCPE). Ova elektrodaje pokazala povećanu selektivnost u odnosu na elktrodu od ugljenične paste (CPE). Za elektrohemijsko ispitivanje donepezila na CDMCPE i CPE elektrodi je korišćena je ciklična voltametrija (CV) i diferencijalna pulsna voltametrija (DPV). Predložene metode su primenjene za određivanje donepezila u spajkovanim uzorcima urina, uzorcima seruma i farmaceutskim formulacijama [42].

Ozkan i saradnici su ispitivali elektrohemijsko ponašanje donepezila na elektrodi od staklastog grafita koristeći cikličnu, linearnu, diferencijalno pulsnu (DPV) i „square-wave“ (SWV) voltametriju. Razvijena metoda je uspešno primenjena za određivanje donepezila u tabletama i biološkim uzorcima [43].

### **2.3.5.2 Metode spektrofotometrijskog određivanja donepezil-hidrohlorida**

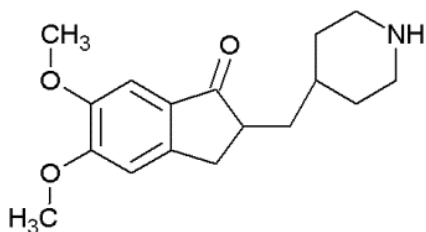
Abbas i saradnici su razvili i validirali „stability indicating“ spektrofotometrijsku metodu za određivanje donepezil-hidrohlorida u prisustvu njegovog oksidativno degradacionog proizvoda. Kvantifikacija donepezila je izvršena korišćenjem tri metode, merenjem apsorbanca na 315 nm, derivativnom spektroskopijom prvog reda na 332,1 nm i drugog reda na 340 nm. Donepezil-hidrohlid je moguće odrediti u prisustvu od čak 70%-90% njegovog oksidativnog degradacionog proizvoda u zavisnosti od primenjene metode. Linearni opseg metode je pokazan za koncentracije 8-56  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Takođe je razvijena i spektrofluorometrijska metoda za određivanje donepezila u prisustvu degradacionog proizvoda koristeći 226 nm kao ekscitacionu i 391 nm kao emisionu talasnu dužinu. Linearni opseg metode je pokazan za koncentracije 0,32-3,20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Predložene metode su korišćene za određivanje donepezila u tabletama i humanoj plazmi [44].

Sangshetti i saradnici su razvili dve jednostavne i osetljive metode za određivanje donepezil-hidrohlorida u formulacijama čvrstih formi. Metoda A i metoda B su UV spektrofotometrijska metoda i kolorimetrijska metoda. Za metodu A i metodu B utvrđena je  $\lambda_{\text{max}}$  na 231 nm i 454 nm. U metodi B kompleks narandžaste boje se dobija reakcijom keto grupe donepezila sa 2,4-dinitrofenil-hidrazinom u razblaženom rastvoru sumporne kiseline. Linearnost metode je pokazana u koncentracionom opsegu 5-40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  za metodu A i 10-60  $\mu\text{g ml}^{-1}$  za metodu B [45].

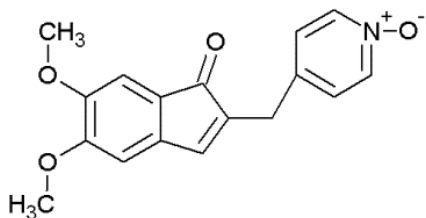


### 2.3.5.3 Primena hromatografskih HPLC metoda za određivanje donepezil-hidroklorida

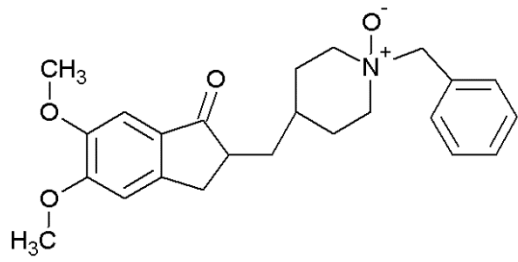
Donepezil, u obliku donepezil-hidroklorida je opisan u monografiji USP [46]. Prema monografiji američke farmakopeje USP za određivanje nečistoća u aktivnoj supstanci se koristi oktadecilsilil C18 kolona (5  $\mu\text{m}$ ) dimenzija 250 x 4.6 mm kao stacionarna faza. Razdvajanje je ostvareno korišćenjem mobilne faze sastava 75% mobilne faze A: 25% mobilne faze B. Mobilnu fazu čini 1 mL L<sup>-1</sup> rastvor fosforne kiseline kome je pH vrednost podešena na  $6,6 \pm 0,1$  korišćenjem trietilamina. Mobilna faza B je acetonitril. Eluiranje se vrši gradijentno do sastava od 40% mobilne faze A: 60% mobilne faze B u trajanju od 10 minuta, zatim izokratski u narednih 30 min. Ukupno deset poznatih nečistoća je razdvojeno. Strukture ovih nečistoća su prikazane na slikama 11-18.



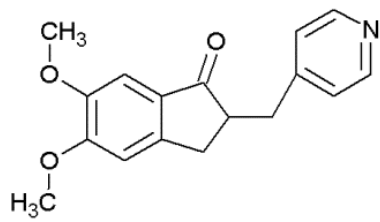
Slika 11. Desbenzil donepezil  
(5,6-Dimetoksi-2-(piperidin-4-ilmetil)indan-1-on)



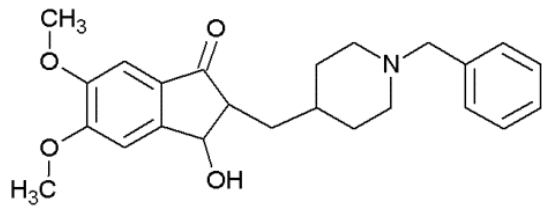
Slika 12. Donepezil alken piridin N-oksid ((*E*)-4-[(5,6-Dimetoksi-1-okso-1*H*-inden-2-il)metil]piridin 1-oksid)



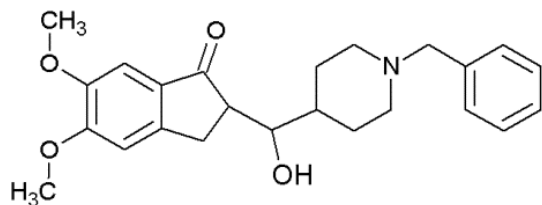
Slika 13. Donepezil-*N*-oksid (1-Benzil-4-[(5,6-dimetoksi-1-okso-2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)metil]piperidin 1-oksid)



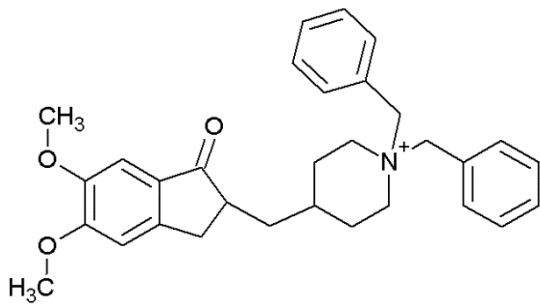
Slika 14. Donepezil piridin analog (DPMI) (5,6-Dimetoksi-2-(piridin-4-ilmetil)indan-1-on)



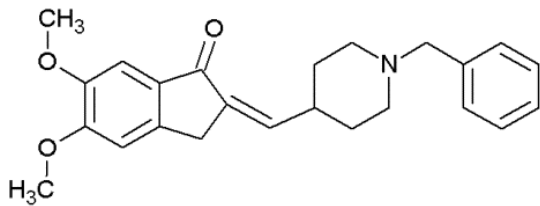
Slika 15. 3-Hidroksi donepezil (2-[(1-Benzilpiperidin-4-il)metil]-3-hidroksi-5,6-dimetoksi-1*H*-indan-on)



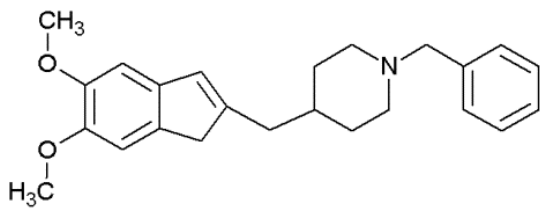
Slika 16. Hidroksi donepezil (2-[(1-Benzilpiperidin-4-il)(hidroksi)metil]-5,6-dimetoksiindan-1-on)



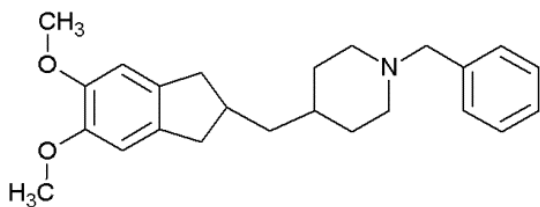
Slika 17. Donepezil kvaternerna so (donepezil benzil) 1,1-Dibenzil-4-[(5,6-dimetoksi-1-oksoindan-2-il)metil]piperidinijum



Slika 18. Donepezil srodna supstanca A ((*E*)-2-[(1-Benzilpiperidin-4-il)metil]-5,6-dimetoksiindan-1-on)



Slika 19. Donepezil inden (dehidrodeoksi donepezil) (1-Benzil-4-[(5,6-dimetoksiindan-2-il)metil]piperidin)



Slika 20. Deoksidonepezil (4-[(2,3-Dihidro-5,6-dimetoksi-1H-inden-2-il)metil]-1-(fenilmetil)piperidin)

### *Studije razgradnje*

Pappa i saradnici su validirali RPLC metodu za određivanje donepezil-hidrohlorida u tabletama. Za razdvajanje je korišćena mobilna faza sastava 50% metanola: 50% 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,5% trietilamina (pH 2,7), a detekcija eluenta je vršena na 268 nm. Autori su posmatrali degradaciju donepezil-hidrohlorida u 1 M HCl, 1 M NaOH i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zagrevanjem uz refluks. Nastale degradacione proizvode nisu strukturno određivali [47].

Yamreudeewong i sradnici su dali metodu za određivanje stabilnosti donepezila u *ex tempore* pripremljenom sirupu, koji se sastoji iz smeše sorbitola i vode, nakon 4 nedelja čuvanja na sobnoj temperaturi (22–26°C) i u frižideru (4–8°C). Za praćenje stabilnosti primenjena je metoda koju su ranije publikovali Pappa i saradnici. U toku praćena stabilnosti utvrđeno je da je donepezil stabilan i da je promena u koncentraciji donepezila manja od 10% u odnosu na početnu koncentraciju [48].

Kafkala i saradnici su validirali RPLC metodu za određivanje donepezil-hidrohlorida i njegovih nečistoća u oralnim farmaceutskim proizvodima. Razdvajanje je ostvareno korišćenjem mobilne faze sastava 38% metanola: 62% 0,005 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,7). Eluiranje je vršeno izokratski prvih 15 minuta, a zatim gradijentno do sastava od 62% metanola: 38% 0,005 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,7) u trajanju od 12 minuta. Ukupno četiri nečistoća je razdvojeno [49].

Chothe i saradnici su ispitivali stabilnost donepezil-hidrohlorida koristeći HPLC sistem koji se sastojao od analitičke C<sub>18</sub> kolone, mobilne faze sastava metanol:acetatni pufer (pH 4,25): trietilamin u odnosu 50:50:0,5. Protok mobilne faze je bio 1 ml min<sup>-1</sup>. Stabilnost je ispitivana u rastvorima 1 M hlorovodonične kiseline, 2 M natrijum-hidroksida, 6% vodonik-peroksida, u neutralnim pH uslovima, fotolitički i na povišenim temperaturama. Izrazita razgradanja je dobijena u alkalnoj hidrolizi u poređenju sa oksidacijom i neutralnim uslovima. Sprovedena je studija kinetike razgradnje donepezila u rastvorima 2 M natrijum hidroksida, 6% vodonik-peroksida i u neutralnim pH uslovima na 40°C, 80°C i uz refluks [50].

Mostafa i saradnici su razvili i validirali HPLC metodu za razdvajanje i simultano određivanje S-(+)- and R(-)-donepezil-hidrohlorida u tabletama. Razdvajanje enantiomera je ostvareno na Chiralcel-OJ-H analitičkoj koloni koristeći mobilnu fazu etanol:n-heksan:trietilamin (20:80:0,3). Talasna dužina na kojoj je vršena detekcija je

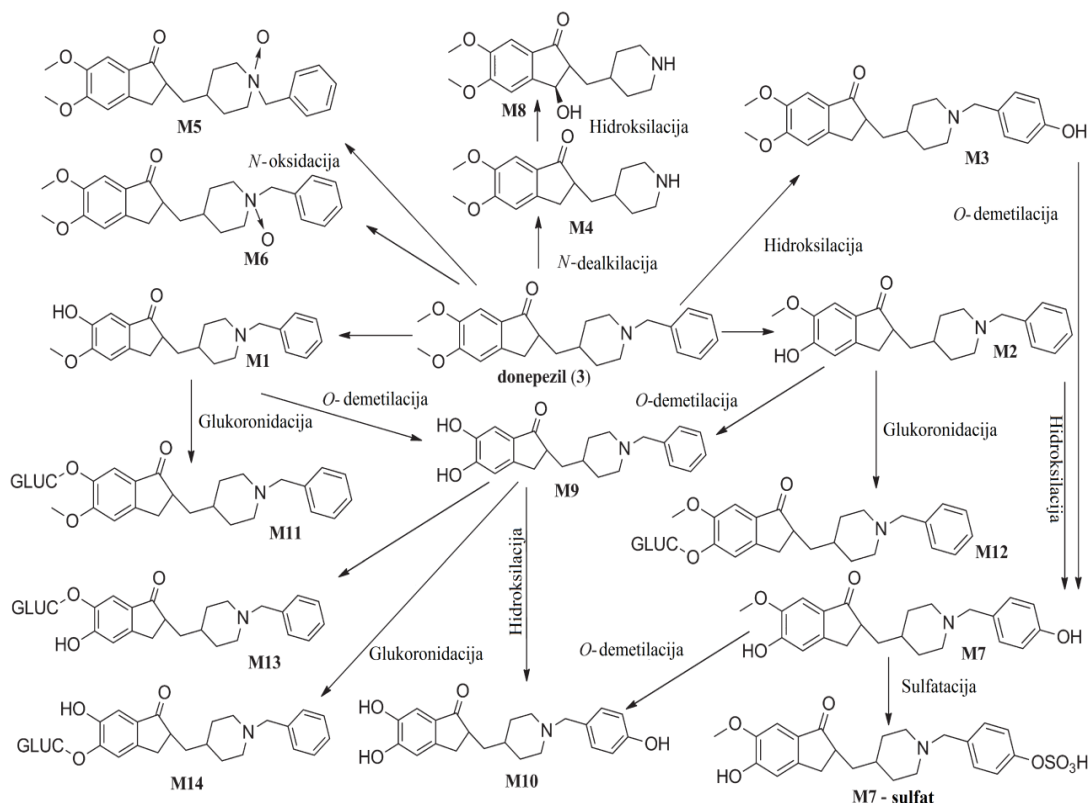
268 nm. Arotinolol je korišćen kao interni standard. Enantiomeri donepezila, kao i donepezil tablete su podvrgnuti termičkoj, fotolitičkoj, hidrolitičkoj i oksidativnoj razgradnji i ovi uzorci su analizirani predloženom metodom [51].

Srinivasan i saradnici su razvili jednostavnu reverzno-faznu RP-UPLC metodu za analizu donepezil-hidrohlorida u prisustvu poznatih nečistoća i proizvoda razgradnje koji su dobijeni u studijama forsirane razgradnje. Donepezil-hidrohlorid je bio podvrgnut uslovima kisele hidrolize, oksidativne razgradnje, alkalne hidrolize, fotolizi i termičkoj razgradnji, a značajna razgradnja je dobijena pri uslovima oksidativne razgradnje i alkalne hidrolize. Zadovoljavajuće hromatografsko razdvajanje donepezila, nečistoća i proizvoda razgradnje je ostvareno korišćenjem kolone Waters Acquity C18, 50 mm x 2,1mm, 1,7  $\mu\text{m}$  i gradijentnog režima eluiranja koristeći pufer trifluorosirćetne kiseline, acetonitril i metanol kao mobilne faze sa UV detekcijom na talasnoj dužini od 286nm [52].

Ahmed i saradnici su razvili i validirali RP-HPLC metodu za određivanje donepezila. U svom radu istraživali su stabilnost lekovite supstance pri različitim uslovima forsirane razgradnje koji su preporučeni od strane ICH. Hromatografsko razdvajanje donepezila i njegovih proizvoda razgradnje je ostvareno korišćenjem C18 kolone koristeći mobilnu fazu koja se sastojala od pufera kalijum dihidrogen fosfata i acetonitrila u odnosu 70 : 30. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 230 nm. U ovoj studiji je pokazano da donepezil podleže razgradnji pri primenjenim uslovima kisele i alkalne hidrolize i oksidacije, dok je donepezil stabilan pri primenjenim uslovima termičke razgradnje i fotolitičke razgradnje [53].

### ***Studije metabolizma donepezila***

Matsui i saradnici su ispitivali apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju (ADME)  $^{14}\text{C}$  obeleženog donepezila u odraslim jedinkama pacova nakon jedno dozne oralne administracije donepezila. Metabolički profil je urađen u plazmi, mozgu, jetri i bubrezima nakon administracije. Za potrebe identifikacije, metabolite su izolovali primenom tanko slojne hromatografije TLC (n-butanol:sirćetna kiselina:voda 4:1:1) i nakon toga dodatno prečišćeni primenom RPLC (52% ACN:48% 5mM SDS (pH 2,5)). Strukturna identifikacija je urađena primenom MS i  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopije. Na slici 12 su prikazani predloženi putevi metabolizma donepezila [54].



Slika 21. Predloženi putevi metabolizma donepezil-hidrohlorida [54]

### Bioanalitičke studije

Xie i saradnici su razvili metodu za određivanje donepezila u humanoj plazmi primenom LC-MS/MS tehnike. Pripremu uzorka su izveli tretiranjem plazme alkalnim reagensom (pH=14) nakon čega je vršena ekstrakcija donepezila etilacetatom. Hromatografska analiza je urađena na C<sub>18</sub> reverzno faznoj koloni. Detekcija supstance je vršena snimanjem MS/MS izabrane reakcije (SRM-single reaction monitoring), koristeći prelaz  $m/z$  380 → 91. Donji nivo limita kvantifikacije (LLOQ) za ovu metodu je 0,1 ng/mL. Metoda je primenjena za određivanje donepezila u farmakokinetičkoj studiji [55].

Radwan i saradnici su razvili stereoselektivnu HPLC metodu za simultano određivanje enantiomera donepezila u tabletama i plazmi. Hiralno razdvajanje je postignuto korišćenjem Chiracel OD kolone koristeći UV detekciju na 268 nm. Sastav mobilne faze je 87% n-heksan:12,9% izopropanol:0,1% trietilamin. Za pripremu uzorka korišćena je tehnika precipitacije proteina organskim rastvaračem. Limit detekcije za

ovu metodu iznosi 20 ng ml<sup>-1</sup>. Analitička metoda je korišćena za procenu farmakokinetičkih parametara enantiomera donepezila 12 h nakon administracije u pacovima [56].

Yasui-Furukori i saradnici su razvili jednostavnu metodu za određivanje donepezila u humanoj plazmi, koristeći UV detekciju i cisaprid kao interni standard (IS). Iako je limit detekcije ove metode relativno viši (3 ng ml<sup>-1</sup>), dovoljan je za određivanja terapijskih koncentracija donepezila u plazmi [57].

Patel i saradnici su razvili metodu za simultanu analizu donepezila i njegovog aktivnog metabolita 6-O-desmetil-donepezila (metabolit M1, 6-ODD) u humanoj plazmi. Uzorci su pripremani korišćenjem SPE kertridža za čvrsto-tečnu ekstrakciju. Optimalno hromatografsko razdvajanje u pogledu rezolucije, brzine, efikasnosti i oblika pika ostvareno je korišćenjem Novapak C<sub>18</sub> kolone i mobilne faze sastava 20% metanola: 17% acetonitrila: 63% 20 mM amonijum-acetatnog pufera (pH 3,43, 0,2% mravlje kiseline). Za detekciju je korišćen maseni detektor MS u SRM režimu. Limit kvantifikacije ove metode je 0,1 ng ml<sup>-1</sup> i 0,02 ng ml<sup>-1</sup> za donepezil i 6-ODD [58].

Haginaka i saradnici su razvili dve HPLC metode za određivanje enantiomera donepezila u plazmi pacova. Prva metoda je upotrebljena za hiralno razdvajanje enantiomera donepezila na hiralnoj koloni sa ovomukoid-modifikovanom stacionarnom fazom. Za detekciju enantiomera korišćen je fluorescentni detektor sa ekscitacionom talasnom dužinom na 318 nm i emisijom na 390 nm. Fluorescentnom detekcijom je ostvarena oko pet puta veća osetljivost u odnosu na UV detekciju na 271 nm. Metoda je uspešno primenjena za praćenje racemizacije enantiomera u puferском rastvoru i uzorcima plazme. Druga metoda je primenjena za razdvajanje komponenti plazme od donepezila koristeći ahiralnu kolonu. Detekcioni limit ove metode određivanja enantiomera je 1 ng ml<sup>-1</sup> [59].

Abonassif i saradnici su razvili osetljivu, izokratsku HPLC metodu sa fluorescentnom detekcijom za određivanje donepezil-hidrohlorida u tabletama i humanoj plazmi. Pindolol je korišćen kao interni standard. Hromatografsko razdvajanje je ostvareno na C<sub>18</sub> analitičkoj koloni, na sobnoj temperaturi koristeći mobilnu fazu koja se sastoji iz metanola, fosfatnog pufera (0,02 mol L<sup>-1</sup>) i trietilamina (pH 3,5) u odnosu 55:45:0,5 i protokom 0,9 ml min<sup>-1</sup>. Analit i interni standard su ekstrahovani iz plazme

putem tečno-tečne ekstrakcije. Linearnost metode je pokazna u opsegu 5-2000 ng ml<sup>-1</sup>, a detekcioni limit je iznosio 1,5 ng ml<sup>-1</sup> [60].

### *Analize u farmaceutskim proizvodima*

Barot i saradnici su razvili i validirali HPLC metodu za određivanje donepezila u tabletama. Hromatografsko razdvajanje je ostvareno na analitičkoj koloni Inertsil C<sub>8</sub>, 25 cm x 4,6 mm, 5 μm koristeći izokratski režim eluiranja sa protokom 1,0 ml min<sup>-1</sup> i mobilnom fazom sastava pufer:metanol:trietilamin u odnosu 550:450:5 koja je podešena na pH 2,50 ortofosfornom kiselinom. Kvantifikacija donepezila je urađena na 271 nm koristeći PDA detektor [61].

Kumari i saradnici su razvili RP-HPLC za određivanje donepezila u tabletama. Hromatografsko razdvajanje je ostvareno na analitičkoj koloni phenyl RP 250 x 4,6 mm, 5 μm koristeći smešu metanola, 0,02 M fosfatnog pufera (pH 7,5) i trietilamina u odnosu 60:40:0,5 kao mobilnu fazu u izokratskom režimu eluiranja. Ostali hromatografski parametri su: protok 1 ml min<sup>-1</sup>, temperatura kolone 40°C i UV detekcija na 268 nm. Retenciono vreme pika donepezila je oko 7 min. Predložena metoda se može koristiti za kvantifikaciju donepezil-hidrohlorida u linearnom opsegu koncentracija 50-150 μg ml<sup>-1</sup> u rutinskim analizama [62].

## **2.4 Stabilnost farmaceutskih preparata**

Stabilnost se definiše kao sposobnost da dozirni oblik tokom perioda čuvanja i upotrebe zadrži ista fizička i hemijska svojstva koja je imao na početku u vreme izrade. Stabilnost preparata predstavlja njegovu otpornost prema hemijskim, fizičkim i mikrobiološkim uticajima koji bi mogli da promene njegova početna fizička i hemijska svojstva, i to u toku transporta, čuvanja i upotrebe. Kriterijum stabilnosti farmaceutskog preparata predstavlja procenu uticaja različitih faktora okoline na kvalitet lekovitog preparata, a samim tim i na pogodnost njegove upotrebe u terapiji. Cilj ispitivanja stabilnosti lekovitih preparata je da se odredi rok upotrebe leka i odrede uslovi njegovog čuvanja u kome će lek ostati stabilan i neće izgubiti više od 5% dejstva aktivnog principa. Iako se određivanje stabilnosti pre svega odnosi na hemijsku stabilnost,



odnosno na sadržaj aktivne supstance i nečistoća, ispitivanja stabilnosti uključuju i fizičku, kao i mikrobiološku stabilnost.

Stabilnost leka se izražava kroz rok upotrebe leka, odnosno kao vreme za koje će kvalitet leka ostati nepromenjen u propisanim granicama i biti pogodan za upotrebu pod određenim uslovima čuvanja. Da bi se lek smatrao stabilnim, potrebno je da obim promene aktivne supstance bude manji od 5% i da nije došlo do stvaranja nečistoća ili toksičnih proizvoda iznad propisanih granica. U toku roka upotrebe lek je izložen uticajima faktora okoline, kao što su vlaga, temperatura, svetlost, kiseonik, mikroorganizmi itd. [68]

#### **2.4.1 Faktori koji utiču na stabilnost farmaceutskih proizvoda**

Na stabilnost lekovite supstance utiče broj, vrsta i brzina promena koje se odigravaju u leku pod uticajem spoljašnjih faktora okoline. Osnovno razumevanje fizičkih i hemijskih mehanizama i promena je neophodno u svim fazama razvoja farmaceutskog preparata radi uspešne formulacije leka. U fazi preformulacije, neophodno je dobro poznavanje hemijskih struktura polaznih supstanci i potrebno je identifikovati prisustvo funkcionalnih grupa koje su podložne reakcijama razgradnje. Potrebno je analizirati moguće reakcije razgradnje kao i to da li proizvodi dobijeni razgradnjom mogu imati toksično dejstvo što može imati negativne posledice po zdravlje pacijenata. Neophodno je utvrditi fizičko stanje leka i analizirati promene koje mogu nastati u fizičkom stanju lekovite supstance pošto fizička svojstva leka mogu da utiču na efikasnost i potencijalno na bezbednost lekovite supstance.

Najvažniji faktori koji utiču na hemijsku stabilnost lekovite supstance u preparatu su: vlaga, svetlost, temperatura, pH, priroda rastvarača, prisustvo kiseonika, prisustvo peroksida i prisustvo jona teških metala. Do razgradnje leka dolazi putem različitih hemijskih reakcija, od kojih su najčešće oksidacija, hidroliza i fotorazgradnja [69].

## 2.4.2 Studije stabilnosti

Za procenu stabilnosti lekovite supstance neophodno je izvršiti serije ispitivanja određenih fizičko-hemijskih parametara u toku definisanog vremenskog perioda. Ova ispitivanja se vrše u cilju definisanja roka upotrebe leka pod specifičnim uslovima pakovanja i čuvanja i predstavljaju studije stabilnosti farmaceutskih proizvoda. Postoje više različitih studija stabilnosti koje se koriste za procenu stabilnosti lekovite supstance ili farmaceutskog proizvoda: studije u roku trajanja (dugoročna ispitivanja), intermedijarne studije, studije ubranog starenja i studije stres ispitivanja [70].

Ispitivanje u roku trajanja se izvodi ispitivanjem farmaceutskih proizvoda koji se čuvaju pod normalnim uslovima čuvanja, na temperaturi od  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  i pri relativnoj vlažnosti vazduha od  $60\% \text{ RH} \pm 5\%$ . Uzorci se ispituju određenom frekvencom ispitivanja u roku trajanja.

Za dobijanje podataka o stabilnosti lekovite supstance i gotovog proizvoda i predviđanje roka trajanja koriste se i studije ubranog starenja. Studije ubranog starenja se izvode u trajanju od šest meseci sa određenom frekvencom ispitivanja na temperaturi od  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  i pri relativnoj vlažnosti vazduha od  $75\% \text{ RH} \pm 5\%$ . Prednost ove studije stabilnosti je u tome što se u kratkom vremenskom periodu dobijaju podaci o stabilnosti, pošto je u ovoj studiji uticaj faktora vremena, zamenjen sa faktorom povišene temperature.

Stabilnost lekovite supstance i gotovog proizvoda se prati i u uslovima intermedijarnog starenja u trajanju od godinu dana sa određenom frekvencom ispitivanja na temperaturi od  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  i pri relativnoj vlažnosti vazduha od  $65\% \text{ RH} \pm 5\%$ . Intermedijerno ispitivanje se sprovodi ako je došlo do neke značajne promene u toku ubranog ispitivanja.

„Stres“ ispitivanja hemijske i fizičke stabilnosti lekovite supstance i gotovog proizvoda, podrazumevaju primenu određenih stresnih uslova ispitivanja u toku perioda vremena i određivanja efekta primenjenih uslova na fizička i hemijska svojstva lekovite supstance i gotovog proizvoda. Ova ispitivanja uključuju uticaj temperature (npr.  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  - temperature veće od onih koje se koriste za ubrano testiranje), vlage (npr.  $75\% \text{ RH}$  ili više), a gde je moguće i oksidaciju i fotolizu lekovite supstance i gotovog proizvoda. Takođe ispitivanjem bi trebalo i da se proceni podložnost lekovite supstance

hidrolizi u širokom opsegu pH vrednosti, kada se nalazi u rastvoru ili suspenziji. Eksperimentalni plan uslova kojima se podvrgava lekovita supstanca ili gotov proizvod, broj i frekvencija testiranja se definišu protokolom za ispitivanje stabilnosti, a način stres ispitivanja zavisi od tipa lekovite supstance i gotovog proizvoda. Rezultati „stres“ ispitivanja imaju za cilj da pomognu u identifikaciji potencijalnih proizvoda razgradnje i mogućih puteva razgradnje lekovite supstance.

### **2.4.3 Studije forsirane razgradnje**

Prema ICH smernicama za ispitivanje nečistoća u novim farmaceutskim proizvodima, proizvod razgradnje se definiše kao jedinjenje koje je nastalo hemijskom promenom aktivne supstance u toku vremena ili pod uticajem svetlosti, temperature, pH, vode ili reakcije sa pomoćnom supstancom ili ambalažom. ICH smernice takođe ističu i neophodnost studija forsirane razgradnje koje treba da čine sastavni deo informacija koje se predaju regulatornim agencijama prilikom registracije novog leka [39, 40].

Studije forsirane razgradnje se izvode radi dobijanja podataka o stabilnosti aktivne supstance pod različitim stres uslovima tretiranja. Ove studije takođe daju i informacije koje omogućavaju identifikaciju potencijalnih degradacionih proizvoda, kao i informacije o mehanizmu razgradnje aktivne supstance. Dizajn ovih testova razgradnje uglavnom zavisi od prirode aktivne supstance i pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav finalnog farmaceutskog proizvoda.

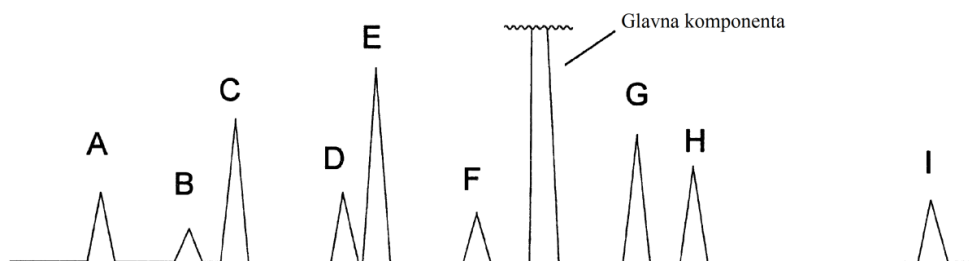
Izvođenje studija forsirane razgradnje imaju za cilj sledeće:

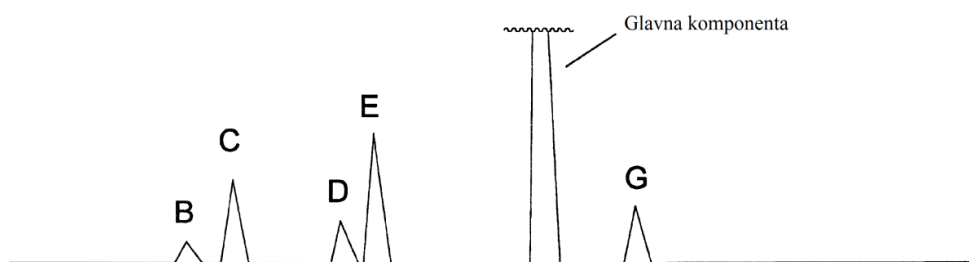
1. Utvrđivanje puteva razgradnje kod lekovitih supstanci i gotovih proizvoda,
2. Identifikacija proizvoda razgradnje koji potiču od lekovite supstance i onih koji ne potiču od lekovite supstance u formulaciji,
3. Određivanje strukture proizvoda razgradnje,
4. Određivanje stabilnosti lekovite supstance u formulaciji,
5. Utvrđivanje mehanizma razgradnje hidroliza, oksidacija, termoliza, fotoliza lekovite supstance,
6. Razvoj „stability-indicating“ metode,
7. Razumevanje hemijskih svojstva molekula lekovite supstance,

8. Proizvođenje profila razgradnje koji je sličan profilu razgradnje koji će biti dobijen u toku formalnih studija stabilnosti po ICH uslovima,
9. Rešavanje problema stabilnosti.

U studijama forsirane razgradnje ispituju se uticaji temperature (u opsegu od 20°C do 60°C ili više), vlažnosti (60%RH, 75%RH i 100%RH), oksidacije, hidrolize (u širem opsegu pH) i svetlosti na lekovitu supstancu ili gotov proizvod. Informacije o nečistoćama i mehanizmima razgradnje lekovite supstance dobijene u ovim eksperimentima pružaju osnov za razvoj analitičkih metoda koje se koriste za kontrolu kvaliteta i praćenje stabilnosti lekovite supstance i finalnog farmaceutskog proizvoda. Treba imati na umu da su podaci o stabilnosti i razgradnji lekovite supstance koji se dobiju u studijama forsirane razgradnje prediktivne prirode. Proizvodi razgradnje koji nastanu pri ovim uslovima razgradnje mogu, ali i ne moraju imati relevantni značaj na degradacionu hemiju lekovite supstance ili gotovog proizvoda pri uslovima čuvanja u roku trajanja proizvoda [71].

Na slici 13 je prikazan ilustrovani hromatogram koji prikazuje sve „potencijalne” razgradne proizvode-nečistoće dobijene u studijama forsirane razgradnje. „Stvarni” ili „značajni” proizvodi razgradnje su nečistoće koje se pojavljuju u toku roka trajanja ili transporta proizvoda i predstavljaju nečistoće čiji nivo treba specificirati i kontrolisati [25, 71]. Cilj izvođenja studija forsirane razgradnje je dobijanje svih „značajnih” nečistoća koje se mogu javiti u roku trajanja proizvoda čine podskup potencijalnih degradacionih proizvoda koji su dobijeni u eksperimentima forsirane razgradnje.





Slika 22. Ilustrovani hromatogram uzorka forsirane degradacije i uzorka sa ubrzanog starenja. Degradacioni proizvodi A-I su proizvodi degradacije dobijeni u studiji forsirane razgradnje (potencijalni degradacioni proizvodi). Degradacioni proizvodi B, C, D, E i G su „stvarni“ degradacioni proizvodi nastali u toku studija stabilnosti [71].

#### 2.4.3.1 Studije forsirane razgradnje gotovih farmaceutskih proizvoda

Svi proizvodi razgradnje aktivne supstance u gotovom proizvodu se ne mogu predvideti iz studija forsirane razgradnje aktivne supstance u čvrstom stanju i rastvoru. U sastav gotovih proizvoda ulaze mnoge neaktivne pomoćne supstance (kao na primer: mikrokristalna celuloza, laktoza, saharoza, skrob, dibazni kalcijum fosfat i dr.) koje takođe mogu da reaguju sa aktivnom supstancom ili katalizuju reakcije razgradnje. Nečistoće u pomoćnim supstancama takođe mogu dovesti do razgradnje aktivne supstance u gotovom proizvodu koju nije moguće dobiti u studijama forsirane razgradnje same aktivne supstance. Moguće reakcije uključuju i reakcije transfera energije sa pomoćnih supstanci ili nečistoća na aktivnu supstancu pod uticajem svetlosti uslovljavajući foto razgradnju. Ovim studijama se utvrđuje fizička i hemijska kompatibilnost aktivne supstance sa pomoćnim supstancama. Ova ispitivanja se uglavnom sprovode pod uticajem temperature, svetlosti, oksidacije i vlažnosti vazduha, iako ICH smernice ne daju konkretne uslove pod kojima treba izvoditi ova ispitivanja [72-79].

Tabela 2. Osnovni protokol za studije forsirane razgradnje aktivne supstance i gotovog proizvoda [72].

Eksperimentalni uslovi	Aktivna supstanca		Gotov proizvod	
	Čvrsto stanje	Rastvor	Čvrste forme (tablete, kapsule..)	Rastvori (IV, Oralne Suspenzije)
Kiselina/Baza		✓		✓
Oksidacija	x	✓	x	✓
Fotostabilnost	✓	x	✓	✓
Termički	✓		✓	✓
Termički/Vlaga	✓		✓	

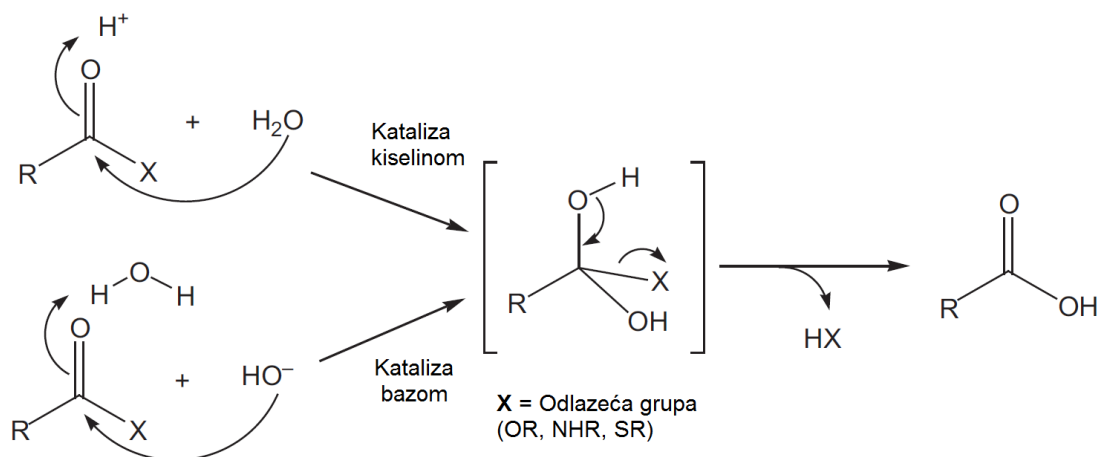
✓ = preporučeni uslovi razgradnje; x-opciona uslovi razgradnje

## 2.4.4 Hemija razgradnje farmaceutskih proizvoda

### 2.4.4.1 Hidrolitička razgradnja

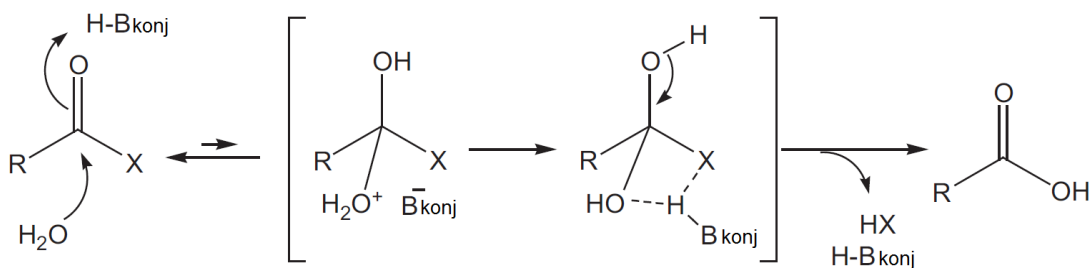
Hidroliza je hemijska reakcija pri kojoj dolazi do raskidanja kovalentne veze u reakciji sa molekulom vode. Postoji veliki broj funkcionalnih grupa koje podležu reakciji hidrolize. Ove funkcionalne grupe su: estarska, laktonska, amidna, laktamska, karbamatna, fosfatna, sulfamidna, iminska, etarska itd. Hidroliza karbonilnih jedinjenja (estara, laktona, amida, laktama i karbamata) predstavlja najčešći slučaj hidrolitičke razgradnje leka [80-82]. Prema mehanizmu reakcije hidrolize mogu biti specifično kiselo-bazno katalizovane i opšte kiselo-bazno katalizovane reakcije.

Mehanizam specifične kiselo-bazne katalize je predstavljen na slici 23.

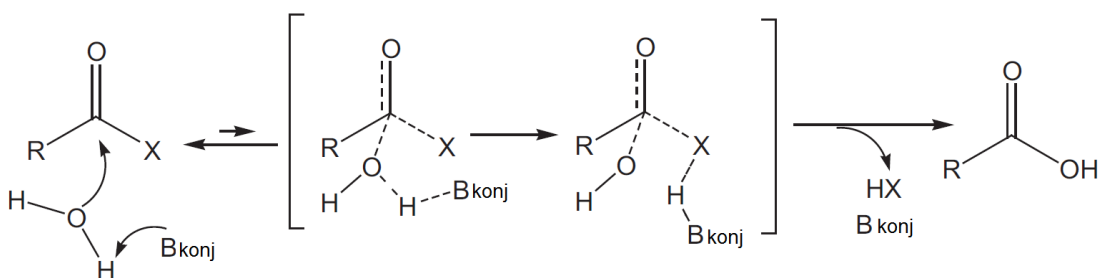


Slika 23. Mehanizam specifične kiselo-bazne katalize [80]

Ovaj mehanizam hidrolize je zastupljen u kiselim sredinama u pH opsegu 1-3, dok je na višim pH vrednostima zastupljen drugi mehanizam ili opšta kiselo-bazna kataliza kod koje dolazi do reakcije supstrata sa nukleofilnim reagensom (sl. 24 i sl.25). Kod hidrolize u neutralnoj sredini gde nisu prisutni molekuli kiseline ili baze, molekul vode se ponaša kao konjugovana baza i katalizuje hidrolizu-opšta bazna kataliza.

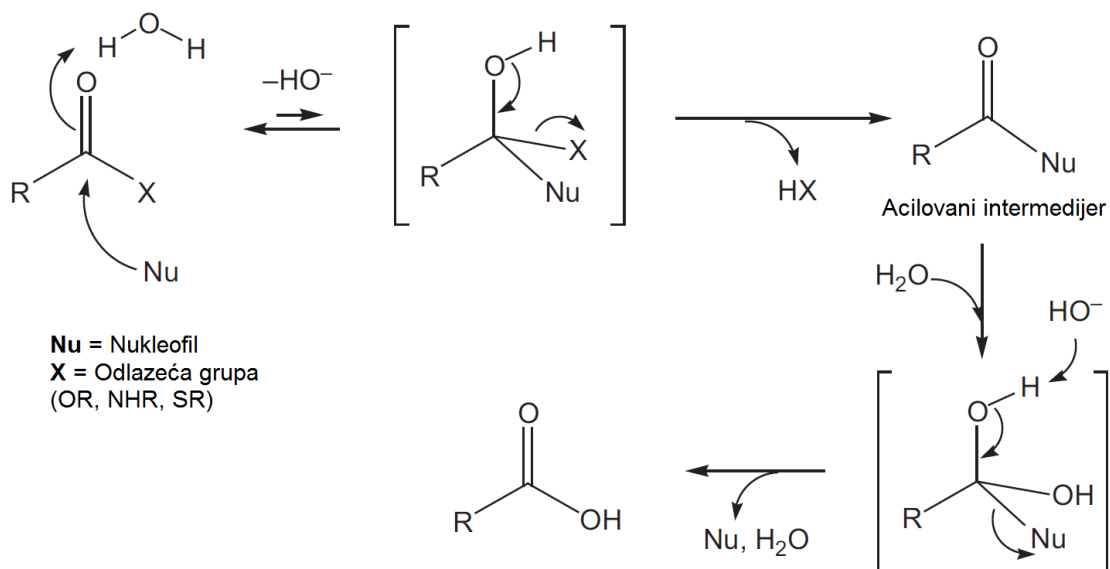


Slika 24. Mehanizam opšte kisele katalize; Bkonj je konjugovana baza kiseline H-Bkonj.; X= odlazeća grupa (OR, NHR, SR) [80]



Slika 25. Mehanizam opšte bazne katalize; Bkonj je baza. X= odlazeća grupa (OR, NHR, SR) [80]

U slučajevima kada su nukleofilne vrste prisutne u formulaciji proizvoda, može doći do hidrolize u reakciji sa nukleofilom, pod uslovom da je nastali intermedijarni proizvod, acilovani nukleofil, podložan hidrolizi. Mehanizam hidrolize napadom nukleofilnog reagensa je prikazana na slici 26.



Slika 26. Mehanizam hidrolize u reakciji sa nukleofilnim reagensom [80]

Brzina reakcije hidrolize zavisi od različitih faktora i to: temperature, pH, sternog faktora, elektronskih svojstva hidrolizujuće grupe i prirode odlazeće grupe.

#### 2.4.4.2 Oksidativna razgradnja

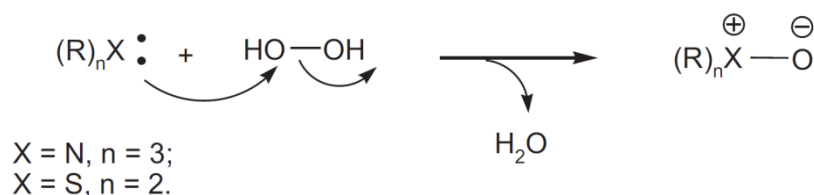
Oksidativna razgradnja je najčešći mehanizam razgradnje jednog leka i njen mehanizam može biti veoma složene prirode [71, 80, 83, 84]. Pod normalnim uslovima reakcija između molekuskog kiseonika i organskog molekula je vrlo spora reakcija, iako je termodinamički moguća. Spora brzina ove reakcije je posledica elektronske konfiguracije molekuskog kiseonika. Osnovno stanje molekuskog kiseonika ima dva elektrona nesporenog spina u antivezujućim orbitalima i nalazi se u stanju tripleta. Većina organskih supstanci je u osnovnom stanju u stanju singleta, u kome su svi spinovi upareni. Direktno reakcije između singlet i triplet molekula su u protivnosti zakonu o održanju spinskog ugaonog momenta i kao takve nisu moguće.



Da bi došlo do hemijske reakcije između organskog molekula i kiseonika, neophodno je da jedan od molekula bude pobuđen hemijskim ili fotohemijskim putem. Postoje tri različita mehanizma oksidacije organskih supstanci:

1. Nukleofilno/elektrofilni proces,
2. Reakcije prenosa elektrona, i
3. Mehanizam slobodnih radikala (autooksidacija).

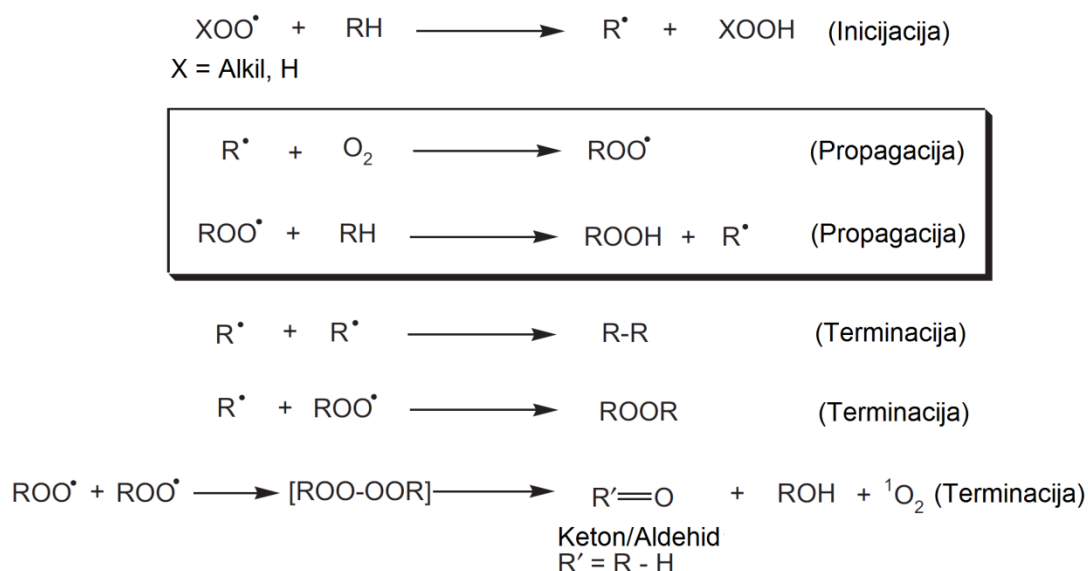
Nukleofilno/elektrofilni procesi se odigravaju između peroksida i organskog molekula. Peroksidni anjon koji se formira u baznoj sredini će se ponašati kao nukleofilni reagens u reakciji sa organskim molekulom, dok će u neutralnoj sredini nejoniizovani molekul peroksida ponašati kao elektrofilni reagens u reakciji. Ove reakcije imaju tipično Arenijusovo ponašanje, međutim pri višim temperaturama može doći i do pojave reakcija koje se odigravaju preko slobodno radikalskog mehanizma. Najvažniji put oksidativne razgradnje kod farmaceutskih supstanci koji se odigrava po ovom mehanizmu je oksidacija amina, sulfida i sličnih funkcionalnih grupa koje imaju slobodne nukleofilne elektronske parove. Najvažniji stupanj reakcije u oksidaciji je nukleofilni napad po  $S_N2$  mehanizmu na N i S funkcionalne grupe oksidacionog supstrata (Slika 27). Brzina ove  $S_N2$  reakcije zavisi od elektronskih i steričkih faktora oksidacionog supstrata.



Slika 27.  $S_N2$  mehanizam reakcije oksidacije sa vodonik-peroksidom [80]

U procesu prenosa elektrona dolazi do prenosa elektrona sa donora, koji ima slabiji afinitet prema elektronima, na oksidujuće vrste koji može biti katalizovan prisustvom prelaznih metala.

U procesu autooksidacije dolazi do inicijalizacije slobodnih radikala, koji zatim u reakciji propagacije sa kiseonikom i organskim molekulom daju različite oksidacione proizvode. Mehanizam ovih reakcije je veoma složen. Proces autooksidacije se odigrava kroz tri faze: inicijalizacija, propagacija i terminacija (Slika 28).



Slika 28. Slobodno radikalski mehanizam oksidacije vodonik-peroksidom [80]

U procesu inicijalizacije dolazi do formiranja slobodno-radikalskih parova, homolitičkom razgradnjom veze uz pomoć temperature, svetlosti ili hemijskim putem. U fazi propagacije postoje dva stupnja. Prvi stupanj je reakcija između slobodnog radikala organskog molekula i kiseonika koji je brzi stupanj reakcije. U drugom stupnju u fazi propagacije nastaje hidroksi peroksid i regeneriše se slobodni radikal organskog molekula i ovaj stupanj predstavlja spori stupanj reakcije koji određuje brzinu ukupne reakcije propagacije. Na brzinu reakcije autooksidacije ne utiče koncentracija kiseonika [71, 80].

#### 2.4.4.3 Termička razgradnja

Termička razgradnja je razgradnja do koje dolazi pod uticajem povišene temperature koja prouzrokuje raskidanje kovalentnih veza u molekulu. Ovaj vid razgradnje predstavljaju reakcije razgradnje koje su potpomognute toplotom naročito u čvrstom stanju. Svaki mehanizam razgradnje koji se ubrzava pod uticajem povišenih temperatura može se opisti kao termolitički put razgradnje [71, 80]. Uticaj temperature na termolitičku razgradnju supstance može se ispitivati korišćenjem Arenijusove jednačine:

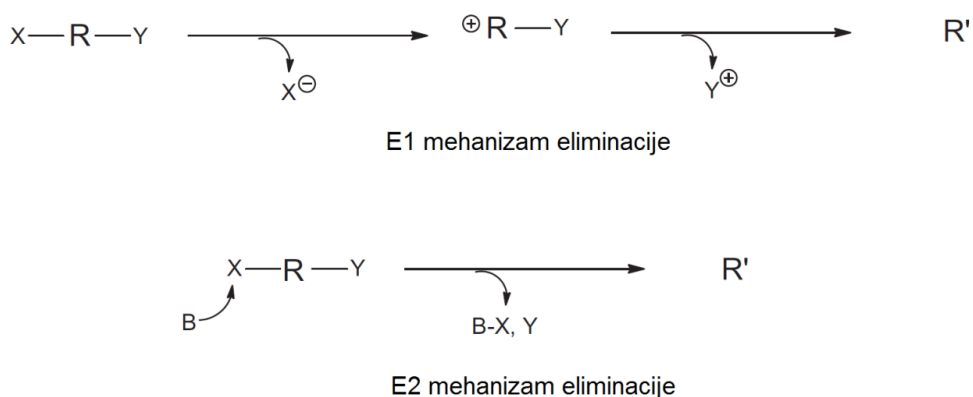
$$k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}}$$

gde je  $k$  konstanta brzine reakcije,  $A$  je faktor frekvence,  $E_a$  je aktivaciona energija,  $R$  je gasna konstanta i  $T$  je apsolutna temperatura.

Reakcije koje se mogu smatrati da se odigravaju termolitičkim putem su: dehidratacija, dekarboksilacija, izomerizacija/epimerizacija, premeštanja i dimerizacija [71, 80].

## Eliminacija

Reakcija eliminacije predstavlja reakciju kod koje dolazi do eliminacije ili oslobađanja dva supstituenta iz početnog molekula. Reakcija eliminacije se može odvijati kroz dva mehanizma E1 ili E2 eliminaciji. Brojevi 1 i 2 se odnose na red ovih reakcija, a ne na broj stupnjeva kroz koje se ove reakcije odvijaju. Na slici 29 su prikazani E1 i E2 mehanizmi reakcije eliminacije.



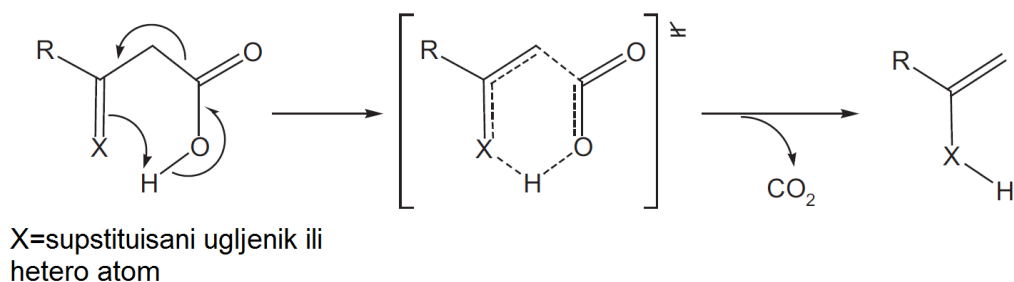
Slika 29. Mehanizam E1 i E2 reakcije eliminacije [80]

Najvažnije reakcije eliminacije koje se javljaju pri razgradnji kod farmaceutskih proizvoda jesu reakcije dehidratacije, dehidrohalgenovanja i Hofman-ova eliminacija [71, 80].

## Dekarboksilacija

U osnovi jedinjenja koja poseduju karboksilnu funkcionalnu grupu ne podležu reakciji dekarboksilacije ako na  $\beta$  položaju ne postoji aktivatorska grupa koja će učestvovati u delokalizaciji naelektrisanja u prelaznom stanju i na taj način povećati

stabilnost nastalog prelaznog stanja. Mehanizam reakcije dekarboksilacije je prikazan na slici 30 [71, 80].



Slika 30. Mehanizam reakcije dekarboksilacije [80]

### Izomerizacija i premeštanje

Izomerizacija predstavlja reakciju u kojoj dolazi do transformacije molekula u drugu hemijsku vrstu koja ima istu molekulsku formulu i predstavlja izomerno jedinjenje. Reakcija premeštanja predstavlja organsku reakciju u kojoj dolazi do premeštanja atoma u ugljeničnom nizu i nastanka drugog jedinjenja koji ima istu molekulsku formulu kao početni molekul [71, 80].

### Dimerizacija/oligomerizacija

Razgradnja putem reakcije dimerizacije se može definisati kao hemijska reakcija dva ista molekula putem različitih tipova reakcija:  $M+M=2M$ ,  $M+M=2M-m$  i  $M+X+M=M-X-M$ , gde je  $M$ -molekulska formula jedinjenja,  $m$  je fragment koji je oslobođen u reakciji dimerizacije, a  $X$  je jedinjenje koje povezuje dva ista molekula i to jedinjenje može voditi poreklo iz ekscipijenasa ili njegovih nečistoća. Razgradnja putem dimerizacije se može odigrati različitim mehanizmima i ovakva razgradnja je zastupljenija u tečnim formulacijama koje imaju visoku koncentraciju aktivnog jedinjenja [71, 80].

#### 2.4.4.4 Fotohemijska razgradnja

Fotohemijska razgradnja lekova se javlja u toku proizvodnje ili čuvanja gotovih proizvoda kada su izloženi svetlosti. Izvori svetlosti emituju zračenja u UV-A oblasti

između 320 i 400 nm i UV-B oblasti između 290 i 320 nm. Veliki broj organskih jedinjenja apsorbuje zračenje u ovim oblastima. Fotohemijske reakcije su hemijske transformacije koje se odigravaju u ekscitovanim elektronskim stanjima molekula. Pošto elektronska svojstva u ovim ekscitovnim stanjima mogu biti veoma različita u odnosu na osnovno stanje, fotohemijska razgradnja se odigrava specifičnim reakcionim mehanizmom. Da bi molekul bio fotohemijski reaktivan, neophodno je da sadrži hromoforu koja apsorbuje zračenje na talasnim dužinama bliskim izvorima svetlosti ili da sadrži funkcionalne grupe koje su reaktivne kada su u ekscitovanim elektronskim stanjima, kao što su karbonilna grupa i neke vrste dvostrukih veza [69, 85].

## **2.4.5 Eksperimentalni uslovi izvođenja studije forsirane razgradnje**

### **2.4.5.1 Termička razgradnja**

Ispitivanja termičke stabilnosti se vrše na uslovima povišene temperature (50-80°C) u čvrstom stanju ili u rastvoru. Na temperaturama iznad 80°C moguće je očekivati pojavu drugačijih mehanizma razgradnje i pojavu proizvoda razgradnje koji se neće pojaviti pod normalnim uslovima čuvanja i transporta gotovog proizvoda. U čvrstom stanju moguće je takođe primeniti i uslove povišene i niske vlažnosti na visokim temperaturama. Pri ovim uslovima treba razmotriti pojavu proizvoda razgradnje koji nastaju termolitičkom i hidrolitičkom razgradnjom ispitivane supstance [72-76].

### **2.4.5.2 Hidrolitička razgradnja**

Ispitivanja hidrolitičke stabilnosti se obično vrši u vodenim rastvorima (100% vodeni rastvori kada rastvorljivost dozvoljava ili sa dodatkom male količine organskog rastvarača kao što je acetonitril) na različitim pH uslovima (pH 1-13) i pod uticajem povišenih temperatura, ako je reakcija degradacije supstance spora na sobnoj temperaturi [72-76].

### **2.4.5.3 Fotolitička razgradnja**

Evaluacija fotolitičkih puteva razgradnje se izvodi u čvrstom stanju ili rastvoru. Uzorci se izlažu snažnom zračenju u ultraljubičastom i vidljivom opsegu elektromagnetnog spektra u opsegu talasnih dužina od 300 – 800 nm, iluminacija ne sme biti manja od 1,2 milion lux sati, a integracija UV zračenjem ne manja od 200 Wh/m<sup>2</sup> [72-76].

### **2.4.5.4 Oksidativna razgradnja**

Za ispitivanje oksidacione razgradnje uglavnom se koriste tri različita načina oksidacije: (1) autooksidacija, (2) oksidacija sa peroksidima (3) fotohemijski indukovana oksidacija. Najčešće sredstvo koje se koristi za oksidativnu razgradnju u farmaceutskoj industriji jeste vodeni rastvor vodonik-peroksida u koncentracijama od 0,1 - 3% i pod uticajem povišenih temperatura, ako je reakcija degradacije supstance spora na sobnoj temperaturi [72-76].

## **2.5 Upotreba hromatografije i on-line strukturne identifikacije nečistoća korišćenjem tačne hromatografije-masene spektroskopije LC-MS**

Proizvodnja aktivnih farmaceutskih supstanci je strogo regulisana od strane različitih nacionalnih organa u pogledu kontrole čistoće i kvaliteta aktivne supstance. Za lekove koji treba da budu lansirani na tržište, postoji regulatorni zahtev da se identifikuju nečistoće u aktivnim farmaceutskim jedinjenjima koje prelaze nivo od 0,10% [25, 26]. Strukturno određivanje i potvrda nečistoća je neophodna u svim fazama razvoja jednog leka. U procesu razvoja, nečistoće koje se javljaju u toku sinteze aktivne farmaceutske supstance moraju biti identifikovane radi kontrole kvaliteta aktivnih farmaceutskih supstanci i gotovih lekova. Upotreba LC-MS je često dovoljna za identifikaciju nečistoća i ovakav pristup je uobičajan u ranim fazama farmaceutskog razvoja gde je u ovom stupnju razvoja leka neki rizik prihvatljiv.

Masena spektrometrija u raznim kombinacijama sa drugom analitičkom instrumentacijom, je prva tehnika koja se koristi za ispitivanje nepoznate strukture. Masena spektrometrija je strukturno osetljiva tehnika, kojom se određuju molarne mase i dobijaju strukturne informacije na osnovu fragmenata u MS-MS analizi. Masena

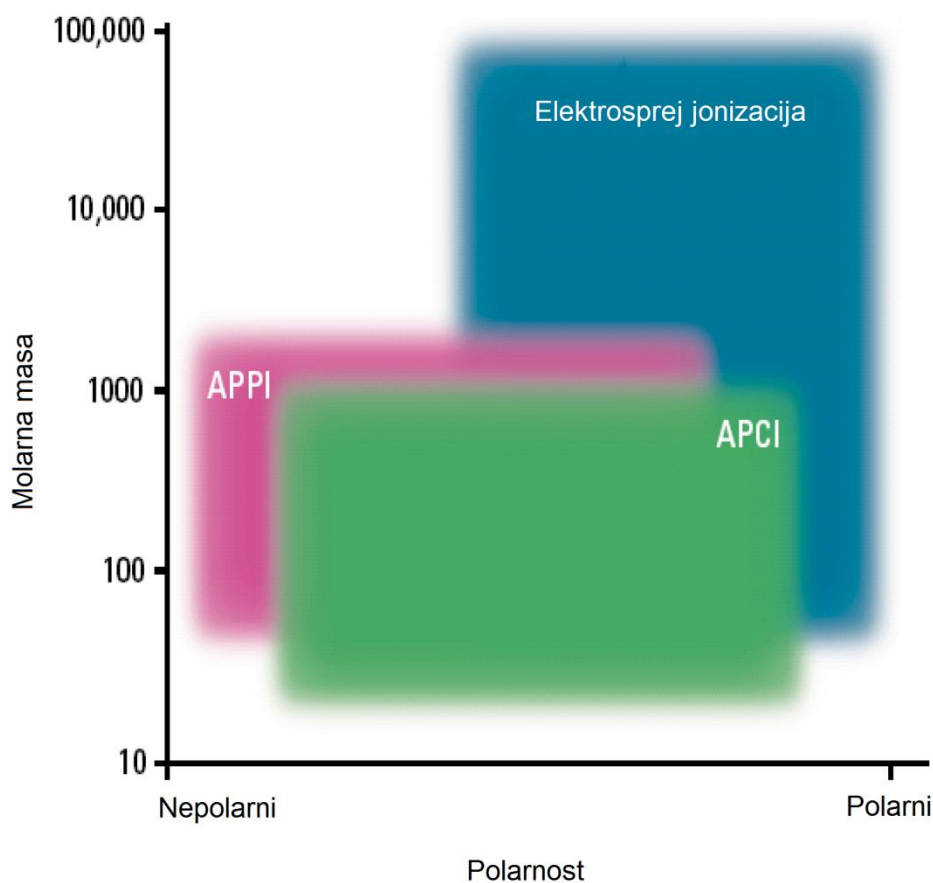
spektrometrija zahteva male količine uzorka, a daje značajne informacije o strukturi nepoznatog jedinjenja. Masena spektrometrija predstavlja destruktivnu metodu analize analita. Zaključak o strukturi iz masenog spektra je empirijske prirode. Pošto ne postoji potpuno teoretsko predviđanje masenog spektra date strukture, neophodno je vrlo pažljivo uporediti masene spektre poznate strukture i nepoznate strukture. Struktura koja je predviđena iz analize masenih spektara često nije potpuna. Iako je masena spektrometrija moćna tehnika za strukturalna određivanja, neophodno je koristiti i druge tehnike radi nedvosmislenog potvrđivanja strukture nepoznatog jedinjenja. Svaka nedvosmisleno određena struktura podrazumeva da su eksperimenti obezbedili jasne odgovore, kao što su molarne mase i reproduktivnost fragmentacije. Poređenje masenih spektara nepoznatog jedinjenja i aktivne supstance od koje je nastalo to jedinjenje pomaže u određivanju strukture nepoznatog jedinjenja. Ako su dobijene male razlike u masenim spektrima dva jedinjenja, moguće je na osnovu tih razlika predložiti strukturu nepoznatog jedinjenja. Ako su razlike značajne, onda analiza masenih spektara i predlaganje mogućih struktura zahteva mnogo više aktivnosti i dodatnih informacija dobijenih drugim metodama analize.

U masenoj spektrometriji se vrši analiza jona koji nastaju jonizacijom neutralnih molekula iz rastvora. Postoje više tehnika jonizacije molekula koje se koriste u masenoj analizi od kojih se najviše upotrebljavaju elektrosprej jonizacija (ESI), hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI) i termosprej jonizacija [41].

### **2.5.1 Izbor ESI, APCI ili APPI metode jonizacije**

API tehnike jonizacije obezbeđuju efikasnu jonizaciju raznih molekula, uključujući polarne, labilne i molekule velikih masa. Ove tehnike su meke jonizacione tehnike korisne za jonizovanje velikih molekula bez izazivanja fragmentacije (Slika 31). Zahvaljujući postojanju polarnih supstituenata kod većine lekova, za njihovu jonizaciju su pogodne API jonizacione tehnike. Primena ESI i APCI tehnika zavisi od kiselosti i baznosti analita, tako da postoje neka preklapanja u njihovoj primeni. Obično ESI najbolju efikasnost pokazuje na jakim kiselinama i bazama, kao i za peptide i proteine. U ESI tehnici može doći do nastajanja višestruko naelektrisanih jona  $[M+nH]^{n+}$ . Za jedinjenja ispod mase od 1000 nije uobičajno nastajanje višestruko naelektrisanih jona.

Utvrđeno je da APCI tehnika daje bolje rezultate za slabo kisela i slabo bazna jedinjenja do mase od 1500 daltona. Ova tehnika je manje osetljiva na jonsku supresiju, ne daje višestruko naelektrisane vrste, ali nije pogodna za termički nestabilna jedinjenja. Iako je primena API tehnika vrlo razrađena, i dalje je za detekciju ključno da je svaka komponenta jonizovana, a ponekad, i sa potpuno nepoznatim jedinjenjima je teško predvideti koja je jonizaciona tehnika najpogodnija za korišćenje [39-41].



Slika 31. Primena različitih LC/MS tehnika jonizacije

### 2.5.2 Maseni analizatori

Maseni analizatori služe za razdvajanje jona prisutnih u gasnoj fazi na osnovu njihovog  $m/z$  odnosa. Razdvajanje jona se može bazirati na različitim principima pri čemu analizatori koriste statička ili dinamička električna i magnetna polja ili njihove kombinacije. Osnovna podela analizatora u dve široke klase bazira se na tome da li u datom trenutku mogu da propuštaju jone samo jednog odnosa masa i naelektrisanja (E-



električni sektor, B-magnetni sektor, Q-kvadrupolni maseni analizator) ili dozvoljavaju simultanu propustljivost za sve jone (TOF- analizator na bazi vremena preleta, IT-jonski trap, FTICR- maseni analizator jon ciklotronske rezonance sa Furijeovom transformacijom, FT-Orbitrap-maseni analizator orbitrap sa Furijeovom transformacijom). Svaki od tipova masenih analizatora ima svojstvenih prednosti ali i ograničenja [86].

Tabela 3. Simboličko označavanje i principi razdvajanja jona po m/z odnosu kod različitih masenih analizatora

	Simbol	Princip razdvajanja
Električni sektor	E	Kinetička energija
Magnetni sektor	B	Momenat
Kvadrupol	Q	m/z (stabilnost trajektorije)
Jonski trap	IT	m/z (rezonantna frekvenca)
Analizator na bazi vremena preleta	TOF	brzina (vreme leta)
Analizator jon ciklotronske rezonance sa Furijeovom transformacijom	FTICR	m/z (rezonantna frekvenca)
Analizator orbitrap sa Furijeovom transformacijom	FT-OT	m/z (rezonantna frekvenca)

Kombinovanjem dva ili više masenih analizatora u seriji dobijaju se tandemske masene spektrometri (MS-MS) od kojih je najpoznatiji trostruki kvadrupol (QQQ). Postoje različite konfiguracije sektorskih tandemskih masenih spektrometra. Takođe postoje i hibridne geometrije koje se dobijaju kombinovanjem magnetnih sektora sa kvadrupolima ili jonskim trapom. Najpoznatiji instrument sa hibridnom geometrijom predstavlja Q-TOF maseni spektrometar. Kvadrupolni i sektorski maseni analizatori daju sposobnost izvođenja tandem u prostoru MS-MS eksperimenata. Jonske zamke i FT-MS instrumenti omogućavaju performanse eksperimenata tandem u vremenu, omogućavajući i MS<sup>n</sup> (višestepena masena analiza) eksperimente. Višestepena MS/MS analiza u prostoru zahteva maseni analizator za svaku MS-MS fazu, tako da za slučaj n>2, ovakve geometrije nisu praktične [87-90].

### 2.5.3 Tandem masena spektrometrija

Tandem MS tehnika je višestepena analiza jonskih vrsta koja uključuje izolaciju jona  $m/z$  i njegovu fragmentaciju. Tandem MS se takođe naziva i "MS/MS", za dva stepena masene analize ili  $MS^n$ , za više stepene masene analize. Prednosti  $MS^n$  analize obuhvataju: (1) povećanje odnosa signal-šum, (2) povećanje kapaciteta razdvajanja multikomponentnih smeša i izolovanje hemijskih vrsta i praćenje njihovih reakcija, i (3) povećanje hemijske specifičnosti u smislu strukturne analize prilikom korišćenja fragmentacije. Izolacija i fragmentacija jona analita u cilju strukturnih analiza je najčešća primena  $MS^n$  analiza. Primenom različitih tehnika aktivacije jona možemo dobiti detaljnu strukturnu karakterizaciju jona dodeljivanjem molekulskih i fragmentnih pikova odgovarajućim hemijskim vrstama. Na primer, jednostepenom masenom analizom protonovanog molekula možemo dobiti osnovni signal  $m/z$  koji potiče od jona prekursora. Ove informacije u retkim slučajevima omogućava identifikaciju nepoznatih hemijskih vrsta i veoma često ove informacije nisu dovoljne za određivanje najverovatnije strukture nepoznatih jedinjenja već su potrebne informacije o masama fragmentnih jona i interpretacije intramolekularnih veza. Naročito u slučajevima kada je reč o hemijskom jedinjenju sa više od nekoliko atoma i kada se analize vrše na instrumentu koji ne mogu da odrede tačne masa (iz kojih se izvode molekulske formule) sa dobrom preciznošću (što je obično slučaj sa jonskim trapovima). Međutim u instrumentima sa niskom rezolucijom (kao npr. jonski trapovi) je moguće izolovati nepoznati jon od interesa, a zatim izazvati fragmentaciju i na osnovu  $m/z$  vrednosti i relativnih inteziteta signala fragmenata moguće je dobiti dodatne informacije o strukturi nepoznatog jedinjenja. Postoji niz načina kojim se može izazvati aktivacija jona u MS/MS. Najčešće primenjena metoda aktivacije je disocijacija izazvana sudarima (CID), u kojoj jon-molekulski sudari rezultuju karakterističnom fragmentacijom jona prekursora. Tehnika poznata kao disocijacija izazvana sudarima sa površinom (SID) nastaje sudarom jona prekursora sa površinom tako da nastaju slični fragmenti joni kao i primenom CID tehnike. Tehnike disocijacije izazvane elektronima, kao što je disocijacija zahvatom elektrona (ECD) i disocijacija prenosom elektrona (ETD), podrazumevaju interakciju između jona i slobodnih elektrona ili između jona suprotnog polariteta, što dovodi do fragmentacije radikalnim mehanizmom i daje informacije o fragmentnim jonima koje su često komplementarne sa CID.

Tandem MS može biti izvedena različitim kombinacijama masenih analizatora. Kod instrumenata kod kojih je moguće izolovati, fragmentisati i razdvajati jone po  $m/z$  odnosu u istom fizičkom uređaju moguće je izvesti tandem u vremenu  $MS^n$  analize. Ovo je jedino moguće u uređajima koji imaju sposobnost da skladište jone kao što su trodimenzioni i dvodimenzioni (linearni) jonski trapovi (2DIT, 3DIT ion trap) ili analizator jon ciklotronske rezonancije sa furijeovom transformacijom (FTICR).

Analizatori tipa (kvadrupoli i TOF) zahtevaju konfiguraciju tandem u prostoru gde se redno vezuju dva ili više masenih analizatora. Princip rada tandemskog instrumenta je da se molekularni jon, koji nastaje pod uticajem jonizacije iz jonskog izvora, selektuje u prvom masenom analizatoru, a zatim se primenom pogodne aktivacione metode izaziva fragmentacija selektovanog jona (dolazi do disocijacije molekularnog jona izazvana sudarima-CID) i na kraju se vrši masena analiza dobijenih fragmentnih jona. Najčešće korišćeni maseni spektrometri ovog tipa su trostruki kvadrupol (QQQ) maseni spektrometri i QTOF maseni spektrometri [86].

## **2.6 Izdvajanje i identifikacija nečistoća i proizvoda razgradnje**

### **2.6.1 Metode izdvajanja**

Za direktnu karakterizaciju nečistoća neophodno je izvršiti njihovo izdvajanje iz smeše ostalih jedinjenja. Metode koje se mogu koristiti za izdvajanje nečistoća su sledeće:

- čvrsto-tečna ekstrakcija (SPE-solid phase extraction),
- Tečno-tečna ekstrakcija,
- Ubrzane metode ekstrakcije,
- Natkritične ekstrakcije,
- Tankoslojna hromatografija,
- Gasna hromatografija,
- Tečna hromatografija visokih performansi,
- Kapilarna elektroforeza,
- Natkritična hromatografija.

U slučajevima kada postoji nizak nivo nečistoća (i u mnogim slučajevima, njihova sličnost u strukturi sa aktivnom supstancom) nije moguće koristiti konvencionalne tehnike izdvajanja. U ovim slučajevima za izdvajanje jedinjenja neophodno je primeniti tehnike sa velikom moći razdvajanja kao što je hromatografija, a naročito HPLC.

Identifikacijom proizvoda razgradnje mogu se dobiti informacije o načinu nastajanja nečistoće i definisati mehanizam reakcije razgradnje. U procesu identifikacije nepoznatog jedinjenja, prvo se vrši analiza i upoređivanje relativnih retencionih vremena (HPLC) u odnosu na sve raspoložive poznate nečistoće. Ako se relativno retenciono vreme nepoznatog jedinjenja poklapa sa referentnim standardom poznate nečistoće, onda se jedinjenje može identifikovati koristeći HPLC (sa UV photo diode array detektorom) i LC-MS analizom. Identifikacija se potvrđuje poređenjem retencionog vremena, UV spektra i masenog spektra nepoznatog jedinjenja i standarda. Ako relativno retenciono vreme nepoznatog jedinjenja ne odgovara retencionom vremenu referentnog standarda nečistoća, neophodno je u sledećem koraku izvršiti HPLC-MS analizu radi dobijanja podataka o molarnoj masi jedinjenja, kao i masama fragmenata koje su dobijene u MS-MS analizi. Za sprovođenje LC-MS, neophodno je primeniti HPLC metodu koja je kompatibilna sa maseno spektrofotometrijskom analizom. Mobilna faza treba da sadrži lako isparljive pufere koje su HPLC-MS kompatibilni. Ako je moguće predložiti strukture iz podataka dobijenih masenom spektrometrijom, moguće je na osnovu poznavanja hemijskih procesa pri kojima nastaje nepoznato jedinjenje proceniti verodostojnost predloženih struktura iz podataka dobijenih masenom spektrometrijom. Predložene strukture se mogu sintetisati i na taj način identifikovati nepoznato jedinjenje. Pošto je izdvajanje nečistoće koja je prisutna u niskom koncentracionom nivou veoma težak i dugotrajan proces, krajnji cilj je da se pronađe uzorak koji bi sadržao veću količinu nepoznatog jedinjenja. Jedan od načina za dobijanje ovakvog uzorka u kome je dovoljna količina nepoznatog jedinjenja jeste primenom forsirane (ubrzane) razgradnje polaznog jedinjenja [87-91].

## 2.6.2 Preparativna HPLC

Preparativna hromatografija, koja se često naziva semi preparativna hromatografija, je proces korišćenja tečne hromatografije radi izdvajanja dovoljne količine materijala za druge eksperimentalne svrhe. Upotrebom preparativne HPLC moguće je izdvojiti desetine miligrama čistog nepoznatog jedinjenja u cilju određivanja strukture spektroskopskim tehnikama [90]. Preparativna HPLC je jedna od najboljih metoda za izolaciju nepoznatih nečistoća i/ili proizvoda razgradnje zahvaljujući njenom visokom stepenu razdvajanja. Za preparativnu HPLC metodu se uglavnom koriste sledeći parametri:

*Dužina kolone:* 15–50 cm

*Širina kolone:* 10–40 mm

*Veličina čestica:* 5–60  $\mu\text{m}$

*Količina:* 10–1000 mg

*Protok:* 5–100 mL/min

Polazna tačka u preparativnom izdvajanju je razvoj analitičke metode sa optimalnim uslovima razdvajanja. Optimizacija analitičke metode podrazumeva uslove koje obezbeđuju maksimalnu rezoluciju jedinjenja od interesa i minimalnog vremena trajanja analize. Razdvajanje se može vršiti primenom normalno fazne ili reverzno fazne hromatografije. Optimizacija parametara podrazumeva odabir adekvatne kolone, mobilne faze i protoka. Mobilna faza mora biti odabrana na taj način da se izbegne mogućnost nastajanja soli sa jedinjenjem koje se izdvaja. Zato se za tu svrhu koriste isparljive soli kiselina kao što su trifluorosirćetna, mravlja i sirćetna i amonijum kontrajon za podešavanje pH vrednosti pufera sa bilo kojom od ovih kiselina. Nakon razvoja i optimizacije analitičke HPLC metode u cilju dobijanja maksimalne rezolucije potrebno je definisati parametre razdvajanja na preparativnom sistemu. Stacionarna faza kolone za preparativnu hromatografiju treba da bude od istog materijala i veličine čestica. Kolona je najvažniji deo preparativnog sistema, pošto ona određuje količinu odnosno kapacitet i stepen čistoće jedinjenja koje se izdvaja. Ovim postupkom se definiše tip kolone, protok, sastav mobilne faze i količina uzorka za datu kolonu. Dva najvažnija faktora prilikom prenosa metode na preparativni sistem koja treba

proporcionalno podesiti su maksimalna količina uzorka i protok. Ovi parametri se mogu izračunati na osnovu sledećih formula:

$$M_P = M_a \times \frac{(D_p)^2 \times L_p}{(D_a)^2 \times L_a}$$

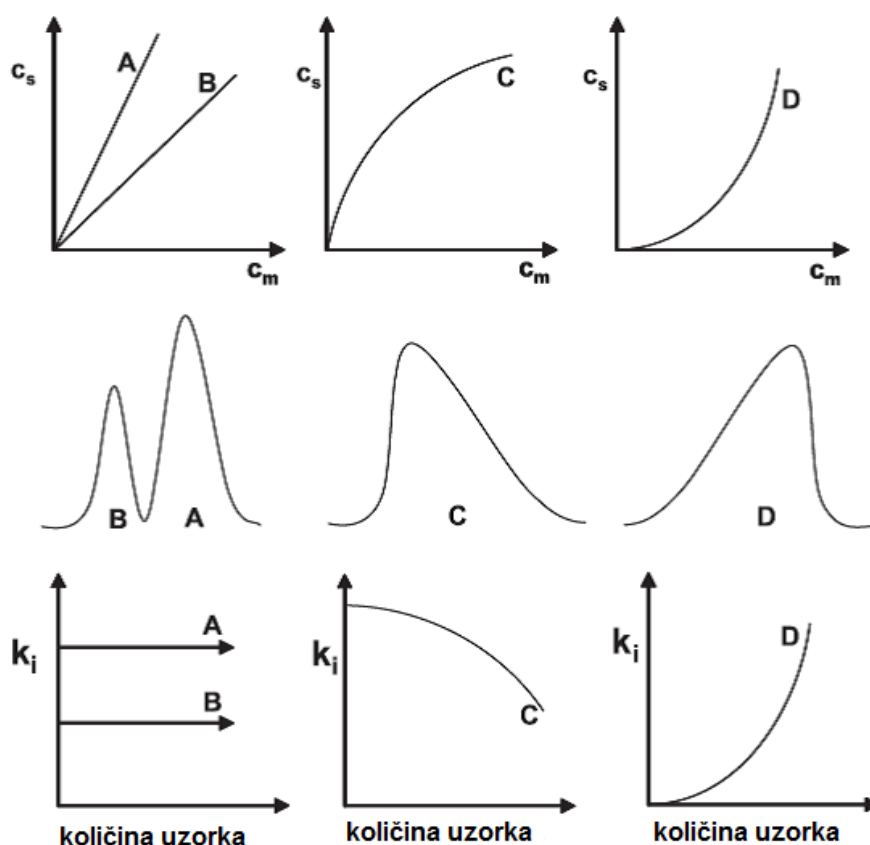
Gde je  $M_p$  maksimalna količina uzorka na preparativnoj koloni,  $M_a$  je maksimalna količina uzorka na analitičkoj koloni,  $D_p$  je prečnik preparativne kolone,  $D_a$  je prečnik analitičke kolone,  $L_p$  je dužina preparativne kolone i  $L_a$  je dužina analitičke kolone. Da bi se zadržala ista rezolucija na preparativnom sistemu, neophodno je i protok na preparativnom sistemu proporcionalno podesiti. Protok na preparativnom sistemu se može izračunati na osnovu sledeće formule:

$$F_P = F_a \times \frac{(D_p)^2 \times L_p}{(D_a)^2 \times L_a}$$

Gde je  $F_p$  protok na preparativnom sistemu i  $F_a$  je protok na analitičkom sistemu [92].

### ***Preopterećenje kolone***

Suštinska razlika između preparativne hromatografije i analitičke hromatografije je u količini uzorka koji se unosi u LC sistem. U analitičkoj hromatografiji uzorak je izuzetno male količine u odnosu na količinu stacionarne faze (< 1: 1000) i hromatografija se samim tim odvija u linearnom opsegu adsorpcionih izotermi komponenti koje se razdvajaju. Postepenim povećanjem količine uzorka, će u prvom redu dovesti do adekvatnog povećanja visine i površine pika dok će retenciona vremena i faktor razdvajanja ostati nepromenjeni. Dalje povećanje količine koja se unosi u sistem će prouzrokovati pojavu koja se naziva preopterećenje kolone i doći će do deformacije i pomeranja retencionih vremena pikova komponenti koje se razdvajaju zbog pomeranja u nelinearni opseg adsorpcionih izotermi. U slučaju konkavnih izotermi doći će do širenja pikova u vidu tegljenja i kraćeg vremena zadržavanja, dok će u slučaju konveksnih izotermi doći do širenja pikova na suprotnoj strani i dužih vremena zadržavanja komponenti (Slika 32) [92].



Slika 32. Uticaj adsorpcione izoterme na oblik hromatografskog pika i faktor kapaciteta  $k$  u slučaju preopterećenja kolone.  $C_s$  i  $C_m$  su koncentracije supstance u stacionarnoj fazi i mobilnoj fazi [92]

Kada je postavljena preparativna metoda, moguće je vršiti iniciranja i sakupljati jedinjenje od interesa u frakcionom kolektoru. Nakon izdvajanja frakcija u kome se nalazi jedinjenje, potrebno je izvršiti koncentrovanje frakcije primenom nekih od koncentracionih tehnika (destilacija, precipitacija, liofilizacija, tečna ekstrakcija ili membranska filtracija). Nakon odvajanja jedinjenja iz mobilne faze, uzorak je potrebno sušiti u vakuumu da bi se izdvojili svi zaostali rastvarači. Pošto je čistoća izdvojenog uzorka od kritičnog značaja za dobijeni kvalitet NMR podataka, neophodno je dodatno pročistiti uzorak ponovnim iniciranjem na preparativnu kolonu. Prečišćavanje izdvojenog jedinjenja se vrši korišćenjem mobilne faze bez aditiva ili pH korekcije i gradijentnog programa eluiranja u prvom koraku čistom vodenom fazom da bi se isprali ostaci soli, a zatim se povećanjem organskog rastvarača eluira željeno jedinjenje.

## 2.7 Primena NMR spektroskopije za karakterizaciju strukture

NMR je moćan analitički alat za određivanje strukture nepoznatog jedinjenja. Osetljivost NMR spektroskopije je znatno niža u poređenju sa ostalim analitičkim tehnikama. Na primer, količina uzorka koja je potrebna za NMR analizu je reda desetine miligrama u poređenju sa masenom spektroskopijom gde je količina neophodna za analizu reda veličine i do manje od 1 mg. S druge strane NMR spektroskopija je nedestruktivna metoda analize, što je veoma važna i korisna osobina pri karakterizaciji jedinjenja koji je dostupan u vrlo malim količinama. Pored toga, NMR se može smatrati da predstavlja „univerzalni“ detektor za vodonikove i ugljenikove atome, kao i za druga magnetno aktivna jezgra.

Najvažniji podatak koji je potreban pre početka NMR analize jeste određivanje molarne mase nepoznatog jedinjenja. Ova informacija u velikoj meri olakšava proces karakterizacije smanjenjem broja mogućih struktura. Kao korisna polazna tačka za pomoć u tumačenju NMR spektara nepoznatog jedinjenja jeste i analiza NMR spektra poznate strukture polazne supstance.

Za karakterizaciju strukture nepoznatog jedinjenja potrebno je snimiti jednodimenzionalne spektre vodonika i ugljenika oba jedinjenja, nepoznatog i polaznog jedinjenja. Dvodimenzioni korelacioni spektri će dati dodatne informacije za potpunu asignaciju nepoznatog jedinjenja. HMBC eksperiment, u kombinaciji sa COSY, HSQC, i 1-D protonskim i ugljeničnim eksperimentom predstavlja standardni set eksperimenata koji se koristi za određivanje strukture nepoznatih nečistoća i proizvoda razgradnje. Takođe za rasvetljavanje strukture nepoznatih nečistoća i proizvoda razgradnje korisno je i uporediti dobijene NMR spektre sa NMR spektrima polaznog jedinjenja sa već utvrđenom strukturom. Na osnovu razlika u NMR spektrima moguće je identifikovati koji su se signali pojavili, a koji nestali i na taj način utvrditi mesto u molekulu na kome je došlo do razgradnje ili promene [88-90]. Za karakterizaciju strukture koriste se i dodatne informacije dobijene drugim tehnikama analize, kao što su IR apsorpciona spektroskopija i hromatografska relativna retenciona vremena i dr.



### 2.7.1 Jednodimenzionalni NMR eksperimenti

Osnovni NMR eksperiment je pulsni protonski eksperiment. Sastoji se od jednog  $90^\circ$  pulsa. Standardni  $^{13}\text{C}$  NMR eksperiment se izvodi sa raspredanjem protona od ugljenika radi povećanja osetljivosti metode. U odsustvu sprezanja protona, svaki signal ugljenikovog atoma bi bio multiplet koji bi sadržao broj signala koji je za jedan veći od broja atoma vodonika za koje je ugljenik vezan. Za razliku od vodonika, prirodna zastupljenost  $^{13}\text{C}$  atoma je samo 1,1%, tako da bi se merenje izvršilo u razumnom vremenu važno je postići veću osetljivost merenja. Obično su protoni jedina magnetno aktivna jezgra koja se rasprežu u standardnom C NMR eksperimentu [93-96].

### 2.7.2 Dvodimenzionalni NMR eksperimenti

Dvodimenzionalni eksperimenti su na bazi protonske detekcije pošto se protoni koji su znatno rasprostranjeniji mnogo lakše detektuju i samim tim je i osetljivost veća. Eksperimenti koji su tradicionalno bili bazirani na detekciju ugljenika su zamenjeni sa tzv. „inverznim” eksperimentima kod kojih se vrši transfer polarizacije sa ugljenika na proton i detektuju protonski signali. Na taj način se indirektno detektuje signal ugljenika preko njegovog uticaja na posmatrani signal protona. Eksperimenti sa inverznom detekcijom su od posebne važnosti za karakterizaciju nepoznatih jedinjenja i proizvoda degradacije.

#### 2.7.2.1 2D Korelaciona spektroskopija (COSY)

Eksperiment koji se koristi za identifikaciju protonskog homonuklearnog sprezanja se naziva „COSY”. Jedan COSY spektar daje kompletnu mapu protonskih skalarnih (J) sprezanja za neki molekul. Ovom tehnikom se vrši korelacija između jezgra ( $\text{H}_a$ ) i jezgra ( $\text{H}_b$ ) koji su skalarno spregnuti preko dve veze (geminalno sprezanje), preko tri veze (vicinalno sprezanje) ili u ređim slučajevima preko četiri ili pet veza (daljinsko sprezanje). Položaj svakog signala u COSY spektru definisan je pomoću dve jednake frekventne skale na kojima su hemijska pomeranja protona  $\delta_{\text{H}}$ . Signali na dijagonali (tzv. Autokorelacioni signali) potiče od magnetizacije koja nije preneti drugim pulsom i oni u stvari, predstavljaju normalan 1D NMR spektar. Van

dijagonale se nalaze takozvani korelacioni signali koji potiču od prenete magnetizacije koja je prenetna sprežanjem između protona. Ovi korelacioni signali omogućavaju dovodenje u vezu multiplleta koji potiču od skalarno spregnutih protona. COSY NMR spektri daju informacije o položaju susednih protona. Generalno, korelacioni signali na ovim spektrima se pojavljuju kada postoji skalarno sprežanje između dva protona. Najveći intenzitet signala potiču od jakog sprežanja između protona koji su razdvojeni sa dve ili tri hemijske veze, što znači da će se na ovom spektru pojaviti korelacioni signali susednih protona u jednom organskom molekulu. Međutim pojava ovih korelacionih signala najviše zavisi od veličine konstante kuplovanje između susednih protona, tako da u pojedinim situacijama dolazi do pojave korelacionih signala koji potiču od protona koji su međusobno udaljeni i više od tri hemijskih veza. Ovaj slučaj se često javlja kod aromatičnih sistema i jedinjenja sa dvogubim vezama [93-96].

### **2.7.2.2 Inverzni heteronuklearni 2D NMR eksperimenti: HSQC i HMBC**

Ove dvodimenzionalne (2D) tehnike su tehnike kojima se dovode u međusobnu vezu  $^{13}\text{C}$  jezgra sa  $^1\text{H}$  jezgrima unutar molekula. Kombinacija HSQC i HMBC predstavlja najmoćniji metod koji je dostupan za utvrđivanje strukture i ugljeničnog rasporeda u organskim jedinjenjima.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) eksperiment heteronuklearne korelacione spektroskopije preko jedne veze daje 2D spektar koji ima  $^{13}\text{C}$  hemijska pomeranja na jednoj osi i  $^1\text{H}$  hemijska pomeranja na drugoj osi, sa korelacionim signalima koji ukazuju na postojanje prostorne bliskosti između jezgara  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  koji su neposredno međusobno vezani hemijskom vezom. 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, a koji protoni nisu, već su vezani za neko drugo jezgro (OH, NH grupe..). Slično tome, ako ne postoji korelacioni signal onda je u pitanju kvaternarni ugljenik.

Slično eksperimentima koje pokazuju korelaciju preko jedne veze dostupni su i eksperimenti koji pokazuju korelacije preko više hemijskih veza. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) je 2D eksperiment koji se koristi za korelaciju H i C atoma koji su razdvojeni sa više hemijskih veza (obično dve ili tri). Eksperiment je osmišljen da uguši magnetizaciju koja potiče od direktno povezanih jezgara, ali ostaci ovih signala

mogu biti primećeni u većini spektara. Oni ne daju informaciju o broju veza između posmatranog ugljenika i vodonika ukoliko se detektuje korelacioni pik. Na posredan način oni pružaju informaciju o položaju kvarternarnih ugljenika putem korelacije sa njima bliskim protonima. U HMBC, pojava korelacionih pikova ukazuju na daljinsko sprezanje između protona i ugljenika. Na ovaj način može se saznati koji protoni su direktno vezani za koji ugljenik. Intenziteti korelacionih pikova pored ostalog zavise i od odnosa veličine daljinskih konstanti sprezanja i odabrane vrednosti za vremenski period  $\Delta_{LR}$ , koji treba da je optimalno postavljen na  $1/2nJCH$  ( $2nJCH$  od 5-25Hz).

Uprkos nedostatku ove tehnike za razlikovanje između korelacija preko dve i tri veze (kada su one bliskih vrednosti), protoni mogu biti potencijalno korelisani sa velikim brojem ugljenika koji su njegovoj blizini udaljeni dve ili tri veze, pružajući dosta strukturnih podataka o nepoznatom molekulu. Detektovanje međusobne korelacije ugljenika i protona ne ometaju heteroatomi koji su između njih vezani. Na ovaj način HMBC spektar sadrži podatke i o  $^{13}C$  jezgrima za koje nisu direktno vezani vodonici (karbonilna grupa ili kvaternerni ugljenici) ili o međusobnoj vezi jezgara preko azota ili kiseonika [93-96].

## **2.8 Softverski programi za predviđanje razgradnje farmaceutskih supstanci**

Određivanje glavnih proizvoda hemijske reakcije za date reaktante i reakcione uslove predstavlja fundamentalni problem u organskoj hemiji. Reakcije se odigravaju pod uticajem složenih fizičkih dejstva elektronskih i strukturnih svojstva reaktanata i reakcionih uslova kao što su temperatura, koncentracija i vrsta rastvarača. Postoje različiti pristupi koji se koriste za predviđanje hemijskih reakcija [97-102]. Jedan od pristupa je korišćenje fizičkih simulacija prelaznih stanja korišćenjem različitih kvantno-mehaničkih modela i drugih aproksimacija [97-102]. Ove simulacije mogu biti visoke preciznosti ali zahtevaju pažljivu pripremu eksperimenata i zahtevaju složene proračune. Na ovom nivou mogući reakcioni putevi predstavljaju puteve minimalne energije između stabilnih konfiguracija na površima potencijalne energije, gde sedla na površima potencijalne energije predstavljaju prelazna stanja.

Drugi pristup koji se koristi kod sistema za predviđanje hemijskih reakcija uključuje korišćenje logičkih algoritama i baze podataka koje sadrže veliki broj reakcija

ili transformacija [103-109]. Ovi sistemi funkcionišu na principu pretrage postojećih baza reakcija za reakciona mesta u datom molekulu i predlažu analogne transformacije. Ovaj pristup je inkorporiran u nekoliko komercijalno dostupnih softverskih sistema kao što su: CAMEO, DELPHI, Zeneth, Reaction predictor i dr.

## **CAMEO**

CAMEO je kompjuterski program koji predviđa proizvode organskih reakcija za date polazne materijale, reagense i uslove [103]. Analiza pokriva glavne degradacione uslove: bazno/nukleofilne, kiselo/elektrofilne, slobodno-radikalske, oksidaciono-redukcionne i fotohemijske reakcije kao i njihovu mehanističku interpretaciju. CAMEO-ovi algoritmi su projektovani da daju veliki broj proizvoda razgradnje tako da se i pored strogih pravila predviđanja, smanji mogućnost da se ne predvidi neki od stvarnih proizvoda razgradnje. Međutim moguće je da neki od predviđenih proizvoda pretrpi dalju razgradnju. Postupak predviđanja proizvoda degradacije podrazumeva samo nastanak primarnog razgradnog proizvoda i zanemaruje njegovu dalju razgradnju na sekundarne ili tercijarne proizvode, koji bi ustvari mogli biti finalni proizvodi koji se detektuju u eksperimentu. CAMEO je naročito uspešan u predviđanju nekih tipova hemijskih reakcija kao što su: hidroliza amida, oksidacija benzilskih grupa, nastajanje sulfoksida i sulfona, nastajanje imina; ali sa druge strane znatno je ograničeniji u predviđanju fotohemijskih reakcija.

## **DELPHI**

DELPHI (Degradation Expert Leading to Pharmaceutical Insight) je ekspertski sistem, razvijen od strane kompanije Pfizer. DELPHI sistem ulaznu molekulsku strukturu analizira na podstrukture, reaktivna mesta i funkcionalne grupe i vrši predviđanja mogućih proizvoda reakcija pod datim uslovima na osnovu opštih hemijskih principa i specijalizovanih pravila. U odnosu na CAMEO, DELPHI je posebno dizajniran za predviđanje reaktivnosti i razgradnje molekula. U odnosu na CAMEO, DELPHI predviđa ne samo primarne razgradne proizvode već i sekundarne proizvode razgradnje.

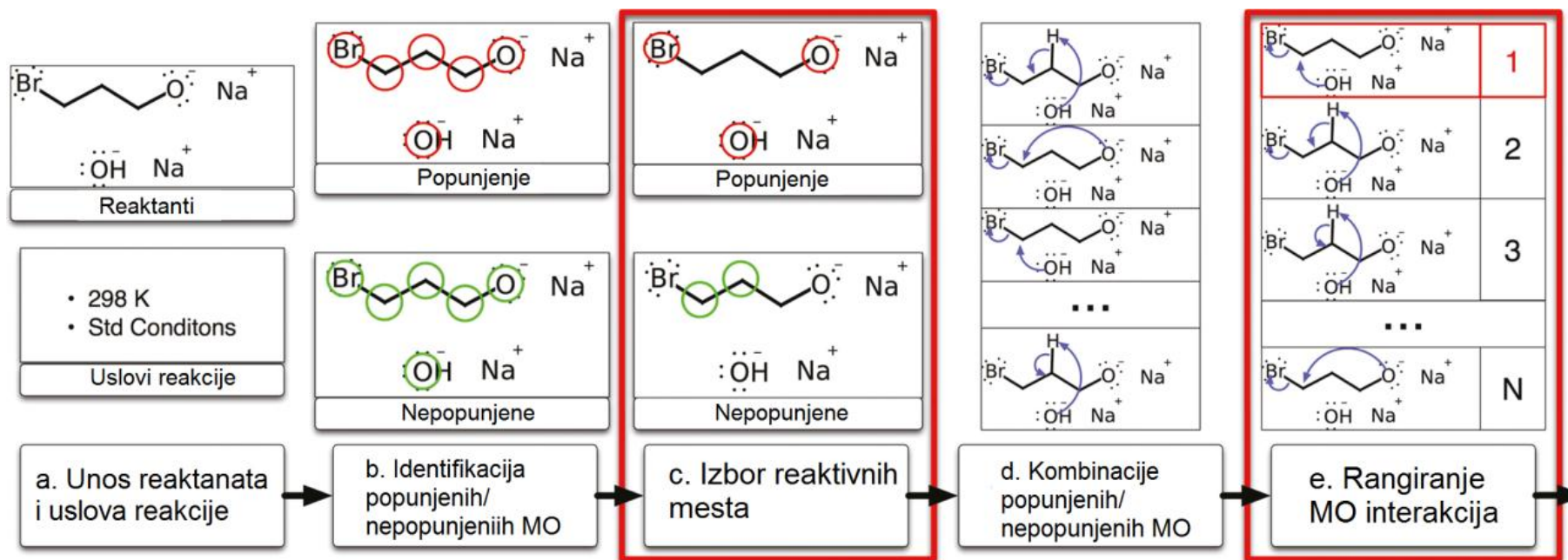
## Zeneth

Zeneth softver je ekspertski sistem razvijen od strane LHASA Ltd. Ovaj softver predstavlja novu generaciju softvera za predviđanje razgradnje organskih molekula. Ovaj softver koristi ugrađene logičke algoritme (pravila zaključivanja) kojima obrađuje unete reakcione uslove. Za predviđanje reakcija se koriste logički algoritmi koji su razvijeni od strane hemičara i eksperata, a ne na osnovu mehanističkih proračuna. Osim logičkih algoritama i baze transformacija, predviđanja o mogućnosti odvijanja reakcija i reakcionih puteva uključuju i predviđanje hemije interakcija leka i ekscipijensa u gotovom proizvodu, koja nije uključena u softverskim programima CAMEO i DELPHI.

### Reaction predictor

Ovaj sistem za predviđanje hemijskih reakcija koristi metodu molekulskih orbitala i reakcioni mehanizmi su modelovani na osnovu interakcija između popunjenih molekulskih orbitala (donora) i nepopunjenih molekulskih orbitala (akceptora) [107, 108]. Na osnovu ove metode sistem u prvom koraku određuje sve kombinacije elementarnih reakcija između molekula reaktanata. U drugom koraku na osnovu postavljenog seta pravila iz baze podataka sistema, sistem vrši selekciju mogućih elementarnih reakcija između reaktanata iz skupa svih kombinacija elementarnih reakcija. Na kraju kao rezultat na osnovu seta pravila u bazi podataka sistem vrši statističko rangiranje mogućih elementarnih reakcija između reaktanata. Šematski prikaz sistema je prikazan na slici 33.

Ovaj postupak se može ponoviti za dobijene proizvode elementarnih reakcija koji su rangirani sa najvećom verovatnoćom i tako izvršiti predviđenje hemijske reakcije za date reaktante koja se odigrava u više stupnjeva.



Slika 33. Sistem za predviđanje hemijskih reakcija: (a) unos rektanata i uslova reakcije, (b) identifikacija potencijalnih donora i akceptora koristeći aproksimaciju popunjenih i nepopunjenih MO, (c) skup postavljenih pravila na osnovu kojih sistem vrši odbacivanje nereaktivnih mesta i vrši izbor potencijalnih reaktivnih mesta u reaktantima, (d) reakcije vezivanja popunjenih i nepopunjenih MO reaktanata, (e) model rangiranja koji služi za grupisanje reakcija tako da reakcije sa najvećim rangom predstavljaju glavne proizvode reakcije. Glavne proizvode reakcije je moguće ponovo uneti u sistem kao reaktante i na taj način sistem dobiti predviđanje reakcije koja se odigrava u više stupnjeva.

### 2.8.1 Predviđanje stabilnosti farmaceutskih supstanci prema oksidaciji

Stabilnost farmaceutskih supstanci prema oksidaciji se može predvideti sa dovoljnom sigurnošću na osnovu teoretskih proračuna. Susceptibilnost organskih molekula prema oksidaciji nukleofilno/elektrofilnim reakcijama i reakcijama prenosa elektrona moguće je predvideti korišćenjem proračuna graničnih molekulskih orbitala (FMO). Na osnovu FMO teorije, reakcija će se odigrati na mestu između najniže nepopunjene molekulске orbitale (LUMO) elektrofilnog reagensa i najviše popunjene molekulске orbitale HOMO nukleofilnog reagensa. Nukleofilni reagens je organski molekul i svojstva njegovih najviših popunjenih molekulskih orbitala određuju njegovu sklonost ka oksidaciji. Proračun HOMO orbitala organskog reaktanta daje informacije o delovima molekula koji su najosetljiviji prema oksidaciji bilo nukleofilno-elektrofilnim reakcijama ili reakcijom prenosa elektrona. U oksidaciji mehanizmom slobodnih radikala, reakcija apstrakcije protona određuje brzinu reakcije propagacije. Na osnovu stabilnosti odgovarajućih slobodnih radikala može se predvideti susceptibilnost organskog molekula prema oksidaciji. Proračunom energija disocijacije veza (BDE) organskog molekula mogu se odrediti mesta koja su podložna autooksidaciji [27].

## 2.9 Cilj istraživanja

Naučni cilj ovog rada je da se ispitivanjem stabilnosti odgovarajućim transformacijama donepezil-hidrohlorida razviju metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida u smešama i da se analizom dobijenih smeša nakon određenih reakcija forsirane razgradnje utvrdi priroda transformacija ispitivanog molekula. U tom cilju izvršiće se karakterizacija svih dobijenih proizvoda razgradnje korišćenjem HPLC tehnika, IR i UV-Vis spektrofotometrije, LC-MS merenjima i 1D i 2D NMR spektroskopskih metoda. Takođe će se dobijeni eksperimentalni rezultati porediti sa in-silico predviđenim degradacionim proizvoda uz pomoć softverskog programa. Kombinovanje teorijskih i eksperimentalnih rezultata predstavlja kompletnu karakterizaciju degradacionog ponašanja ispitivanog jedinjenja.

Rezultati koji će proisteći iz istraživanja treba da doprinesu razvoju novih selektivnih, osetljivih, efikasnih, HPLC i elektrohemijskih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida kao aktivne farmaceutske supstance (API) i u različitim farmaceutskim oblicima uključujući i biološke uzorke.



### 3.0 EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 Materijali

U eksperimentalnom delu korišćeni su sledeće hemikalije, reagensi i komercijalni uzorci lekova:

- Radni standard donepezil-hidrohlorida, Hemofarm AD Stada
- Donepezil impurity A, Piperidine impurity, IND-SWIFT
- Donepezil impurity B, IND-SWIFT
- Donepezil impurity C, IND-SWIFT
- Donepezil impurity D, Donepezil N-Oxide, IND-SWIFT
- Donepezil impurity E, IND-SWIFT
- Donepezil impurity F, IND-SWIFT
- Donepezil 10 mg tablete, Hemofarm AD Stada
- Natrijum-hidrogenkarbonat, p.a. Merck
- Dejonizovana voda, 18 M $\Omega$ , IHTM, Beograd
- Kalijum dihidrogen fosfat, p.a, Merck
- Fosforna kiselina, p.a., Merck
- Trietilamin, p.a., Merck
- Metanol, HPLC čistoće, J.T. Baker
- Acetonitril, HPLC čistoće, Sigma-Aldrich
- Natrijum hidroksid, p.a., J.T.Baker
- Hlorovodonična kiselina, conc, p.a., Merck
- Vodonik-peroksid, 30 %, p.a., Merck
- Prečišćena voda (HPLC čistoće)
- Mravlja kiselina, p.a., Sigma-Aldrich
- Amonijum-acetat, p.a., Merck
- Amonijum-hidroksid, p.a., Merck

## 3.2 Priprema rastvora potrebnih za validaciju metode

### 3.2.1 Linearnost metode

Rastvori za ispitivanje linearnosti su pripremljeni u sedam koncentracionih nivoa korišćenjem osnovnog rastvora na sledeći način. Osnovni rastvor je pripremljen odmeravanjem 25,0 mg radnog standarda donepezil-hidrohlorida i po 25,0 mg referentnih standarda nečistoće A i nečistoće D u odmerni sud od 100 ml. Ove supstance su rastvorene u mobilnoj fazi i istim rastvaračem odmerni sud je dopunjen do oznake. 5,0 ml ovog rastvora je preneto u odmerni sud od 50 ml koji je dopunjen do oznake rastvaračem za uzorke. Odgovarajuće zapremine odgovarajućih rastvora su prenete u odgovarajuće odmerne sudove (razblaženja su data u narednoj tabeli 4) koji su dopunjeni rastvaračem za uzorke do oznake. Rastvori su filtrirani kroz RC membranski filter 0,45 µm pre injektovanja u hromatografski sistem.

Tabela 4. Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti

Koncentracioni nivo	V (ml)	Rastvor	V suda	Koncentracija (µg/ml)
1,0 %	5,0	Osnovni rastvor	25	5,0
0,75 %	4,0	Osnovni rastvor	25	3,75
0,5 %	5,0	Osnovni rastvor	50	2,5
0,3 %	3,0	Osnovni rastvor	50	1,5
0,2%	2,0	Osnovni rastvor	50	1,0
0,1 %	2,0	Osnovni rastvor	20	0,5
0,05%	2,0	Osnovni rastvor	20	0,25

### 3.2.2 Tačnost metode

Rastvori za ispitivanje tačnosti su pripremljeni u četiri koncentraciona nivoa i svaki nivo je pripremljen u triplikatu. Za pripremu rastvora korišćeni su osnovni rastvor donepezil-hidrohlorida i osnovni rastvori odgovarajućih nečistoća. Osnovni rastvori su pripremljeni odmeravanjem 25,0 mg radnog standarda donepezil-hidrohlorida i po 25,0 mg referentnih standarda nečistoće A i nečistoće D odvojeno u tri odmerna suda od 100 ml. Ove supstance su rastvorene u mobilnoj fazi i istim rastvaračem odmerni sudovi su dopunjeni do oznake. 5,0 ml svakog od rastvora je preneto u odmerni sud od 50 ml koji je dopunjen do oznake rastvaračem za uzorke. U svaki od 12 odmernih sudova je preneto V ml (Tabela 5) odgovarajućih osnovnih rastvora donepezil-hidrohlorida i nečistoća koji su zatim dopunjeni rastvaračem za uzorke do oznake. Na ovaj način su pripremljeni rastvori donepezil-hidrohlorida u četiri različita koncentraciona nivoa (0,10, 0,15, 0,20 i 0,30%) svaki u triplikatu i rastvori nečistoća A i D u četiri različita koncentraciona nivoa (0,10, 0,30, 0,50 i 0,70 %) svaki u triplikatu. Dobijeni rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

Tabela 5. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti

Oznaka	Donepezil- hidrohlorigid V (ml)	Nečistoća A V(ml)	Nečistoća D V(ml)	Donepezil hidrohlorigid C (µg/ml)	Nečistoća A C (µg/ml)	Nečistoća D C (µg/ml)
T 1-1	2,0	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5
T 1-2	2,0	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5
T 1-3	2,0	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5
T 2-1	3,0	6,0	6,0	0,75	1,5	1,5
T 2-2	3,0	6,0	6,0	0,75	1,5	1,5
T 2-3	3,0	6,0	6,0	0,75	1,5	1,5
T 3-1	4,0	10,0	10,0	1,0	2,5	2,5
T 3-2	4,0	10,0	10,0	1,0	2,5	2,5
T 3-3	4,0	10,0	10,0	1,0	2,5	2,5
T 4-1	6,0	14,0	14,0	1,5	3,5	3,5
T 4-2	6,0	14,0	14,0	1,5	3,5	3,5
T 4-3	6,0	14,0	14,0	1,5	3,5	3,5

### 3.2.3 Preciznost metode

Rastvori za ispitivanje preciznosti metode su pripremljeni u šest odmernih suda od po 100 ml. U svaki od njih je preneto 4,0 ml osnovnog rastvora donepezil-hidrohlorida i po 10,0 ml osnovnog rastvora nečistoće A i osnovnog rastvora nečistoće D koji su korišćeni za ispitivanje tačnosti. Na ovaj način su pripremljeni rastvori donepezil-hidrohlorida u koncentracionim nivou 0,20 % i nečistoća A i D u koncentracionom nivou 0,50 % od koncentracije donepezil-hidrohlorida u test rastvoru.

### 3.2.4 Stabilnost rastvora

Za ispitivanja stabilnosti referentnog i test rastvora, rastvori su čuvani pod različitim uslovima (sobna temperatura izloženo i zaštićeno od svetlosti i u frižideru, zaštićeno od svetlosti), a rastvori su analizirani u odnosu na sveže pripremljen referentni rastvor.

### 3.2.5 Robustnost metode

Za ispitivanje robustnosti metode pripremljeni su fosfatni puferi različitih jonskih jačina, količine trietilamina i pH vrednosti:

- 1. fosfatni pufer pH 5,0, pripremljen je rastvaranjem 2,72 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 5,0 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $5,00 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 2. fosfatni pufer pH 4,8, pripremljen je rastvaranjem 2,52 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 4,8 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $4,80 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 3. fosfatni pufer pH 4,8, pripremljen je rastvaranjem 2,52 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 5,2 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $4,80 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.

- 4. fosfatni pufer pH 4,8, pripremljen je rastvaranjem 2,92 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 4,8 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $4,80 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 5. fosfatni pufer pH 4,8, pripremljen je rastvaranjem 2,92 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 5,2 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $4,80 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 6. fosfatni pufer pH 5,2, pripremljen je rastvaranjem 2,52 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 4,8 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $5,20 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 7. fosfatni pufer pH 5,2, pripremljen je rastvaranjem 2,52 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 5,2 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $5,20 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 8. fosfatni pufer pH 5,2, pripremljen je rastvaranjem 2,92 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 4,8 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $5,20 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.
- 9. fosfatni pufer pH 5,2, pripremljen je rastvaranjem 2,92 g kalijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode uz dodatak 5,2 ml trietilamina i podešavanjem pH vrednosti na  $5,20 \pm 0,05$  korišćenjem 20% rastvora fosforne kiseline.

Za ispitivanje robustnosti metode korišćen je test rastvor donepezil-hidrohlorida u koji je dodata količina nečistoća u nivou od oko 0,3% u odnosu na koncentraciju donepezil-hidrohlorida u test rastvoru. Ovaj rastvor je pripremljen odmeravanjem po 5,00 mg nečistoća u odmerni sud od 25 ml, nečistoće su rastvorene u mobilnoj fazi i istim rastvaračem odmerni sudovi su dopunjeni do oznake. 5,0 ml ovog rastvora je razblaženo mobilnom fazom do 50,0 ml. 6,0 ml ovog osnovnog rastvora je preneto u odmerni sud od 100 ml u kome je prethodno odmereno 25,0 mg donepezil-hidrohlorida i rastvoreno u mobilnoj fazi. Rastvori su filtrirani kroz 0,45  $\mu$ m RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata pre iniciranja u hromatografski sistem.

### **3.3 Postupci forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida**

#### **3.3.1 Priprema uzoraka donepezil-hidrohlorida za ispitivanje forsirane razgradnje tečnom hromatografijom (HPLC)**

##### ***3.3.1.1 Termička razgradnja donepezil-hidrohlorida***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida pod uticajem temperature je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Odmereno je 100 mg donepezil-hidrohlorida polaznog materijala i na aluminijskoj foliji je zagrevano 72 sata na temperaturi od 105 °C. Odmereno je 25 mg termički tretiranog donepezil-hidrohlorida, polaznog materijala, u odmerni sud od 50ml, dodato je oko 35 ml mobilne faze. Rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

##### ***3.3.1.2 Kisela hidroliza donepezil-hidrohlorida***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida u kiselim uslovima u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida polaznog materijala u odmerni sud od 50 ml, dodato je 5 ml 5 M HCl i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Nakon toga rastvor je neutralisan sa 5 ml 5 M NaOH. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

### **3.3.1.3 Alkalna hidroliza donepezil-hidrohlorida**

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida u alkalnim uslovima u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida polaznog materijala u odmerni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 5 M NaOH i rastvor je zagrevan 30 minuta na 80°C. Nakon toga rastvor je neutralisan sa 5 ml 5 M HCl. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

### **3.3.1.4 Oksidacija donepezil-hidrohlorida**

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida oksidativnim putem, korišćenjem vodonik-peroksida u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida polaznog materijala u odmerni sud od 50 ml, dodato je 5 ml 1,0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

### **3.3.1.5 Elektrohemijska razgradnja donepezil-hidrohlorida**

-Elektrohemijsko ispitivanje donepezil-hidrohlorida je vršeno tako što je pripremljen osnovni rastvor donepezil-hidrohlorida u dejonizovanoj vodi, a zatim je određena zapremina osnovnog rastvora donepezil-hidrohlorida dodata u elektrolit (fosfatni pufer pH 2,11). Elektrohemijska razgradnja donepezil-hidrohlorida ( $c=0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) je izvedena cikličnim ponavljanjem potencijala u

fosfatnom puferu pH=2,11 na elektrodi od zlata tokom različitih intervala vremena upotrebom aparature koja je opisana.

### **3.3.2 Priprema uzoraka komercijalnog proizvoda donepezil tableta za ispitivanje forsirane degradacije tečnom hromatografijom (HPLC)**

#### ***3.3.2.1 Termička razgradnja donepezil tableta***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida u tabletama pod uticajem temperature je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Deset donepezil-hidrohlord 10 mg film tableta su postavljene na aluminijumsku foliju i zagrevane 72 sata na temperaturi od 105°C. Pet donepezil-hidrohlord 10 mg film tableta, termički tretiranih, je preneto u odmerni sud od 100 ml, dodato je oko 70 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature, i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

#### ***3.3.2.2 Kisela hidroliza donepezil tableta***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida u tabletama u kiseljoj sredini u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Pet donepezil-hidrohlord 10 mg film tableta je preneto u odmerni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 5 M HCl i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Nakon toga rastvor je neutralisan sa 5 ml 5 M NaOH. Rastvor je zatim ohlađen do sobne temperature, dodato je 70 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.



### ***3.3.2.3 Bazna hidroliza donepezil tableta***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida u tabletama u alkalnoj sredini u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Pet donepezil-hidrohlord 10 mg film tableta je preneto u odmerni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 5 M NaOH i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Nakon toga rastvor je neutralisan sa 5 ml 5M HCl. Rastvor je zatim ohlađen do sobne temperature, dodato je 70 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

### ***3.3.2.4 Oksidacija donepezil tableta***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida oksidativnim putem, korišćenjem vodonik peroksida u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Pet donepezil-hidrohlord 10 mg film tableta je preneto u odmerni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 1,0% rastvora vodonik-peroksida i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Rastvor je zatim ohlađen do sobne temperature, dodato je 70 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

### **3.3.3 Priprema uzoraka za ispitivanje forsirane degradacije tečnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (HPLC/MS)**

#### ***3.3.3.1 Termička razgradnja donepezil-hidrohlorida***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida pod uticajem temperature je izvedeno sledećim eksperimentom:

- Odmereno je 100 mg donepezil-hidrohlorida polaznog materijala i na aluminijumskoj foliji je zagrevano 72 sata na temperaturi od 105°C. Odmereno je 25 mg termički tretiranog donepezil-hidrohlorida polaznog materijala u odmerni sud od 50 ml, dodato je oko 35 ml mobilne faze. Rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

#### ***3.3.3.2 Alkalna hidroliza donepezil-hidrohlorida***

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida u alkalnim uslovima u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentima:

*Prvi eksperiment:*

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida, polaznog materijala, u odmerni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 5 M NaOH i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Nakon toga rastvor je neutralisan sa 5 ml 5 M HCl. Rastvor je zatim ohlađen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

*Drugi eksperiment:*

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida, polaznog materijala, u odmerni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 5 M NaOH i rastvor je zagrevan 8 h uz refluks. Nakon toga rastvor je neutralisan sa 5 ml 5 M HCl. Rastvor je zatim ohlađen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

**3.3.3.3 Oksidacija donepezil-hidrohlorida**

Ispitivanje razgradnje donepezil-hidrohlorida oksidativnim putem, korišćenjem vodonik-peroksida u rastvoru je izvedeno sledećim eksperimentima:

*Prvi eksperiment:*

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida, polaznog materijala, u odmerni sud od 50 ml, dodato je 5 ml 3,0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i rastvor je zagrevan 60 minuta na 80°C. Rastvor je zatim ohladjen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

*Drugi eksperiment:*

- Odmereno je 25 mg donepezil-hidrohlorida, polaznog materijala, u odmerni sud od 50 ml, dodato je 5ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i rastvor je zagrevan 8 h uz refluks. Rastvor je zatim ohlađen do sobne temperature, dodato je 25 ml mobilne faze i rastvor je mućkan 15 minuta i ultrazvučno tretiran sa povremenim mućkanjem u trajanju od 15 minuta. Rastvor je ohlađen do sobne temperature i odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Rastvori su filtrirani kroz 0,45 µm RC membranski filter uz odbacivanje prvih 2 ml filtrata.

### **3.3.4 Priprema uzoraka donepezil-hidrohlorida za elektrohemijska ispitivanja cikličnom voltametrijom i voltametrijom sa pravougaonim impulsima**

Elektrohemijsko ponašanje donepezil-hidrohlorida je ispitivano tako što je pripremljen osnovni rastvor donepezil-hidrohlorida u dejonizovanoj vodi, a zatim su određene zapremine osnovnog rastvora dodata u elektrolit ( $100 \text{ ml } 0,05 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaHCO}_3$  ili fosfatni pufer pH 3) da bi se dobili rastvori koncentracija u opsegu  $29,1 - 65,4 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### **3.4 Aparati i uređaji**

3.4.1 Potenciostat RDE 4, PINE, XY pisač PM 8134, Philips, korišćen za cikličnu voltametriju

3.4.2 Gamry potenciostat (Reference 600), softver PV 220, korišćen za voltametriju sa pravougaonim impulsima

3.4.3 Autolab potenciostat/galvanostat (Metrohm, ECO Chemie, The Netherlands) korišćen za voltametriju sa pravougaonim impulsima

3.4.4 HPLC instrument Agilent 1100 Series (binary pump, degasser, thermostated autosampler, diode array detector) softver Opnelab Ezchrom edition

3.4.5 HPLC instrument Agilent 1100 Series (degasser, autosampler, diode array detector) kuplovan sa 6210 Time-of-Flight LC/MS detektorom (Agilent), softver MassHunter Workstation, korišćen za LC/MS analize

3.4.6 Analitička vaga Sartorius CPA225D (Sartorius Goettingen, Germany)

3.4.7 pH metar (Radiometer Copenhagen PHM220)

3.4.8 Ultrazvučno kupatilo (Sonorex Digitec DT 1028 F)

3.4.9 Milli-Q sistem za prečišćavanje vode 18 M $\Omega$

3.4.10 Membranski filteri od regenerisane celuloze 0,45 $\mu$ m (Sartorius Goettingen, Germany)

3.4.11 Mehanička mešalica (IKA HS 501 Horizontal Shaker)

## **3.5 Metode**

### **3.5.1 Ciklična voltametrijia**

Oprema koja je korišćena za cikličnu voltametriju je potenciostat RDE 4 Pine, XY pisač PM 8134 Philips i elektrohemijaska ćelija koja se sastoji od staklene posude i tri elektrode. U eksperimentima je korišćena komercijalna Tacusell staklena ćelija. Polikristalna elektroda od zlata je korišćena kao radna elektroda (Pine rotating disc, površine 0,5cm<sup>2</sup>), žica od zlata kao pomoćna elektroda i zasićena kalomelova elektroda (SCE, saturated calomel electrode) kao referentna elektroda. Svi potencijali su dati prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi (vs.SCE). Pre dodavanja ispitivanih rastvora lekova elektrolit je degaziran provođenjem azota. Svi eksperimenti su izvedeni na sobnoj temperaturi.

### **3.5.2 Voltametrijia sa pravougaonim impulsima (SWV)**

Za metodu voltametrije sa pravougaonim impulsima (SWV) je korišćen Autolab i Gamry potenciostat i elektrohemijaska ćelija koja se sastoji od staklene posude i tri elektrode, kao što je navedeno kod metode ciklične voltametrije.

### **3.5.3 Tečna hromatografija**

#### **3.5.3.1 RP-HPLC metoda za određivanje srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida**

##### **3.5.3.1.1 Aparatura i hromatografski uslovi**

Hromatografski uslovi pod kojima su ispitivani proizvodi razgradnje u uzorcima donepezil-hidrohlorida u sirovini, komercijalnom proizvodu i elektrolitu tokom praćenja elektrohemijaskog ponašanja donepezil-hidrohlorida:

HPLC analize su rađene na Agilent Technologies 1100 Series HPLC Sistemu (Santa Clara, CA) koji je opremljen sa odeljkom za kolonu sa temperaturnom kontrolom, autosamplerom sa mogućnošću hlađenja, DAD UV-Vis detektorom i on-line

degazerom mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje je ostvareno korišćenjem Wakosil 5 C-18 RS (5,0  $\mu\text{m}$  particle size, 250  $\times$  4,6 mm id) hromatografske kolone izokratskom metodom sa mobilnom fazom koja predstavlja smešu fosfatnog pufera pH 5,0 i metanola u odnosu 57:43 uz temperaturu kolone od 25°C i protok mobilne faze od 1,0 ml/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski na 230 nm uz korišćenje diode array detektora. Injekciona zapremina je iznosila 20  $\mu\text{l}$ . Snimanje hromatogramskih podataka i njihova analiza vršena je korišćenjem EZChrom Elite hromatografskog softvera.

Fosfatni pufer pH 5,0 je pripremljen na sledeći način: 2,72 g kalijum dihidrogen fosfata je rastvoreno u 900 ml vode i dodato je 5,0 ml trietilamina. pH rastvora je podešena na vrednost 5,0  $\pm$ 0,05 korišćenjem 20% vodenog rastvora fosforne kiseline i dopunjeno do 1000 ml vodom.

### **3.5.4 LC-MS metoda za određivanje srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida**

#### **3.5.4.1 Aparatura i hromatografski uslovi**

Hromatografski uslovi pod kojima su ispitivani proizvodi razgradnje u uzorcima donepezil-hidrohlorida LC-MS tehnikom:

LC-MS analize su rađene na Agilent Technologies 1200 Series HPLC Sistemu (Santa Clara, CA) koji je opremljen sa odeljkom za kolonu sa temperaturnom kontrolom, autosamplerom sa mogućnošću hlađenja, DAD UV-Vis detektorom kuplovanim sa 6210 Time-of Flight LC/MS sistemom i on-line degazerom mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje je ostvareno korišćenjem Wakosil 5 C-18 RS (5,0  $\mu\text{m}$  particle size, 250  $\times$  4,6 mm id) hromatografske kolone izokratskom metodom sa mobilnom fazom koja predstavlja smešu 2,3 g/L amonijum acetatnog pufera pH 5,0 i metanola u odnosu 57:43 uz temperaturu kolone od 25°C i protok mobilne faze od 1,0 ml/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski na 230 nm uz korišćenje diode array detektora kuplovanim sa 6210 Time-of Flight LC/MS sistemom. Injekciona zapremina je iznosila 20  $\mu\text{l}$ . Za akviziciju i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation. Pozitivno naelektrisani joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na

atmosferskom pritisku: eluirana jedinjenja su mešana sa azotom u zagrejanom interfejsu, a polarnost je podešena na pozitivnu, sa sledećim vrednostima ESI parametara: potencijal kapilare 4,0 kV; temperatura gasa 350 °C; protok gasa za sušenje 12 L/min; pritisak nebulajzera 310,26 Pa; napon fragmentora 70 V. Maseni spektri su sakupljeni u m/z oblasti od 100-1500.

Amonijum acetatni pufer pH 5,0 je pripremljen na sledeći način: 2,3 g amonijum acetata je rastvoreno u 900 ml vode. pH rastvora je podešena na vrednost 5,0 ±0,05 korišćenjem razblaženog rastvora acetatne kiseline i dopunjeno do 1000 ml vodom.

### **3.5.5 HPLC semi-preparativna tečna hromatografija**

#### **3.5.5.1 Aparatura i hromatografski uslovi**

Hromatografski uslovi pod kojima je vršeno izdvajanje nepoznatog jedinjenja iz uzorka koji je dobijen elektrohemijском razgradnjom:

HPLC semi-preparativno izdvajanje nepoznatog jedinjenja je urađeno na Agilent Technologies 1100 Series HPLC Sistemu (Santa Clara, CA) koji je opremljen sa odeljkom za kolonu sa temperaturnom kontrolom, autosamplerom sa mogućnošću hlađenja, DAD UV-Vis detektorom i on-line degazerom mobilne faze. Hromatografsko razdvajanje je ostvareno korišćenjem Zorbax XDB C-18 RS (5,0 µm particle size, 250 × 9,4 mm id) semi-preparativne hromatografske kolone gradijentnom metodom sa mobilnom fazom koja predstavlja smešu mobilne faze A i mobilne faze B u odnosu po gradijentnom programu. Sastav mobilne faze ovog gradijentnog sistema je dat u tabeli 6, pri čemu je:

-Mobilna faza A pripremljena na sledeći način: 2 mL mravlje kiseline je rastvoreno u 900 ml vode. pH rastvora je podešena na vrednost 5,0 ±0,05 korišćenjem razblaženog rastvora amonijum-hidroksida i dopunjeno do 1000 ml vodom.

-Mobilna faza B: Acetonitril

Temperatura kolone je iznosila 30°C i protok mobilne faze je iznosio 4,0 ml/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski na 240 nm uz korišćenje diode array detektora.



Injekciona zapremina je iznosila 800  $\mu$ l. Snimanje hromatogramskih podataka i njihova analiza vršena je korišćenjem EZChrom Elite hromatografskog softvera.

Tabela 6. Režim eluiranja (gradijent sistem) optimizovan za razdvajanje

Vreme (min)	Gradijent A (%)	Gradijent B (%)
0	90	10
18	60	40
18,1	30	70
21	30	70
21,1	90	10
24	90	10

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Validacija metode

Validacija metode je izvedena u skladu sa ICH preporukama [37, 38]. Validacijom je potvrđena specifičnost, linearnost, tačnost, ponovljivost i preciznost, limiti detekcije i kvantifikacije, stabilnost korišćenih referentnih i test rastvora i robusnost metode za sve relevantne nečistoće donepezil-hidrohlorida.

#### 4.1.1 Linearnost

Linearnost metode je potvrđena iniciranjem standardnih rastvora u osam koncentraciona nivoa, u koncentracionom opsegu od 0,05% - 1,0% za donepezil-hidrohlrid, nečistoću A i nečistoću D. Evaluacija linearnosti metode je izvršena linearnom regresionom analizom, na osnovu metode najmanjih kvadrata. Za linearnu zavisnost površine pikova u funkciji koncentracije svake od supstanci linearnom regresionom analizom su izračunati statistički parametri: nagib prave, odsečak, rezidualna standardna devijacija i korelacioni koeficijent. Dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 7.

Tabela 7. Parametri linearne regresije:  $y = ax+b$ ; x je koncentracija supstance ( $\mu\text{g/ml}$ ), y je površina pika (mAU), R je korelacioni koeficijent; RSD je rezidualna standardna devijacija ( $S\Delta y/y$ , n-2). RRF vrednosti - odnos nagiba prave posmatrane nečistoće i donepezil-hidrohlrida.

	R	Jednačina prave $y = b + ax$	Nagib mAU ml / $\mu\text{g}$	Odsečak (mAU)	RSD (%)	RRF (/)
Donp.	0,99992	$y = 1,458 + 47,891x$	47,891	1,458	1,18	1,00 $\pm$ 0,0
Neč A	1,00000	$y = 0,502 + 64,774x$	64,774	0,502	0,18	0,65 $\pm$ 0,0
Neč D	0,99994	$y = -0,793 + 48,971x$	48,971	-0,793	1,02	0,96 $\pm$ 0,0

Za seriju standardnih rastvora donepezil-hidrohlorida i njegovih nečistoća u različitim koncentracijama nivoima je pokazana linearnost u ispitivanom koncentracionom opsegu. Korelacioni koeficijent (R) je u svim slučajevima bio veći od 0,999.

#### 4.1.2 Limiti detekcije i kvantifikacije.

Za određivanje limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) svake od ispitivanih supstanci pripreman je standardni rastvor sa ispitivanim supstancama u nivou od 0,05% od koncentracije donepezil-hidrohlorida u test rastvoru (0,25 µg/ml). LOD i LOQ vrednosti su izračunate na osnovu odnosa signala (visine pika) i šuma bazne linije na hromatogramu. LOD i LOQ vrednosti odgovaraju koncentraciji supstanci koji daje signal 3, odnosno 10 puta viši od nivoa šuma, tabela 8.

Tabela 8. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ)

Komponenta	C (µg/ml)	s/n	LOQ (µg/ml)	LOD (µg/ml)
Donepezil hidrohlorid	0,245	20	0,1225	0,037
Neč A	0,245	93	0,0265	0,064
Neč D	0,235	11	0,2135	0,064

#### 4.1.3 Preciznost metode

Preciznost metode je ispitana analizom šest rastvora u kojima su dodate količine nečistoća u nivou od 0,5% (oko 2,5 µg/ml) i donepezil-hidrohlorida u nivou od 0,2% (oko 1,0 µg/ml) u odnosu na koncentraciju donepezil-hidrohlorida u test rastvoru. Rezultati, srednje vrednosti i izračunate relativne standardne devijacije date su tabeli 9.

Tabela 9. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

C( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Nečistoća A	Donepezil hidrohlorid	Nečistoća D
1	2,495	0,915	2,640
2	2,490	0,910	2,600
3	2,495	0,955	2,570
4	2,500	0,955	2,590
5	2,515	0,900	2,625
6	2,495	0,950	2,600
Av.	2,498	0,931	2,604
RSD%	0,35	2,71	0,96

#### 4.1.4 Tačnost metode

Tačnost metode je utvrđena kroz procenat prinosa (recovery) za poznatu dodatnu količinu supstance. Procenat prinosa su određeni na osnovu analize uzoraka u četiri koncentraciona nivoa (0,10, 0,15, 0,20 i 0,30% za donepezil-hidrohlorid i 0,10, 0,30, 0,50 i 0,70% za nečistoću A i D) koji su pripremljeni svaki u triplikatu. Dobile vrednosti procenta prinosa (recovery), srednje vrednosti i odgovarajuće relativne standardne devijacije date su u tabelama 10-12.

Tabela 10. Rezultati ispitivanja tačnosti metode za donepezil-hidrohlorid

		Donepezil- hidrohlorid dodata količina c (µg/ml)	Donepezil- hidrohlorid određena količina c (µg/ml)	Donepezil- hidrohlorid prinos (%)
Nivo 0,10%	1	0,4915	0,5047	102,69
	2	0,4915	0,4867	99,02
	3	0,4915	0,4883	99,35
	Srednja vrednost		0,4932	100,35
	%RSD			2,02
Nivo 0,15%	1	0,7372	0,7629	103,49
	2	0,7372	0,7501	101,75
	3	0,7372	0,7172	97,29
	Srednja vrednost		0,7434	100,84
	%RSD			3,17
Nivo 0,2%	1	0,983	0,993	101,02
	2	0,983	0,9612	97,78
	3	0,983	0,9675	98,42
	Srednja vrednost		0,9739	99,07
	%RSD			1,73
Nivo 0,3%	1	1,4745	1,4639	99,28
	2	1,4745	1,4504	98,37
	3	1,4745	1,4636	99,26
	Srednja vrednost		1,4593	98,97
	%RSD			0,53

Tabela 11. Rezultati ispitivanja tačnosti metode za nečistoću A

		Nečistoća A dodata količina c (µg/ml)	Nečistoća A određena količina c (µg/ml)	Nečistoća A prinos (%)	
Nivo 0,10%	1	0,485	0,4881	100,64	
	2	0,485	0,483	99,59	
	3	0,485	0,4918	101,40	
	Srednja vrednost			0,4876	100,54
	%RSD				0,91
	<hr/>				
Nivo 0,30%	1	1,4549	1,4388	98,89	
	2	1,4549	1,4439	99,24	
	3	1,4549	1,4288	98,21	
	Srednja vrednost			1,4372	98,78
	%RSD				0,53
	<hr/>				
Nivo 0,50%	1	2,4249	2,3719	97,81	
	2	2,4249	2,3852	98,36	
	3	2,4249	2,4342	100,38	
	Srednja vrednost			2,3971	98,85
	%RSD				1,37
	<hr/>				
Nivo 0,70%	1	3,3948	3,3369	98,29	
	2	3,3948	3,357	98,89	
	3	3,3948	3,3777	99,50	
	Srednja vrednost			3,3572	98,89
	%RSD				0,61

Tabela 12. Rezultati ispitivanja tačnosti metode za nečistoću D

		Nečistoća D dodata količina c (µg/ml)	Nečistoća D određena količina c (µg/ml)	Nečistoća D prinos (%)
Nivo 0,10%	1	0,4652	0,4734	101,76
	2	0,4652	0,4561	98,04
	3	0,4652	0,4504	96,82
	Srednja vrednost		0,4600	98,88
	%RSD			2,60
Nivo 0,30%	1	1,3958	1,414	101,30
	2	1,3958	1,3642	97,74
	3	1,396	1,3841	99,15
	Srednja vrednost		1,3874	99,40
	%RSD			1,81
Nivo 0,50%	1	2,3263	2,2747	97,78
	2	2,3263	2,3265	100,01
	3	2,3263	2,354	101,19
	Srednja vrednost		2,3184	99,66
	%RSD			1,74
Nivo 0,70%	1	3,2568	3,2542	99,92
	2	3,2568	3,2636	100,21
	3	3,2568	3,3291	102,22
	Srednja vrednost		3,2823	100,78
	%RSD			1,24

#### 4.1.5 Stabilnost rastvora

Referentni rastvor je čuvan pod različitim uslovima (sobna temperatura i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti). Test rastvor je čuvan pod različitim uslovima (sobna temperatura i u frižideru, izloženo i zaštićeno od svetlosti) i u svakom od test rastvora urađena je kvantifikacija prisutnih nečistoća donepezil-hidrohlorida. Pošto je koncentracija donepezil-hidrohlorida i prisutnih nečistoća u  $\pm 10\%$  od početne koncentracije pri svim uslovima čuvanja, referentni i test rastvor su stabilni najmanje dva dana (Tabela 13 i 14).

Tabela 13. Stabilnost referentnog rastvora pri različitim uslovima čuvanja

Vreme čuvanja	Uslovi čuvanja	Zaštićeno od svetlosti		Izloženo svetlosti
		+4°C	+22°C	+22°C
Sveže pripremljen	Površina pika	/	/	48,212
	%	/	/	100,0
1 dan	Površina pika	48,124	48,259	48,381
	%	99,8	100,1	100,4
2 dana	Površina pika	48,932	49,057	48,758
	%	101,5	101,7	101,1

Tabela 14. Stabilnost test rastvora pri različitim uslovima čuvanja

Vreme čuvanja	Sveža priprema	Zaštićeno od svetlosti +4°C		Zaštićeno od svetlosti +22°C		Izloženo svetlosti +22°C	
		1 dan	2 dana	1 dan	2 dana	1 dan	2 dana
Nečistoća A	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Nečistoća D	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Nepoznate nečistoće	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%



#### 4.1.6 Robusnost metode

Robusnost analitičke metode predstavlja indeks pouzdanosti metode u toku njene upotrebe i opisuje se kao sposobnost metode da u slučaju malih namernih promena njenih parametara, analitička metoda ostane nepromenjena u svojoj validnosti. Za ispitivanje robusnosti metode, praćen je uticaj promene sledećih parametara metode: talasna dužina, temperatura, protok, pH pufera, količina kalijum dihidrogen fosfata u puferu, količina trietilamina u puferu i procentni udeo organskog dela u mobilnoj fazi na odgovor hromatografskog sistema. Za statističku analizu korišćen je Plackett-Burman eksperimentalni dizajn N=12 u softveru *STATGRAPHICS®Plus Version 5.1*. Variranjem eksperimentalnih faktora, praćen je odgovor hromatografskog sistema, tabela 15. U eksperimentalnom dizajnu uvedena su i tri dodatna „dummy“, imaginarna faktora koji se takođe variraju, ali nemaju nikakvo fizičko značenje. Za praćene odgovora hromatografskog sistema korišćen je test rastvor donepezil-hidrohlorida u koji su dodate količine nečistoća u nivou od 0,3%. Rezultati su dati u tabeli 16.

Za statistički analizu eksperimentalnih podataka korišćen je „Pareto Chart“ u *STATGRAPHICS®Plus* softveru. U tabeli 17 su dati rezultati statističke analize značajnih uticaja promene ispitivnih hromatografskih parametara na odgovore hromatografskog sistema.

Tabela 15. Plackett-Burman eksperimentalni dizajn N=12 za ispitivanje robustnosti metode.

	$\lambda$ [nm]	Temp [°C]	Protok [ml/min]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [g]	pH [l]	TEA [g]	Pufer [%]	Dummy 1 [l]	Dummy 2 [l]	Dummy 3 [l]
Exp 1	230	25	1.0	2.72	5.0	5.0	57.0	0	0	0
Exp 2	232	23	1.1	2.52	4.8	5.2	56.0	1	1	-1
Exp 3	232	27	0.9	2.52	5.2	4.8	56.0	1	1	1
Exp 4	228	27	1.1	2.52	4.8	4.8	58.0	-1	1	1
Exp 5	232	23	1.1	2.92	5.2	4.8	56.0	-1	-1	1
Exp 6	232	27	0.9	2.52	5.2	5.2	58.0	-1	-1	-1
Exp 7	232	27	1.1	2.92	4.8	4.8	58.0	1	-1	-1
Exp 8	228	27	1.1	2.92	5.2	5.2	56.0	-1	1	-1
Exp 9	228	23	1.1	2.52	5.2	5.2	58.0	1	-1	1
Exp 10	228	23	0.9	2.92	5.2	4.8	58.0	1	1	-1
Exp 11	232	23	0.9	2.92	4.8	5.2	58.0	-1	1	1
Exp 12	228	27	0.9	2.92	4.8	5.2	56.0	1	-1	1
Exp 13	228	23	0.9	2.52	4.8	4.8	56.0	-1	-1	-1
Exp 14	230	25	1.0	2.72	5.0	5.0	57.0	0	0	0

Tabela 16. Odgovori hromatografskog sistema, vrednosti za vrednosti parametara rezolucije između hromatografskih pikova i odgovarajuća retenciona vremena.

	Rt DNP neč. A [min]	Rt DNP neč. B (min)	Rt DNP (min)	Rt DNP neč. C (min)	Rt DNP neč. D (min)	Rt DNP neč. E (min)	$R_{AB}$	$R_{BD}$	$R_{DC}$	$R_{CD}$	$R_{DE}$
Exp 1	5,083	11,502	21,249	27,361	40,691	51,101	20,1	13,6	6,0	9,9	6,1
Exp 2	4,299	9,577	15,366	18,399	29,872	35,000	19,0	9,9	4,0	11,2	3,9
Exp 3	5,344	11,586	24,627	36,355	39,310	62,603	19,9	19,3	10,4	2,0	12,6
Exp 4	4,761	10,915	19,443	23,466	39,204	45,695	20,3	11,9	4,1	12,4	4,1
Exp 5	4,625	10,057	21,950	31,901	36,208	55,821	18,2	17,2	9,0	3,0	10,8
Exp 6	5,976	13,396	29,818	42,304	52,378	75,965	20,8	18,7	9,0	5,2	9,9
Exp 7	4,781	10,846	20,733	26,348	40,156	49,963	20,0	14,1	5,7	10,4	5,7
Exp 8	4,607	9,495	19,895	27,684	32,840	49,742	17,4	15,6	7,6	4,0	10,2
Exp 9	5,135	11,693	26,137	36,291	48,046	66,090	19,7	16,8	7,7	6,4	7,8
Exp 10	6,352	14,179	34,211	49,459	59,174	88,806	20,0	19,0	9,2	4,6	10,7
Exp 11	6,086	14,188	25,208	28,528	52,310	57,983	21,4	12,3	2,9	15,0	2,8
Exp 12	5,801	13,295	22,904	26,179	46,312	52,640	21,6	12,2	3,1	14,1	3,6
Exp 13	5,440	12,242	20,021	23,908	39,815	46,121	20,2	10,4	4,0	12,8	4,0
Exp 14	5,156	11,483	21,647	27,609	41,235	52,074	19,9	13,7	5,7	10,0	6,3

Rt DNP Neč. A, Rt DNP Neč. B, Rt DNP, Rt DNP Neč. C, Rt DNP Neč. D and Rt DNP Neč. E su retenciona vremena nečistoće A, nečistoće B, nečistoće C, nečistoće D i nečistoće E;  $R_{AB}$  je rezolucija između nečistoće A i B;  $R_{BD}$  je rezolucija između nečistoće B i Donepezila;  $R_{DC}$  je rezolucija između donepezila i nečistoće C;  $R_{CD}$  je rezolucija između nečistoće C i D;  $R_{DE}$  je rezolucija između nečistoće D i E.

Tabela 17. Statistički značajni efekti (pozitivni ili negativni) ispitivanih hromatografskih parametara na odgovore hromatografskog sistema.

	Rt Neč. A (min)	Rt Neč. B (min)	Rt DNP (min)	Rt Neč. C (min)	Rt Neč. D (min)	Rt Neč. E (min)	R <sub>AB</sub>	R <sub>BD</sub>	R <sub>DC</sub>	R <sub>CD</sub>	R <sub>DE</sub>
Tal. dužina	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Temp.	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Protok	Negativni	Negativni	Negativni	Negativni	Negativni	Negativni	Negativni	Ne	Ne	Ne	Ne
pH	Ne	Ne	Pozitivni	Pozitivni	Ne	Pozitivni	Negativni	Pozitivni	Pozitivni	Negativni	Pozitivni
Pufer (%)	Pozitivni	Pozitivni	Pozitivni	Pozitivni	Pozitivni	Pozitivni	Pozitivni	Ne	Ne	Ne	Ne
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
TEA	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Dummy 1	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Dummy 2	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Dummy 3	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Rt DNP Neč. A, Rt DNP Neč. B, Rt DNP, Rt DNP Neč. C, Rt DNP Neč. D and Rt DNP Neč. E su retenciona vremena nečistoće A, nečistoće B, nečistoće C, nečistoće D i nečistoće E; R<sub>AB</sub> je rezolucija između nečistoće A i B; R<sub>BD</sub> je rezolucija između nečistoće B i Donepezila; R<sub>DC</sub> je rezolucija između donepezila i nečistoće C; R<sub>CD</sub> je rezolucija između nečistoće C i D; R<sub>DE</sub> je rezolucija između nečistoće D i E.

## **4.2 Ispitivanje proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida i komercijalnog proizvoda donepezil tableta pri različitim uslovima forsirane razgradnje primenom tečne hromatografije**

Studija forsirane razgradnje izvedena je u cilju ispitivanja stabilnosti donepezil-hidrohlorida tj. prepoznavanja mogućih puteva razgradnje leka i identifikacije potencijalnih proizvoda razgradnje, kao i u cilju potvrđivanja specifičnosti korišćene hromatografske metode. Rezultati “peak purity” testa u svim analiziranim uzorcima dobijenih u studiji forsirane razgradnje su pokazali da je hromatografski pik donepezila spektrofotometrijski čist i razdvojen od njegovih proizvoda razgradnje, što je potvrdilo da je HPLC metoda “stability indicating” i kao takva se može primeniti za rutinsku kontrolu kvaliteta leka i praćenja njegove stabilnosti u roku trajanja. Zadovoljavajuće vrednosti za čistoću pika donepezil-hidrohlorida ukazuju na postojanje homogenog pika, bez koeluirajućih pikova, čime je uspostavljen dokaz za potpunu selektivnost metode (rezultati prikazani u tabeli 18). Rezolucija između pikova, koji potiču od nečistoća i proizvoda razgradnje, je bila veća od 1,5 čime je potvrđena selektivnost metode za datu upotrebu. Rezultati forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida i komercijalnog proizvoda donepezil 10 mg film tableta su predstavljeni na hromatogramima (Slike 34 - 41). Pikovi koji nisu integraljeni su poreklom iz korišćenih reagenasa.

Tabela 18. Načini forsirane razgradnje, stepen postignute razgradnje donepezila i čistoća glavnog pika na hromatogramu.

Kontrolni uzorak (bez tretiranja)		Čistoća pika „Peak purity“		
		Vrednost	Donji prag vrednosti	
		1.0000	0.9999	
<b>USLOVI RAZGRADNJE</b>				
Uzorak	Uslovi reakcije	% razgradnje	Čistoća pika „Peak purity“ Vrednost	Donji prag vrednosti
<b>Donepezil HCl</b>				
Kisela razgradnja	5ml 5M HCl/80°C/60min	0,11	1,0000	0,9999
Bazna razgradnja	5ml 5M NaOH/80°C/60min	0,80	1,0000	0,9999
Oksidacija	5ml 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /80°C/60min	1,56	1,0000	0,9999
Termička razgradnja	105 °C/72 h	0,75	1,0000	0,9999
<b>Donepezil tablete</b>				
Kisela razgradnja	5ml 5M HCl/80°C/60min	0,74	1,0000	0,9999
Bazna razgradnja	5ml 5M NaOH/80°C/60min	1,38	1,0000	0,9999
Oksidacija	5ml 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /80°C/60min	3,35	1,0000	0,9999
Termička razgradnja	105 °C/72 h	0,57	1,0000	0,9999

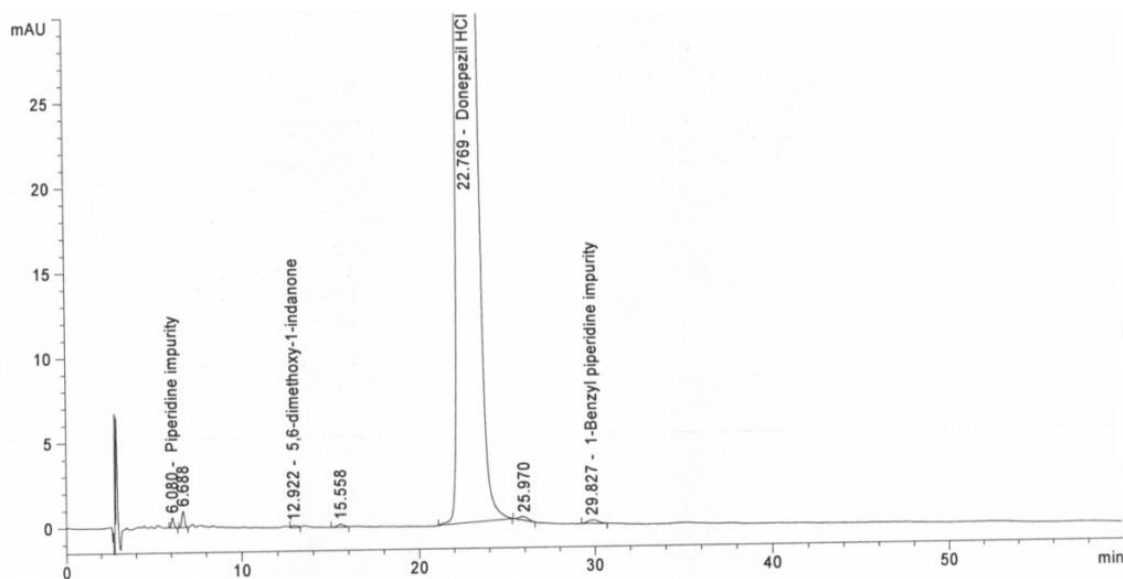
Detekcija proizvoda razgradnje iz studija forsirane razgradnje aktivne supstance donepezil-hidrohlorida i komercijalnog proizvoda donepezil hidrohlorid 10mg film tableta je izvedena korišćenjem visokoeфикаsne tečne hromatografije i ukupni efekti forsirane razgradnje su predstavljeni u tabeli 19.

Tabela 19. Analiza glavnih produkta razgradnje komercijalnog proizvoda tableta donepezil-hidrohlorida i aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (API)

Glavni produkti forsirane razgradnje komercijalnog proizvoda tableta donepezil-hidrohlorida i aktivne supstance donepezil hidrohlorida (%)															
	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT
	0,21	0,22	0,23	0,26	0,28	0,30	0,38	0,41	0,44	0,49	0,57	0,64	0,69	1,17	1,71
Termička razgradnja API	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,11	/	0,15	/	/
Termička razgradnja tableta	/	/	/	0,16	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,17
Kisela hidroliza API	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Kisela hidroliza tableta	/	/	/	/	0,17	/	1,8	/	/	/	/	/	/	/	/
Bazna hidroliza API	/	/	/	/	/	0,39	0,22	0,10	/	/	/	/	/	/	/
Bazna hidroliza tableta	/	/	/	/	1,3	/	1,5	1,0	/	/	/	/	/	/	/
2M NaOH uz refluks 8h API	/	/	/	/	0,28	0,57	1,27	9,5	/	/	/	/	/	2,6	2,9
Oksidacija API	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1,46
Oksidacija tableta	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3,3
6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uz refluks API	2,3	1,25	12,2	/	4,75	/	/	/	2,0	/	/	1,60	/	/	64,8

U preliminarnim eksperimentima, ispitivanje forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida je sprovedeno u uslovima hidrolitičke razgradnje, kisele i bazne hidrolize, hemijske oksidacije i termičke razgradnje u cilju postizanja totalne razgradnje donepezil-hidrohlorida.

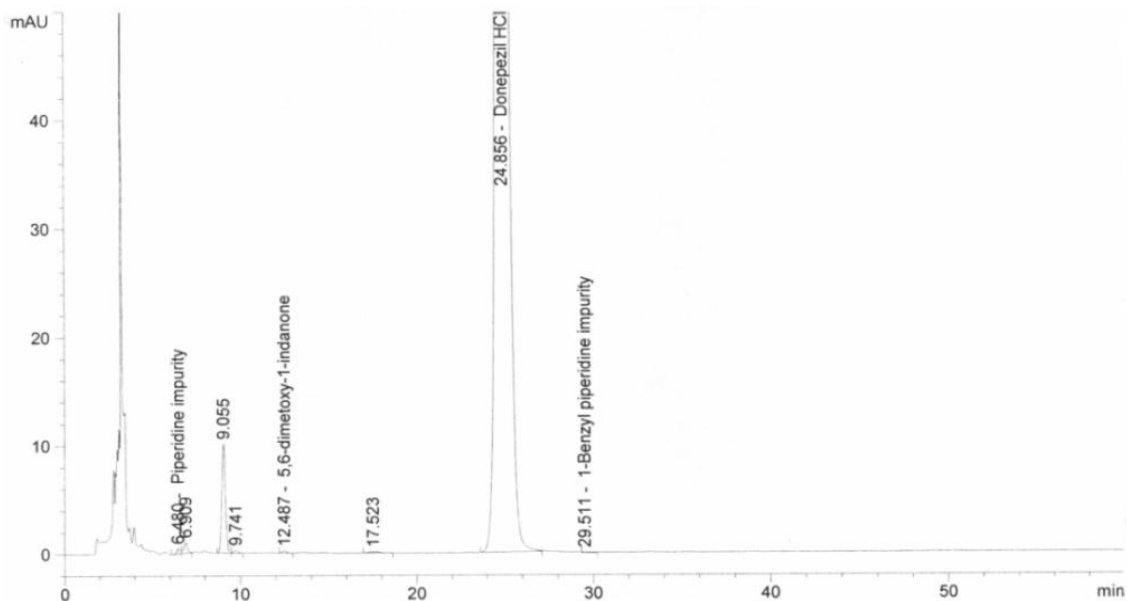
Rezultati ispitivanja hidrolitičke razgradnje u kiselim uslovima 5 mol/L rastvoru HCl na temperaturi od 80°C tokom 1 h su pokazali da je donepezil-hidrohlid stabilan pod primenjenim uslovima ispitivanja. U primenjenim uslovima kisele hidrolize nije bila postignuta značajna razgradnja (manje od 1% razgradnje) donepezila i donepezil tableta. Na hromatogramu uzorka donepezila koji je podvrgnut kiseljoj hidrolizi nije došlo do značajne promene površine pika donepezila, niti su detektovani dodatni hromatografski pikovi. Zanimljiva razgradnja donepezil-hidrohlorida i donepezil-hidrohlorida u komercijalnom uzorku donepezil tableta je dobijena u kiseljoj sredini i jedino kod uzorka donepezil tableta su detektovana dva proizvoda razgradnje u vrlo niskom nivou koncentracije.



Slika 34. Hromatogram uzorka dobijenim kiselom hidrolizom aktivne supstance donepezil- hidrohlorida (5 mol/L rastvor HCl na temperaturi od 80°C tokom 1 h)

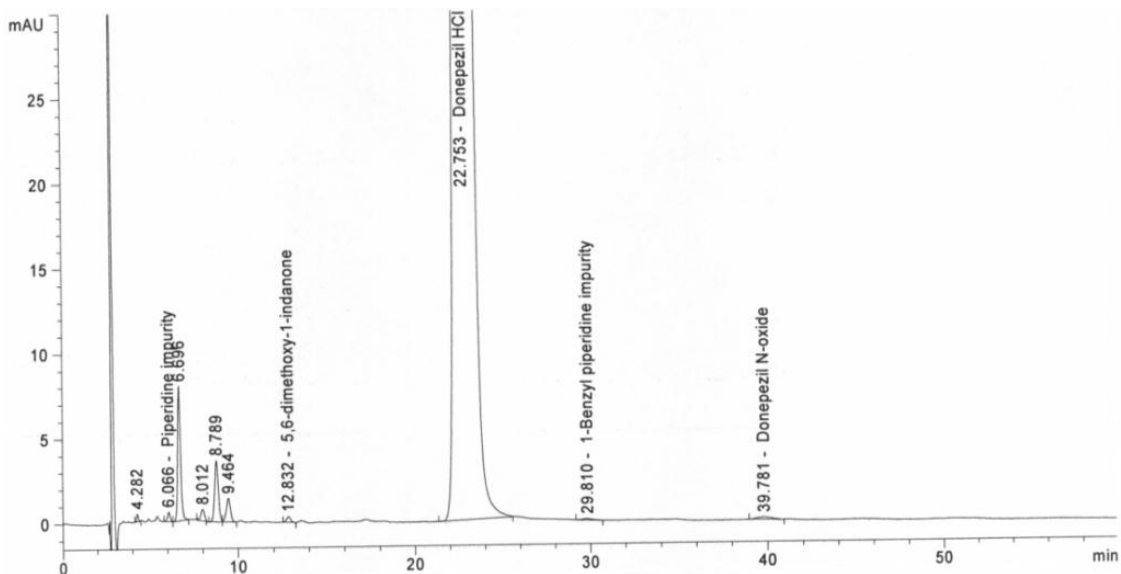
Značajna razgradnja donepezil-hidrohlorida i donepezil-hidrohlorida u komercijalnom proizvodu je dobijena u uslovima alkalne hidrolize i pod uticajem vodonik-peroksida.



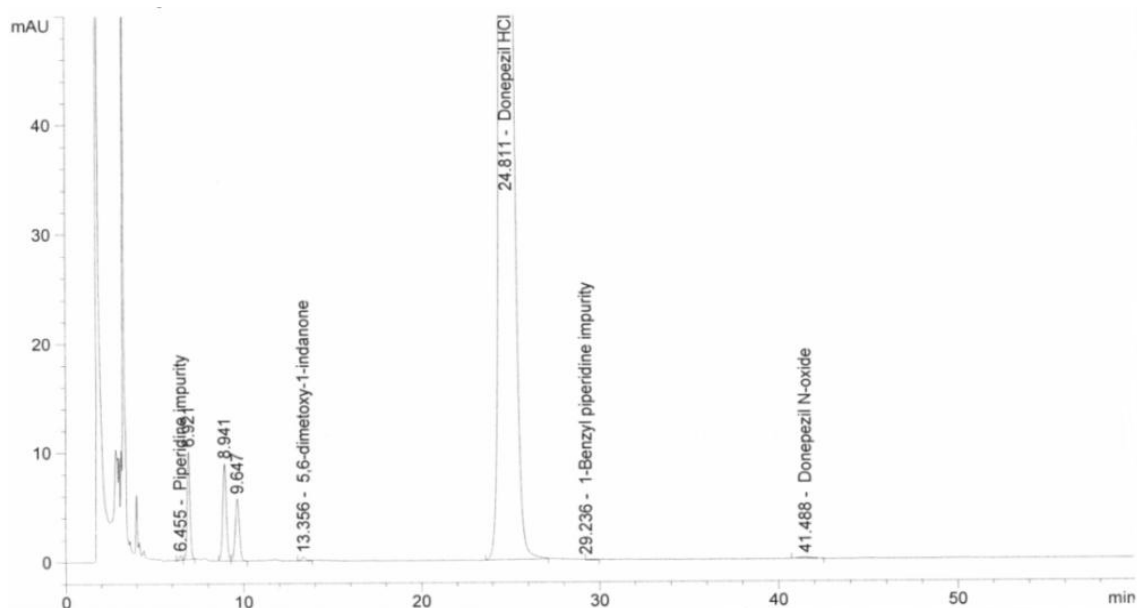


Slika 35. Hromatogram uzorka dobijenim kiselim hidrolizom tableta donepezil-hidrohlorida (5 mol/L rastvor HCl na temperaturi od 80°C tokom 1 h)

Rezultati ispitivanja hidrolitičke razgradnje u alkalnim uslovima u 1 mol/L rastvoru NaOH na sobnoj temperaturi tokom 8 h su pokazali da je donepezil-hidrohlorid stabilan u primenjenim uslovima ispitivanja. Međutim razgradnja je postignuta primenom drastičnijih uslova razgradnje. Pokazano je da do razgradnje donepezila dolazi u alkalnoj sredini u 5 mol/L rastvoru NaOH na temperaturi od 80°C tokom 0,5 h. U ovim uslovima došlo je do razgradnje donepezil-hidrohlorida u nivou od 1% do 1.5% i do pojave nekoliko proizvoda razgradnje na hromatogramu ispitivanog uzorka.

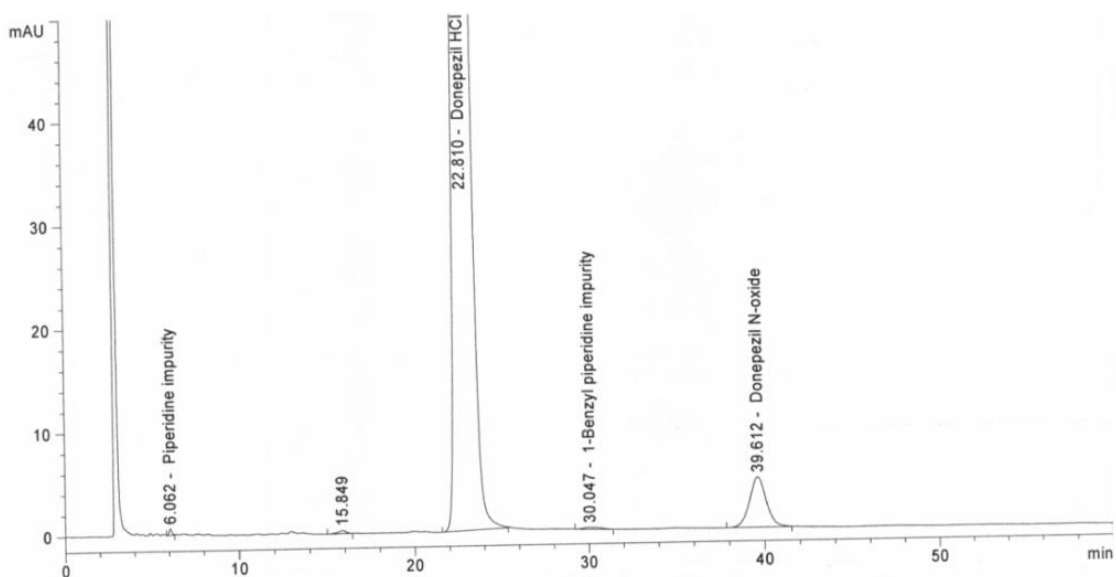


Slika 36. Hromatogram uzorka dobijenim alkalnom hidrolizom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (5 mol/L rastvor NaOH na temperaturi od 80°C tokom 0,5 h)

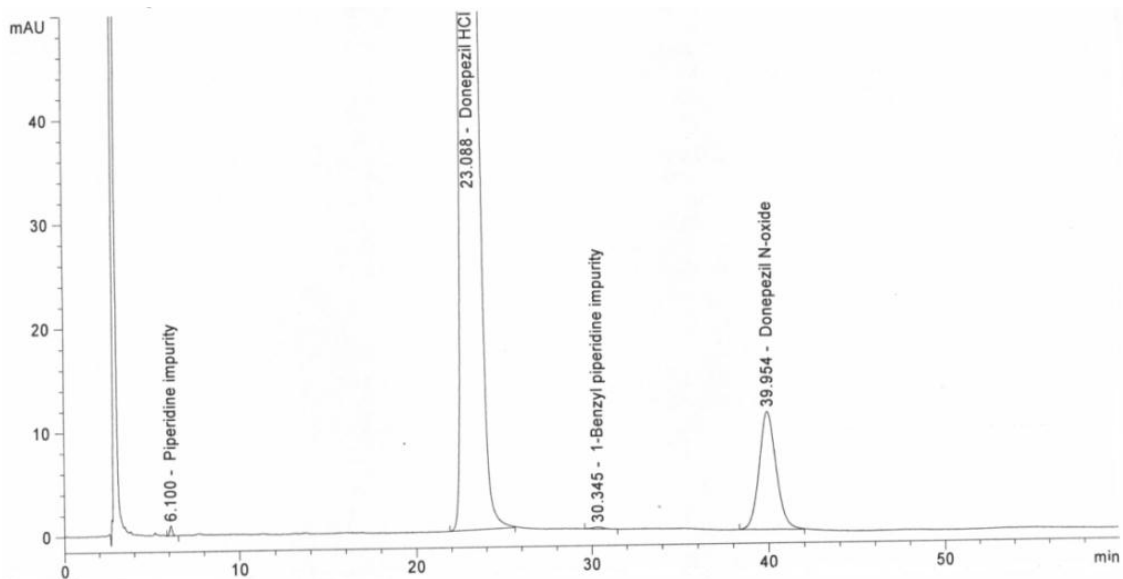


Slika 37. Hromatgram uzorka dobijenim alkalnom hidrolizom tableta donepezil-hidrohlorida (5 mol/L rastvor NaOH na temperaturi od 80 °C tokom 0,5 h)

Sprovedenim ispitivanjima je pokazano da donepezil-hidrohlid podleže razgradnji u prisustvu oksidacionog sredstva u 3% rastvoru vodonik-peroksida. Donepezil se pokazao vrlo osjetljivim u uslovima oksidativne razgradnje u prisustvu vodonik-peroksida. U ispitivanjima razgradnje donepezil-hidrohlorida i donepezil tableta u 3% rastvoru vodonik-peroksida na temperaturi od 80°C dobijeno je oko 1,5% i 3,5% razgradnje.

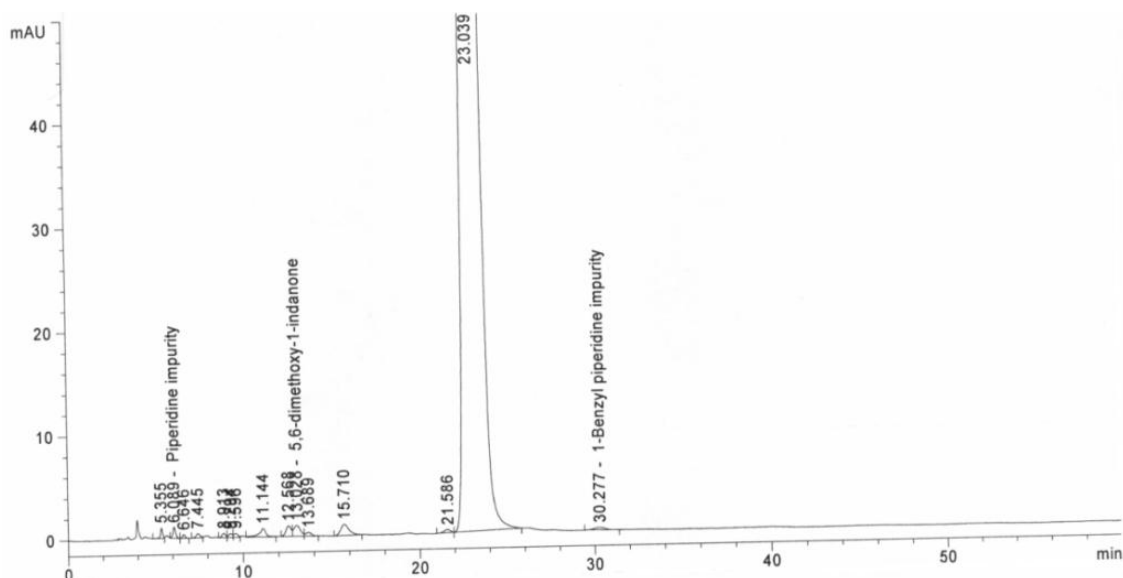


Slika 38. Hromatgram uzorka dobijenim oksidacionom razgradnjom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (3% rastvor vodonik-peroksida na temperaturi od 80°C tokom 0,5 h)

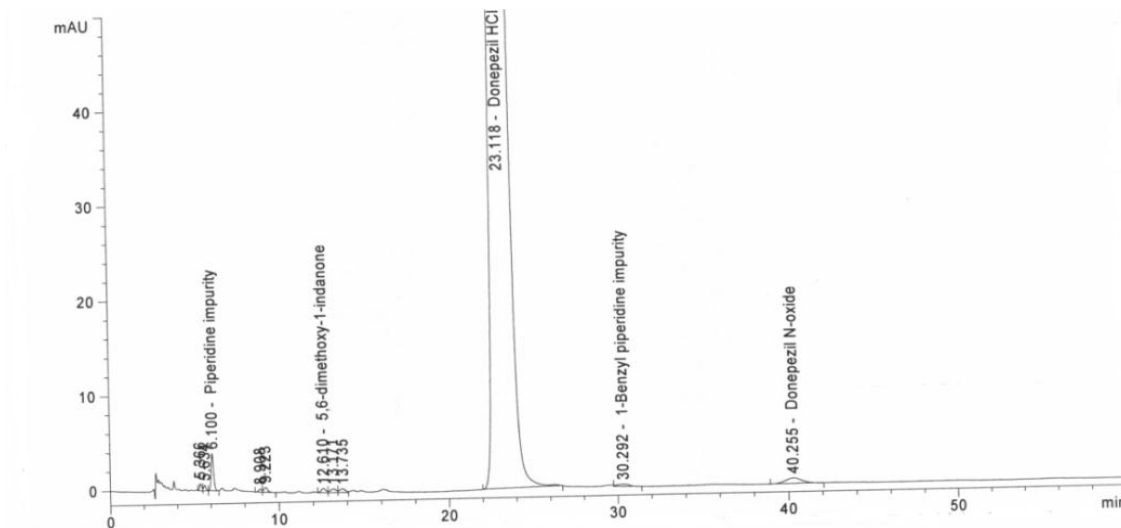


Slika 39. Hromatogram uzorka dobijenim oksidacionom razgradnjom tableta donepezil-hidrohlorida (3% rastvor vodonik-peroksida na temperaturi od 80°C tokom 0,5 h)

Termička razgradnja donepezil-hidrohlorida je ispitivana na temperaturi od 105°C u trajanju od 72 h (Slika 40). Rezultati ispitivanja termičke razgradnje donepezila su pokazali da je donepezil stabilan u primenjenim uslovima i da je dobijen vrlo nizak stepen razgradnje molekula. Na hromatogramu donepezil-hidrohlorida i donepezil tableta su detektovani višestruki proizvodi razgradnje u vrlo niskim koncentracijama. Procenat razgradnje donepezila u ovim uzorcima je bio oko 1%.



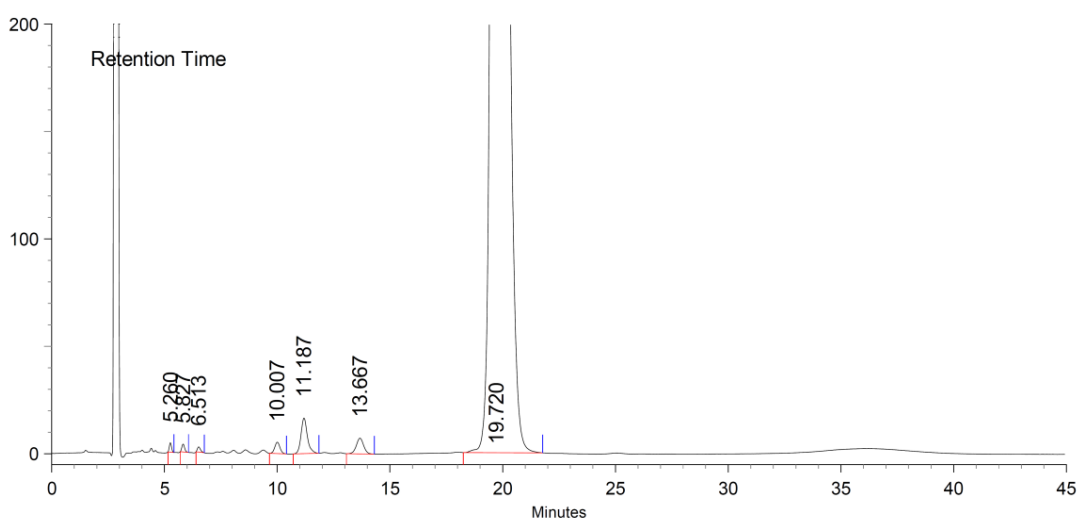
Slika 40. Hromatogram uzorka dobijenim termičkom razgradnjom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (105°C u trajanju od 72 h)



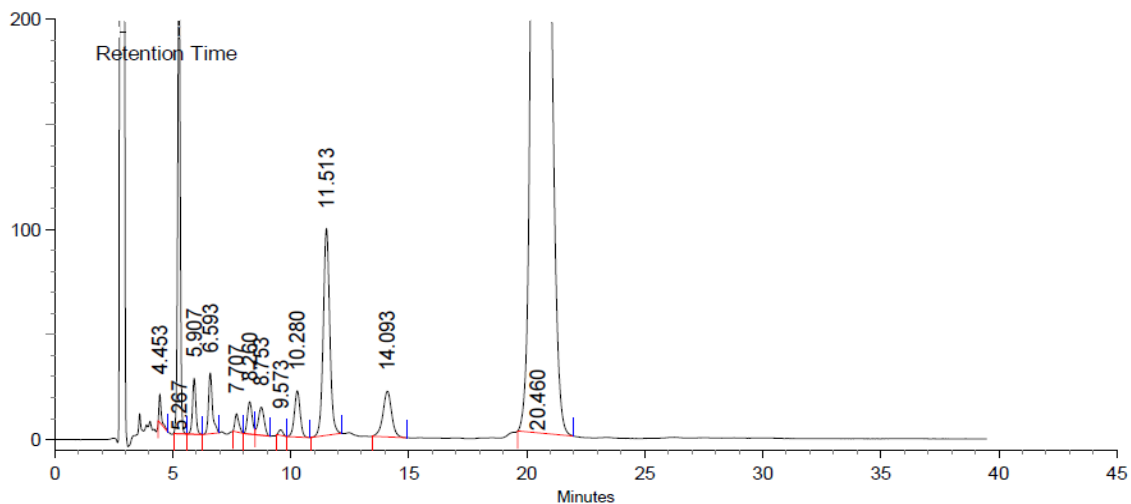
Slika 41. Hromatogram uzorka dobijenim termičkom razgradnjom tableta donepezil-hidrohlorida (105°C u trajanju od 72 h)

#### 4.2.1 Elektrohemijska razgradnja aktivne supstance donepezil-hidrohlorida

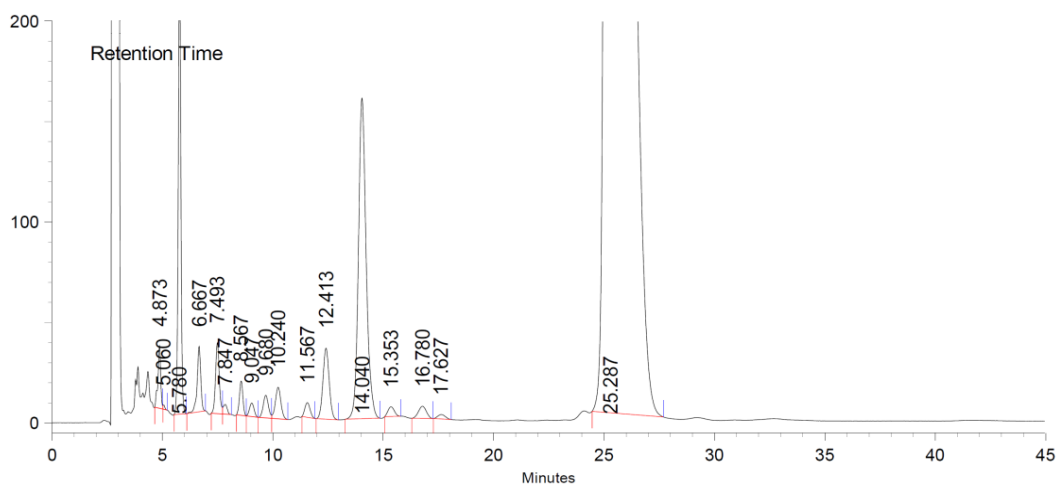
Elektrohemijska razgradnja donepezil-hidrohlorida ( $c=0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) je izvedena cikličnim ponavljanjem potencijala u fosfatnom puferu  $\text{pH}=2,11$  na elektrodi od zlata tokom različitih intervala vremena u elektrohemskoj ćeliji sa radnom elektrodom od zlata. Rezultati elektrohemijske razgradnje donepezil-hidrohlorida su predstavljeni na hromatogramima (Slike 42 - 44).



Slika 42. Hromatogram uzorka dobijenim elektrohemijskim tretiranjem aktivne supstance donepezil-hidrohlorida u trajanju od 14 h 98,58%



Slika 43. Hromatogram uzorka dobijenim elektrohemijским tretiranjem aktivne supstance donepezil-hidrohlorida u trajanju od 110 h (87,67%)



Slika 44. Hromatogram uzorka dobijenim elektrohemijским tretiranjem aktivne supstance donepezil-hidrohlorida u trajanju od 144 h

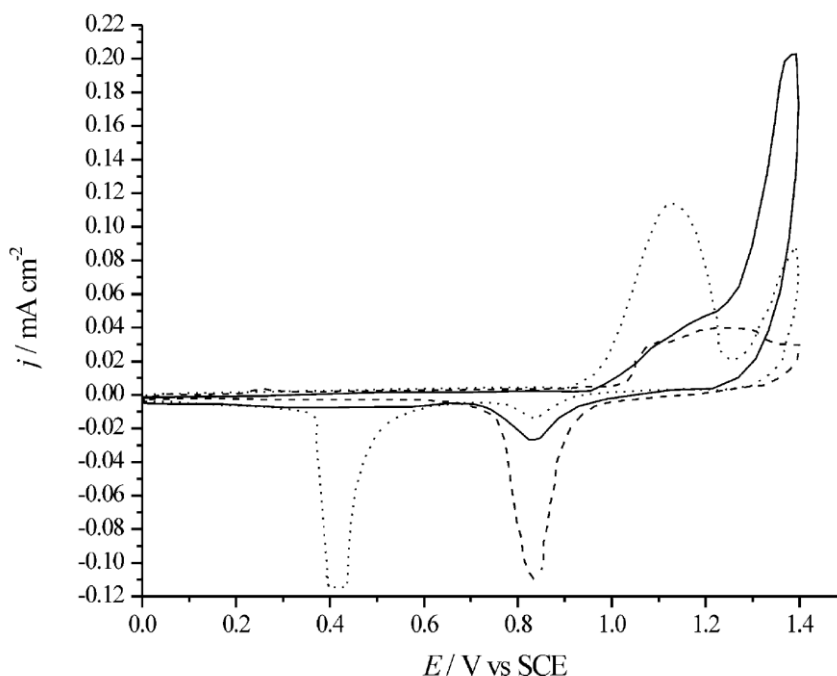
Rezultati ispitivanja elektrohemijske razgradnje donepezil-hidrohlorida su pokazali da dolazi do primetne razgradnje donepezil-hidrohlorida u posmatranom elektrolitu. Detekcija proizvoda razgradnje iz elektrohemijske razgradnje je izvedena korišćenjem visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) i rezultati razgradnje i dobijeni nepoznati proizvodi razgradnje (imenovani na osnovu relativnih retencionih vremena zadržavanja) su predstavljani u tabeli 20.

Tabela 20. Analiza glavnih produkta elektrohemijske razgradnje donepezil-hidrohlorida

Glavni produkti elektrohemijske razgradnje API donepezil-hidrohlorida (%)				
Način razgradnje	RRT 0.21	RRT 0.22	RRT 0.23	RRT 0.26
Elektrohemijska razgradnja 14h	/	0.18	0.70	0.36
Elektrohemijska razgradnja 110h	3.65	0.79	4.0	1.19
Elektrohemijska razgradnja 144h	2.0	0.75	4.2	0.36

### 4.3 Ciklična voltametrija i elektrohemijska oksidacija donepezila na elektrodi od zlata

Praćenje elektrohemijskog ponašanja donepezil-hidrohlorida je izvršeno prvo pomoću ciklične voltametrije (CV) na elektrodi od zlata [110]. Kao elektrolit je korišćen fosfatni pufer. Promena koncentracije donepezil-hidrohlorida u elektrolitu je simultano praćena metodom tečne hromatografije (HPLC). Cikličnom voltametrijom je definisano elektrohemijsko ponašanje i aktivnost donepezil-hidrohlorida, a zatim je pod definisanim uslovima cikliziranje produženo u trajanju od više časova. Nastali glavni proizvod razgradnje u toku CV eksperimenta je izdvojen korišćenjem preparativne HPLC i izvršena je njegoa potpuna strukturna karakterizacija masenom spektrometrijom (MS) i NMR spektroskopijom.



Slika 45. Ciklični voltamogram elektrode od zlata (isprekidana linija) i u prisustvu donepezil-hidrohlorida ( $50 \text{ mg } 100 \text{ cm}^{-3}$ ) u fosfatnom puferu pH 3 pre (tačkasta linija) i nakon kontinualnog cikliziranja potencijala (puna linija). Sweep rate  $50 \text{ mVs}^{-1}$ .

Na slici 45 je prikazan ciklični voltamogram aktivne supstance donepezil-hidroklorida koji u prvom sweep-u pokazuje reakciju oksidacije leka na vrednostima potencijala od 0,9 V do 1,25 V sa maksimalnim vrednostima struje na potencijalima od 1,15 V i 1,4 V.

Prva anodna reakcija se pojavljuje pre potencijala formiranja oksida na elektrodi od zlata sa maksimalnim vrednostima struja u opsegu potencijala formiranja oksida, ukazujući na to da formiranje oksida zlata favorizuje reakciju oksidacije donepezila. U katodnom pravcu, katodna reakcija se pojavljuje na potencijalu od 0,4 V (tačkasta linija).

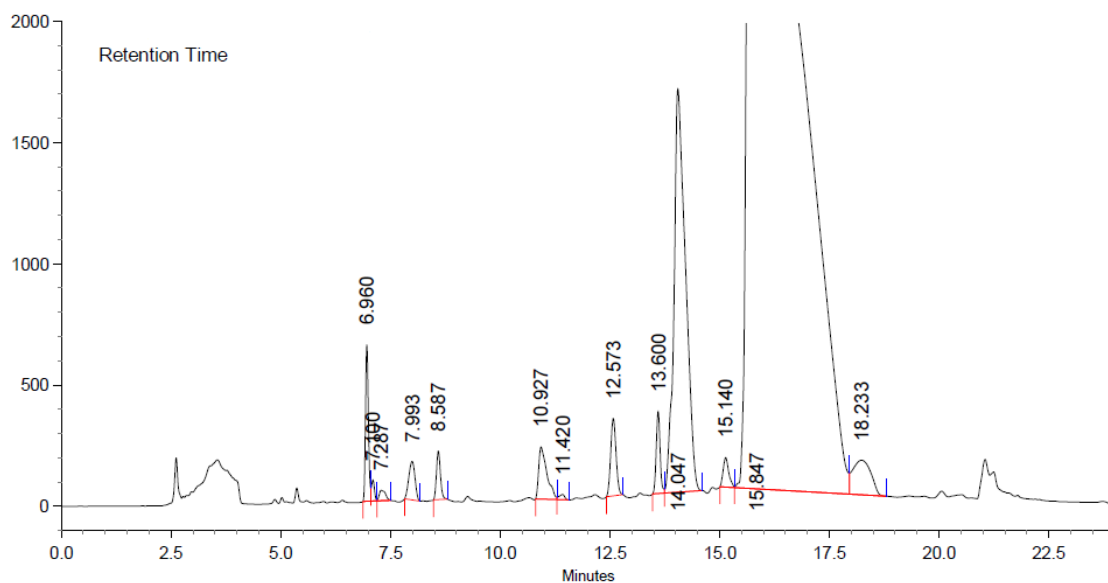
Posle nekoliko ciklusa promene potencijala struje prve anodne reakcije opadaju, a pojavljuje se nova anodna reakcija na potencijalu od 1,25 V sa maksimalnom vrednošću struje na potencijalu od 1,4 V. Strujni pik katodne reakcije opada ukazujući na to da je katodna reakcija nezavisna od anodnih procesa (tačkasta linija).

U toku viščasovnog cikliziranja potencijala simultano je vršena analiza elektrolita nakon elektrohemijskih reakcija koristeći HPLC. HPLC analizom je detektovano nekoliko proizvoda razgradnje. Glavni proizvod razgradnje u ovom ispitivanju je eluirao na retencionom vremenu 11,187 min. Iz ovog uzorka elektrolita je korišćenjem jednostavne semi-preparativne HPLC metode vršeno izdvajanje nepoznatog proizvoda elektrohemijske razgradnje. Frakcije nepoznatog proizvoda razgradnje iz hromatografskog sistema su sakupljanje, a zatim koncentrovane na sobnoj temperaturi u vakuum sušnici. HPLC čistoća izolovanog proizvoda razgradnje je bila 99,0 %, pre izvođenja spektroskopskih i spektrometrijskih merenja.

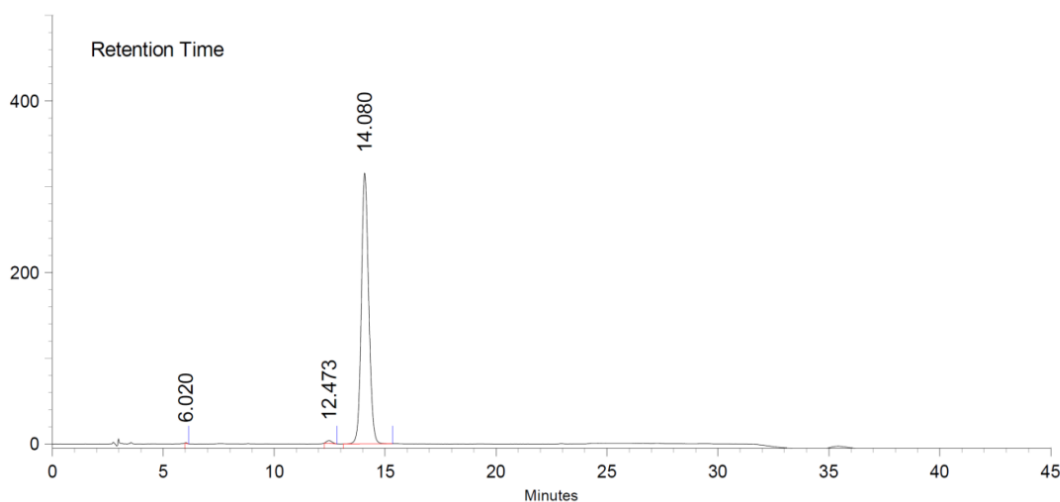
#### **4.3.1 Izdvajanje glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje primenom semi-preparativne HPLC**

Za izdvajanje nepoznatog jedinjenja nastalog elektrohemijском razgradnjom korišćen je jednostavni reverzno fazni sistem sa gradijentnim programom kao što je dato u sekciji 3.5 metode. Da bi povećali količinu nepoznatog proizvoda razgradnje donepezila u uzorku elektrolita, uzorak je podvrgnut kontinualnom cikliziranju potencijala pod eksperimentalnim uslovima prikazanim na slici 36 u elektrohemijскоj ćeliji u trajanju od 96 h. U ovoj semi-preparativnoj hromatografskoj analizi pik nepoznatog jedinjenja (glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje) označenog kao

RRT 0,57 (na osnovu relativnog retencionog vremena) je eluirao u vremenu od oko 14,0 min (Slika 46). Frakcije ovog jedinjenja su sakupljane i sakupljena frakcija je koncentrovana na sobnoj temperaturi u visokom vakuumu. Čistoća nepoznatog jedinjenja RRT 0,57 je testirana HPLC analitičkom metodom datom u sekciji 3.5 metode. Dobijena hromatografska čistoća nepoznatog jedinjenja je bila 99.0%, i ilustrovana je hromatogramom na slici 47, pre izvođenja spektroskopske karakterizacije strukture nepoznatog jedinjenja korišćenjem ESI-LC-TOF analize i NMR spektroskopije.



Slika 46. Hromatogram semi preparativne HPLC korišćene za izdvajanje nečistoće RRT 0,57 ( $R_t=14,047\text{min}$ ) iz uzorka dobijenim elektrohemijском razgradnjom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida



Slika 47. Hromatogram izolovane nepoznate nečistoće RRT 0,57 iz uzorka, pre izvođenja spektroskopskih analiza



### 4.3.2 Strukturna karakterizacija nepoznatog proizvoda elektrohemijske razgradnje

Za strukturnu karakterizaciju nepoznatog proizvoda koji je nastao elektrohemijском razgradnjom korišćena je masena spektrofotometrija visoke rezolucije (HRMS) i 1 D i 2 D NMR spektroskopija. Molekulska formula je izvedena na osnovu merenja masenom spektrofotometrijom visoke rezolucije.

MS spektri nepoznatog proizvoda elektrohemijske razgradnje su snimljeni korišćenjem HPLC ESI – TOF/MS LC-MS sistema u pozitivnom i negativnom modu jonizacije. Na MS spektrima su detektovani prekursorski joni sa  $m/z$  vrednostima 396,3169  $[M+H]^+$  u pozitivnom modu i  $m/z$  430,1791  $[M+Cl]^-$  i 440,2079  $[M+HCOO]^-$  u negativnom modu, ukazujući da je molekulska formula jedinjenja  $C_{24}H_{29}NO_4$ . Razlika između molarnih masa nepoznatog jedinjenja i donepezila je ukazala na prisutnost hidroksi grupe u nepoznatom jedinjenju.

Struktura nepoznatog jedinjenja je određena korišćenjem 1 D i 2 D NMR spektroskopije. Dobijeni  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektri nepoznatog jedinjenja su slični dobijenim spektrima za donepezil što je ukazalo da jedinjenje ima vrlo sličnu strukturu. Na osnovu analize spektralnih podataka dobijenih iz NMR analize može se uočiti razlika između strukture glavnog proizvoda razgradnje i donepezila. Na  $^{13}C$  NMR spektru nepoznatog jedinjenja je uočen signal na 75,0 ppm koji je zbog uticaja atoma kiseonika iz hidroksidne grupe pomeren ka manjim vrednostima jačine polja u odnosu na signal datog C atoma na  $^{13}C$  NMR spektru donepezila. Takođe na  $^1H$  NMR spektru nepoznatog jedinjenja se uočava dublet ( $\delta = 4,90$  J = 3 Hz) koji potiče od protona koji je vezan za C atom koji je spregnut sa atomom kiseonika iz hidroksidne grupe koja je vezana za ovaj C atom. Ovaj signal nije prisutan na  $^1H$  NMR spektru donepezila. Asignacija  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR signala je urađena uz pomoć snimljenih HSQC, HMBC, TOCSY i NOESY 2D NMR spektara. Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru, dok su signali neprotonovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru. Hemijska pomeranja asigniranih  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR signala prikazana su u tabeli 21. Na osnovu NMR analize struktura nepoznatog proizvoda razgradnje je okarakterisana kao 2-[(1-benzilpiperidin-4-il)(hidroksi)metil]-5,6-dimetoksiindan-1-on (Slika 62). Ovo jedinjenje se u literaturturnim podacima pominje kao intermedijer u različitim procesima sinteze

donepezila [111, 112], a vršena su i ispitivanja njegove aktivnosti u inhibiciji acetilholinesteraza [113].

Ilustrativni  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  TOCSY, NOESY, HSQC i HMBC NMR spektri donepezila i npoznatog jedinjenja prikazani su na slikama 48-61 u prilogu.

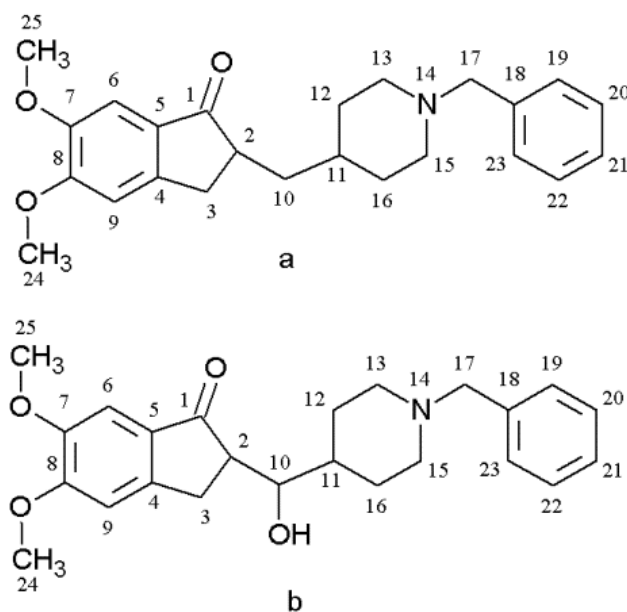
Tabela 21. Uporedna  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR asignacija za donepezil i proizvod elektrohemijske razgradnje

Položaj	Donepezil-hidrohlorid			Glavni proizvod razgradnje		
	$^1\text{H}$	J (ppm)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	J (ppm)	$^{13}\text{C}$
1	-	-	206,8	-	-	203,3
2	1H	2,66 (m)	44,2	1H	2,59 (m)	55,1
3	2H	2,65 (m)	33,7	Ha	1,99 (m)	35,4
				Hb	1,54 (m)	
4	-	-	148,5	-	-	149,4
5	-	-	128,7	-	-	128,4
6	1H	7,11 (s)	104,1	1H	7,09 (s)	103,4
7	-	-	149,3	-	-	150,8
8	-	-	155,5	-	-	156,0
9	1H	6,86 (s)	107,2	1H	7,13 (s)	106,5
10	Ha	1,91 (m)	37,8	1H	4,90 d (3,0 Hz)	75,0
	Hb	1,49 (m)				
11	1H	1,94 (m)	32,0	1H	1,97 (m)	32,3
12 i 16	4H	2,05 (m)	29,1	4H	1,95 (m)	29,1
		1,85 (m)	28,5		1,80 (m)	
13 i 15	4H	3,50 (m)	52,2	4H	3,35 d (11,4 Hz)	52,1
		2,79 (m)	52,1		2,63 (m)	
14	-	-	-	-	-	-
17	2H	4,03 (s)	60,6	2H	4,03 (s)	60,8
18	-	-	128,1	-	-	130,4
19 i 23	2H	7,67 (m)	131,4	2H	7,44 (m)	130,9
20 i 22	2H	7,43 (m)	129,8	2H	7,39 (m)	129,4
21	1H	7,43 (m)	129,0	1H	7,39 (m)	129,1
24	3H	3,96 (s)	56,1	3H	3,97 (s)	56,4
25	3H	3,89 (s)	55,9	3H	3,90 (s)	56,2

### 4.3.3 Analiza mehanizma nastajanja hidroksi derivata donepezila u elektrohemijskoj reakciji

Golcu i Ozkan [43] u istraživanju elektrohemijske aktivnosti donepezila na elektrodi od ugljenika su naveli dve anodne reakcije. Oni su pretpostavili da je prva glavna anodna reakcija posledica oksidacije atoma azota na piperidinskom prstenu molekula donepezila, dok je druga anodna reakcija posledica oksidacija metoksibenzen grupe.

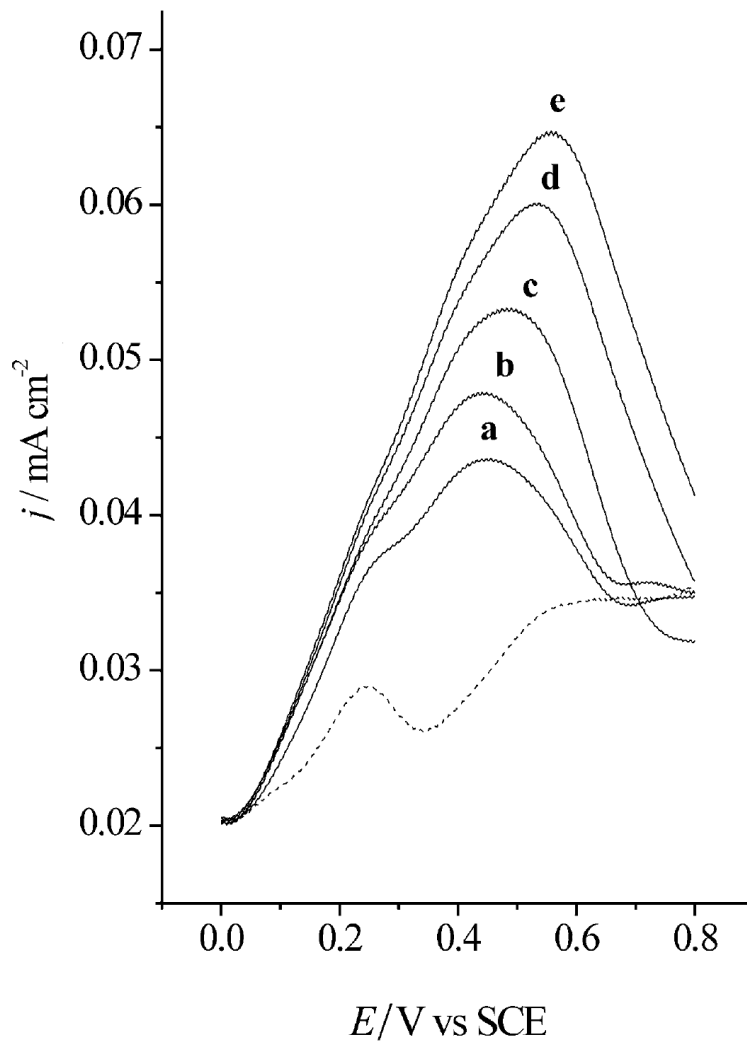
U ispitivanju elektrohemijske aktivnosti donepezila na elektrodi od zlata, takođe je uočena pojava dve anodne reakcije. Prva glavna anodna reakcija sa maksimumom vrednosti struje na potencijalu od 1,15 V se može pripisati oksidaciji atoma azota, dok se druga anodna reakcija sa mnogo manjim vrednostima struja na potencijalu od 1,4 V može pripisati oksidaciji metoksibenzen grupe što je u saglasnosti sa rezultatima datim u [43]. Takođe na osnovu literaturnih podataka oksidacija alkana u alkohol na elektrodi od platine [43] se odvija preko mehanizma formiranja sekundarnog karbonijum jona u prisustvu kiseline, nakon čega karbonijum jon reaguje sa rastvaračem, vodom, gradeći alkohol. Na osnovu ovog mehanizma, može se pretpostaviti da se sličnim mehanizmom reakcije na elektrodi od zlata pod datim uslovima reakcije (kiselina, voda) vrši oksidacija donepezila koja dovodi do formiranja glavnog proizvoda oksidacije (Slika 62).



Slika 62. Struktura donepezila (a) i glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje (b).

#### 4.3.4 Kvantitativno određivanje donepezil-hidrohlorida voltametrijom sa pravougaonim impulsima na elektrodi od zlata

Voltametrijom sa pravougaonim impulsima je brza, osetljiva tehnika sa niskom granicom detekcije, a korišćena je za kvantitativno određivanje donepezila na elektrodi od zlata. Voltamogram je okarakterisan sa dobro definisanim anodnim pikom kao što je prikazano na slici 63.



Slika 63. Voltamogrami dobijeni voltametrijom sa pravougaonim impulsima na elektrodi od zlata za donepezil u opsegu koncentracija 29,1 to 65,4  $\mu\text{gcm}^{-3}$  u fosfatnom puferu pH 3 (elektroda od zlata: isprekidana linija, koncentracije donepezila: a) 29,1  $\mu\text{gcm}^{-3}$ , b) 38,5  $\mu\text{gcm}^{-3}$ , c) 47,6  $\mu\text{gcm}^{-3}$ , d) 56,6  $\mu\text{gcm}^{-3}$ , e) 65,4  $\mu\text{gcm}^{-3}$ ). Vreme akumulacije 120 s na  $E = 0,0\text{V}$ ; step size 2mV, pulse size 25 mV, frekvencija 8 Hz, scan rate 15  $\text{mVs}^{-1}$

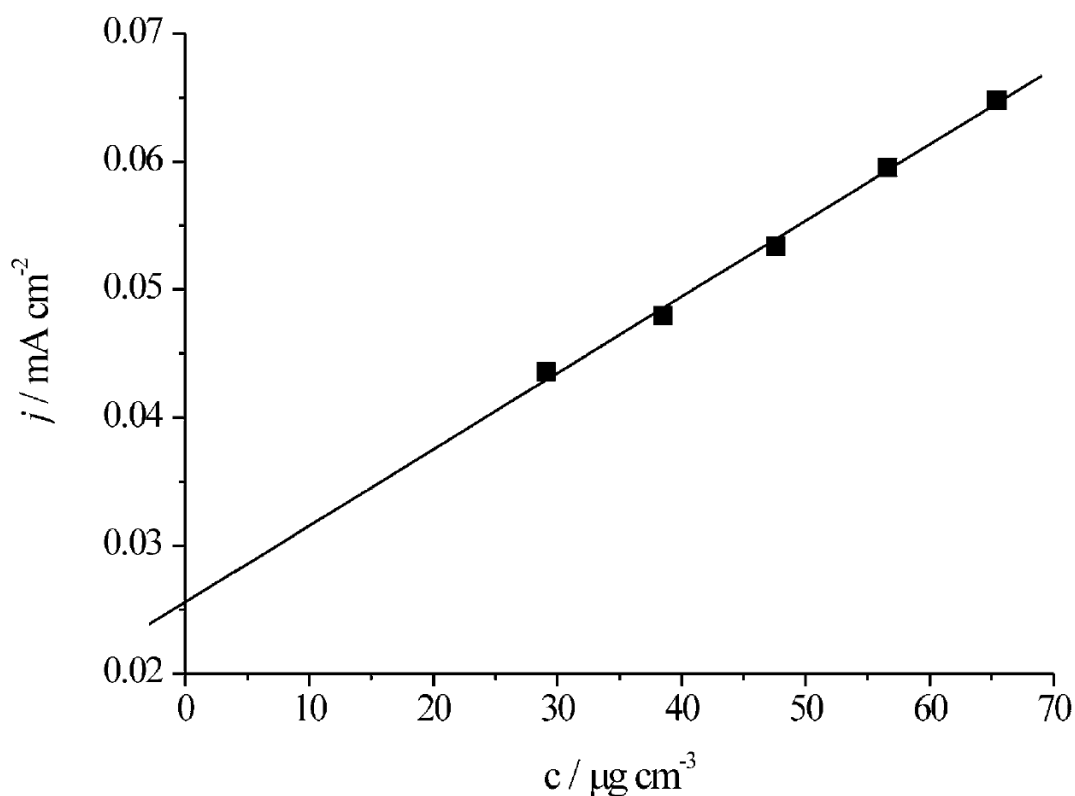
U SWV eksperimentima su ispitani uticaji akumulacionih vremena od 120 s i 180 s i potencijala akumulacije donepezila od 0 V i 0,2 V. Najbolji rezultati su postignuti pod eksperimentalnim uslovima prikazanim na slici 63.

Voltamogrami sa dobro definisanim pikom na potencijalu u opsegu 0,5 V do 0,6 V i najboljom osetljivošću su dobijeni koristeći uslove koji su prikazani na slici 63.

Snimljeni SW voltamogrami za različite koncentracije donepezila (Slika 63) pokazuju linearnu zavisnost vrednosti anodnih struja u opsegu koncentracija od 29,1 do 65,4  $\mu\text{gcm}^{-3}$  (Slika 64). Linearna zavisnost struje anodnog pika i koncentracije donepezila je data jednačinom:

$$j_{pa}(\text{mAcm}^{-2}) = 0,0256 (\pm 0,0011) + 0,0006 (\pm 0,00002) \times C(\text{mgcm}^{-3})$$

$$r = 0,9980$$

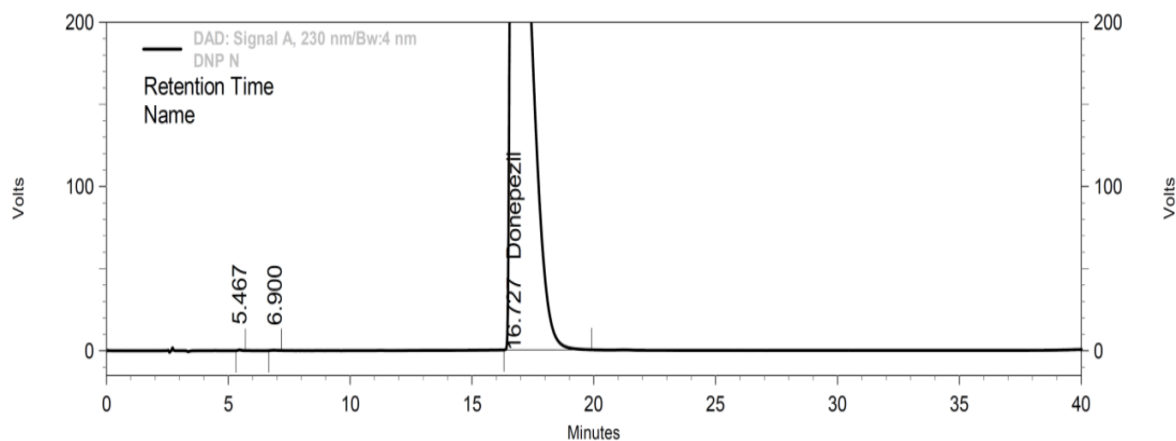


Slika 64. Linearna zavisnost struje anodnog pika i koncentracije donepezil-hidrohlorida u opsegu koncentracija 29,1 to 65,4  $\mu\text{gcm}^{-3}$

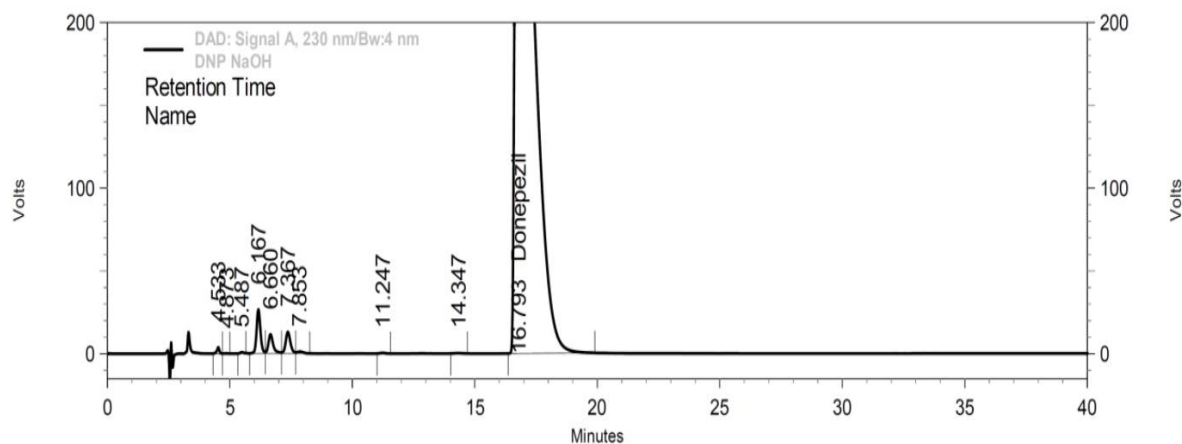
#### 4.4 Ispitivanje forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida primenom tečne hromatografije-masene spektroskopije

Ispitivanje forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida i donepezil tableta je prvobitno urađeno primenom razvijene i validirane HPLC metode [114].

U HPLC-MS analizi donepezil-hidrohlorid je podvrgnut razgradnji u alkalnoj sredini u 5 mol/L rastvoru NaOH u trajanju od 1 h. Dobijeni HPLC hromatogram je prikazan na slici 66. U ovim uslovima dobijena je razgradnja donepezila u nivou od 3 %. U cilju dobijanja maksimalne razgradnje donepezil-hidrohlorida, donepezil-hidrohlorid je podvrgnut razgradnji u 5 mol/L rastvoru NaOH sa refluksom u trajanju od 8 h. Procenat razgradnje donepezila u ovom uzorku je bio oko 15 %.

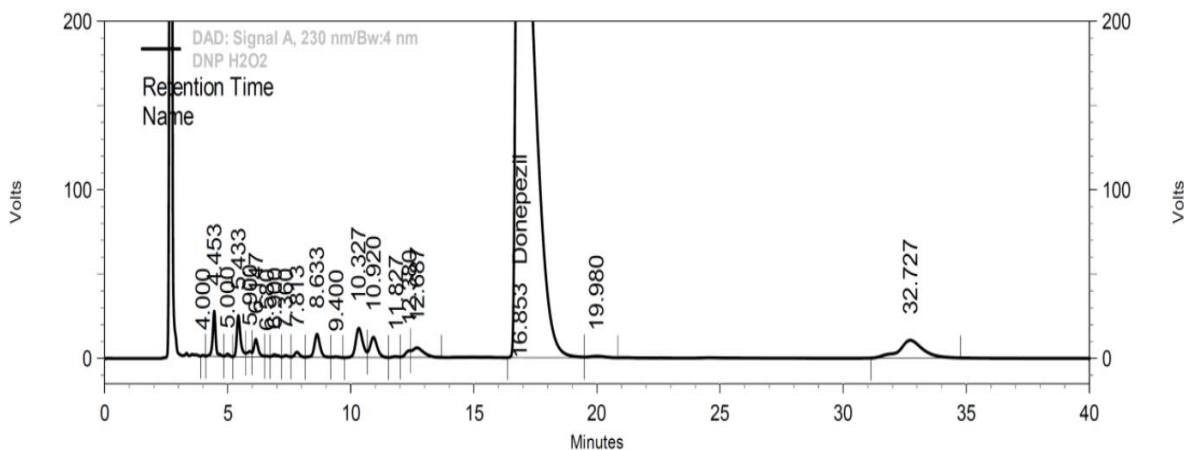


Slika 65. Hromatogram kontrolnog uzorka donepezil-hidrohlorida



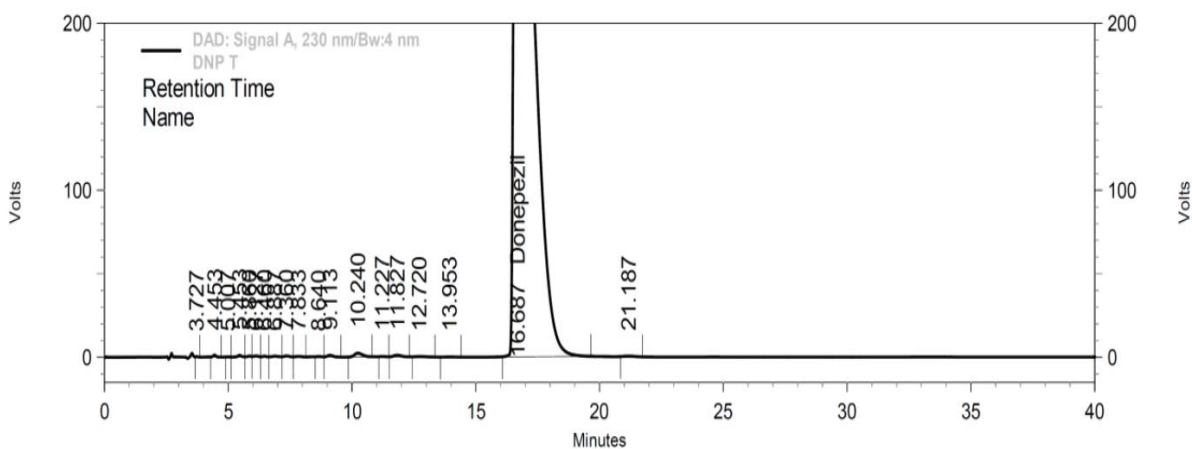
Slika 66. Hromatogram uzorka dobijenim alkalnom razgradnjom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (5 mol/L rastvor NaOH u trajanju od 1 h)

U HPLC-MS analizi donepezil-hidrohorid je podvrgnut oksidativnoj razgradnji u 3 % rastvoru vodonik-peroksida na temperaturi od 80 °C u trajanju od 1 h. U ovom eksperimentu je dobijeno oko 12 % razgradnje donepezila (Slika 67). U cilju dobijanja maksimalne razgradnje donepezil-hidrohlorida, donepezil-hidrohorid je podvrgnut razgradnji u 30 % rastvoru vodonik-peroksida sa refluksom u trajanju od 8 h. Procenat razgradnje donepezila u ovom uzorku je bio oko 57 %.



Slika 67. Hromatogram uzorka dobijenim oksidacionom razgradnjom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (3% rastvor vodonik-peroksida na temperaturi od 80°C tokom 1h)

Termička razgradnja donepezil-hidrohlorida je ispitivana na temperaturi od 105°C u trajanju od 72 h (Slika 68). Rezultati ispitivanja termičke razgradnje donepezila su pokazali da je donepezil stabilan u primenjenim uslovima i da je dobijen vrlo nizak stepen razgradnje molekula. Procenat razgradnje donepezila u ovom uzorku je bio oko 1%.



Slika 68. Hromatogram uzorka dobijenim termičkom razgradnjom aktivne supstance donepezil-hidrohlorida (105°C u trajanju od 72 h)

Na osnovu rezultata ispitivanja ponašanja donepezila u uslovima forsirane razgradnje, pokazano je da je donepezil stabilan u umerenim uslovima kisele i bazne hidrolize, ali je sklon razgradnji u prisustvu vodonik-peroksida. Ovakvo ponašanje donepezila u uslovima oksidativne razgradnje dato je i u literaturi [49-53]. Iako je donepezil stabilan u umerenim uslovima alkalne hidrolize, razgradnja donepezila je dobijena primenom jačih uslova razgradnje primenom viših koncentracija rastvora NaOH i zagrevanjem uz refluks. Slični rezultati su dobijeni i u radovima u literaturi [49] gde je razgradnja donepezila ostvarena u uslovima alkalne hidrolize zagrevanjem uz refluks ili primenom visokih koncentracija rastvora NaOH uz zagrevanje u trajanju od nekoliko dana [50-52]. Takođe u ispitivanjima termičke razgradnje donepezila dobijene su niže vrednosti stepena razgradnje na primenjenim uslovima ispitivanja. U literaturi su dati rezultati koji pokazuju značajnu razgradnju donepezila na uslovima visoke temperature u trajanju od nekoliko dana [52].

#### **4.4.1 Karakterizacija proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida primenom tačne hromatografije-masene spektroskopije**

Prvobitna metoda je modifikovana u cilju postavljanja LC-MS kompatibilne metode koja je korišćena za identifikaciju proizvoda razgradnje u uzorcima forsirane degradacije primenom masene spektrometrije visoke rezolucije. LC-MS metodom su ispitivani proizvodi razgradnje koji su dobijeni alkalnom hidrolizom, hemijskom oksidacijom i termičkom razgradnjom. Rezultati analize su prikazani na slikama 65-68 i tabelama 22-24.

U tabeli 21 su prikazani rezultati LC-MS analize uzorka dobijenog alkalnom razgradnjom donepezil-hidrohlorida u 5 mol/L rastvoru NaOH na 80°C u trajanju od 1 h. Alkalnom hidrolizom su dobijena nekoliko glavna proizvoda razgradnje na relativnim retencionom vremenima (RRT) 0,38, 0,41 i 0,43 (Slika 66). Izmerene mase m/z jona ovih jedinjenja su 410,1948, 396,2162 i 412,2109 (koje odgovaraju izmerenim masama 409,1875, 395,2089 i 411,2036) iz kojih su izvedene njihove molekulske formule  $C_{24}H_{27}NO_5$ ,  $C_{24}H_{29}NO_4$  i  $C_{24}H_{29}NO_5$ , respektivno. Molarne mase, izmerene vrednosti m/z jona i predložene molekulske formule svih potencijalnih proizvoda razgradnje dobijenih alkalnom razgradnjom donepezil-hidrohlorida su prikazane u tabeli 22.



Tabela 22. Rezultati LC-MS analize razgradnje donepezil-hidroklorida u alkalnoj sredini (5 ml/L NaOH) na 80°C u trajanju od 1 h. Predložene molekulske formule proizvoda razgradnje su određene na osnovu precizno izmerenih masa;  $\lambda_{\max}$  vrednosti dobijeni iz UV spektra jedinjenja; sh- široka apsorpciona traka

R.br.	RRT	$\lambda_{\max}$ , nm	Izmerene $m/z$ vrednosti glavnih jona	Molarne mase i molekulske formule
1	0,20	206; 258; 290	234,1465; 256,1282	233,1392; $C_{14}H_{19}NO_2$
2	0,30	208; 230; 272; 316	290,1736; 312,1558; 328,1311	289,1664; $C_{17}H_{23}NO_3$
3	0,34	208; 226sh; 256; 294	412,2103; 434,1920; 450,1648 845,3975; 861,3715	411,2033; $C_{24}H_{29}NO_5$
4	0,38	218; 258; 300	410,1948; 432,1795; 448,1525	409,1875; $C_{24}H_{27}NO_5$
5	0,41	208; 232; 276; 320	396,2162; 418,1980; 434,1728	395,2089; $C_{24}H_{29}NO_4$
6	0,43	208; 234; 276; 322	412,2109; 434,1940	411,2036; $C_{24}H_{29}NO_5$
7	0,58	208; 232; 272; 318	366,2051	365,1978; $C_{23}H_{27}NO_6$
8	0,61	210sh; 228; 272; 316	396,2158; 418,1981; 434,1770	395,2085; $C_{24}H_{29}NO_4$
9	0,71	208; 232; 276; 320	366,2053	365,1980; $C_{23}H_{27}NO_3$
10	1,00	208; 230; 270; 316	380,2216; 402,2026; 418,1777	379,2143; $C_{24}H_{29}NO_3$ – donepezil

U tabeli 23 su prikazani rezultati LC-MS analize uzorka dobijenog oksidativnom razgradnjom donepezil-hidroklorida u 3% rastvoru  $H_2O_2$  na 80°C u trajanju od 1 h. Na osnovu rezultata HPLC analize dobijeni stepen razgradnje donepezil-hidroklorida je iznosio 12%.

Dobijen je jedan glavni proizvod razgradnje na relativnom retencionom vremenu 1,79. Izmerena masa jona  $m/z$  ovog jedinjenja je iznosila 396,2162 (koja odgovara izmerenoj masi 395,2089) iz koje je izvedena njegova molekulska formula  $C_{24}H_{29}NO_4$ . U eksperimentu je dobijeno još nekoliko proizvoda razgradnje na relativnim retencionim vremenima 0,30, 0,34, 0,48, 0,58, 0,61, 0,69, 0,71 i 1,74 (Slika 67). Izmerene mase  $m/z$  jona ovih jedinjenja su 290,1736, 412,2103, 396,2157, 366,2051, 396,2158, 412,2108, 366,2053 i 396,2162 (koje odgovaraju izmerenim masama 289,1664, 411,2033, 395,2085, 365,1978, 395,2085, 411,2035, 365,1980 and 395,2089) iz kojih su izvedene njihove molekulske formule  $C_{17}H_{23}NO_3$ ,  $C_{24}H_{29}NO_5$ ,  $C_{24}H_{29}NO_4$ ,  $C_{23}H_{27}NO_3$ ,  $C_{24}H_{29}NO_4$ ,  $C_{24}H_{29}NO_5$ ,  $C_{23}H_{27}NO_3$  i  $C_{24}H_{29}NO_4$ , respektivno.

Tabela 23. Rezultati LC-MS analize oksidativne razgradnje donepezil-hidrohlorida (3%  $H_2O_2$ ) na  $80^\circ C$  u trajanju od 1 h. Predložene molekulske formule proizvoda razgradnje su određene na osnovu precizno izmerenih masa;  $\lambda_{max}$  vrednosti dobijeni iz UV spektra jedinjenja; sh- široka apsorpciona traka

R.br.	RRT	$\lambda_{max}$ , nm	Izmerene $m/z$ vrednosti glavnih jona	Molarne mase i molekulske formule
1	0,19	206; 226sh; 260; 290	306,1676; 328,1496; 344,1254; 633,3133	305,1604; $C_{17}H_{23}NO_4$
2	0,19	206; 260	318,1682	317,1609; $C_{18}H_{23}NO_4$
3	0,19	206; 260	320,1834	319,1761; $C_{18}H_{25}NO_4$
4	0,20	206; 258; 290	234,1465; 256,1282	233,1392; $C_{14}H_{19}NO_2$
5	0,21	210; 248	304,1887	303,1814; $C_{18}H_{25}NO_3$
6	0,22	208; 262	322,1628; 344,1488; 643,3214; 665,3031; 681,2760	321,1558; $C_{17}H_{23}NO_5$
7	0,22	208; 262	334,1993	333,1921; $C_{19}H_{27}NO_4$
8	0,22	208; 262	250,1418; 272,1277; 499,2783; 521,2605; 537,2375	249,1349; $C_{14}H_{19}NO_3$

9	0,30	208; 230; 272; 316	290,1736; 312,1558; 328,1311	289,1664; C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>
10	0,34	208; 226sh; 256; 294	412,2103; 434,1920; 450,1648 845,3975; 861,3715	411,2033; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>
11	0,38	218; 258; 300	410,1948; 432,1795; 448,1525	409,1875; C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>
12	0,42	208; 260; 318	426,1905	425,2187; C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>
13	0,43	208; 234; 276; 322	412,2109; 434,1940	411,2036; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>
14	0,48	210sh; 230; 272; 316	396,2157; 418,1979; 434,1747	395,2085; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>
15	0,58	208; 232; 272; 318	366,2051	365,1978; C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>
16	0,61	210sh; 228; 272; 316	396,2158; 418,1981; 434,1770	395,2085; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>
17	0,69	208; 234; 274; 310	412,2108; 434,1934; 823,4182	411,2035; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>
18	0,71	208; 232; 276; 320	366,2053	365,1980; C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>
19	1,00	208; 230; 270; 316	380,2216; 402,2026; 418,1777	379,2143; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub> – donepezil
20	1,74	208; 230; 270; 316	396,2162; 418,1974; 434,1712	395,2089; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>
21	1,79	208; 230; 270; 316	396,2162; 418,1974; 434,1712	395,2089; C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>

U tabeli 24 su prikazani rezultati LC-MS analize uzorka dobijenog termičkom razgradnjom donepezil-hidroklorida (105°C u trajanju od 72 h). Dobijena je vrlo mala razgradnja pod primenjenim uslovima razgradnje sa nekoliko proizvoda razgradnje, koji su detektovani kao pikovi neznatnih površina. Dobijeni rezultati termičke razgradnje pokazuju razgradnju donepezil-hidroklorida od oko 1%. Proizvodi razgradnje su

detektovani na relativnim retencionim vremenima 0,51, 0,58 i 0,71 (Slika 68). Izmerene mase  $m/z$  jona ovih jedinjenja su 396,2161, 396,2160 i 366,2053 (koje odgovaraju izmerenim masama 395,2088, 395,2087 i 365,1980) iz kojih su izvedene njihove molekulske formule  $C_{24}H_{29}NO_4$ ,  $C_{24}H_{29}NO_4$  i  $C_{23}H_{27}NO_3$ , respektivno.

Tabela 24. Rezultati LC-MS analize termičke razgradnje donepezil-hidrohlorida (105°C u trajanju od 72 h). Predložene molekulske formule proizvoda razgradnje su određene na osnovu precizno izmerenih masa;  $\lambda_{max}$  vrednosti dobijeni iz UV spektra jedinjenja; sh- široka apsorpciona traka

R.br.	RRT	$\lambda_{max}$ , nm	Izmerene $m/z$ vrednosti glavnih jona	Molarne mase i molekulske formule
1	0,20	206; 258; 290	234,1465; 256,1282	233,1392; $C_{14}H_{19}NO_2$
2	0,26	226; 286; 334	398,2304	397,2231; $C_{24}H_{31}NO_4$
3	0,30	208; 230; 272; 316	290,1736; 312,1558; 328,1311	289,1664; $C_{17}H_{23}NO_3$
4	0,34	208; 226sh; 256; 294	412,2103; 434,1920; 450,1648 845,3975; 861,3715	411,2033; $C_{24}H_{29}NO_5$
5	0,38	258; 318	388,2086; 410,1951	387,2058; $C_{22}H_{29}NO_5$
6	0,41	208; 232; 276; 320	396,2162; 418,1980; 434,1728	395,2089; $C_{24}H_{29}NO_4$
7	0,43	208; 234; 276; 322	412,2109; 434,1940	411,2036; $C_{24}H_{29}NO_5$
8	0,51	208; 232; 274; 310	396,2161; 418,1973	395,2088; $C_{24}H_{29}NO_4$
9	0,58	208; 232; 272; 312	396,2160; 418,1982	395,2087; $C_{24}H_{29}NO_4$
10	0,71	208; 232; 276; 320	366,2053	365,1980; $C_{23}H_{27}NO_3$
11	1,00	208; 230; 270; 316	380,2216; 402,2026; 418,1777	379,2143; $C_{24}H_{29}NO_3$ – donepezil

Rezultati forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida u uslovima oksidativne razgradnje pokazali su nastajanje jedinjenja na relativnom retencionom vremenu 1,79 molekulske formule  $C_{24}H_{29}NO_4$  koja odgovara N-oksid derivatu donepezila. Razgradnja molekula pod ovim uslovima se može pripisati oksidaciji tercijarne amino gupe u amino oksid. Iz literaturnih podataka je poznato da tercijarni amini lako podležu oksidaciji dajući N-okside, dok su aromatične strukture podložne hidroksilaciji katalizovanoj slobodnim radikalima [115-117]. Takođe na osnovu predloženih puteva metabolizma donepezila, indikativno je da je donepezil podložan reakcijama *O*-demetilacije na etoksi grupama dimetoksi inden grupe, *N*-dealkilacije na piperidinskom prstenu, *N*-oksidacije na piperidinskom prstenu i aromatične hidroksilacije [21,118].

#### **4.5 Semi-preparativno izdvajanje i strukturalna karakterizacija proizvoda razgradnje nastalih oksidativnom razgradnjom donepezil-hidrohlorida**

Donepezil-hidrohlorid (250 mg) je tretiran 6% rastvorom vodonik-peroksida na vodenom kupatilu na temperaturi od 80°C u trajanju od 6 h. Iz rastvora donepezil-hidrohlorida je zatim koristeći semi-preparativnu HPLC metodu vršena izolacija frakcija nepoznatih jedinjenja koja su nastala forsiranom razgradnjom donepezil-hidrohlorida u prisustvu vodonik-peroksida. Za izdvajanje nepoznatog jedinjenja nastalog oksidativnom razgradnjom donepezil-hidrohlorida korišćena je jednostavni reverzno fazni sistem sa gradijentnim programom kao što je dato u sekciji 3.5 metode. U ovoj semi-preparativnoj hromatografskoj analizi pikovi nepoznatih proizvoda razgradnje (proizvodi razgradnje u prisustvu vodonik-peroksida) označenih kao RRT 0,48 i RRT 0,58 (na osnovu relativnih retencionih vremena) su eluirali u vremenu od oko 12,5 min i 13,5 min. Frakcije nepoznatih jedinjenja koje su izolovane su analizirane koristeći HPLC analitičku metodu da bi se odredila čistoća nepoznatih jedinjenja u sakupljenim frakcijama. Hromatografska čistoća izolovanih nepoznatih jedinjenja u sakupljenim frakcijama je iznosila >95% i sakupljene frakcije su uparavane u inertnoj atmosferi na sobnoj temperaturi da bi se uklonio rastvarač. Izolovana nepoznata jedinjenja u čvrstom stanju su dodatno podvrgnuta sušenju u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi radi uklanjanja zaostalih rastvarača. Radi potvrde retencionih vremena

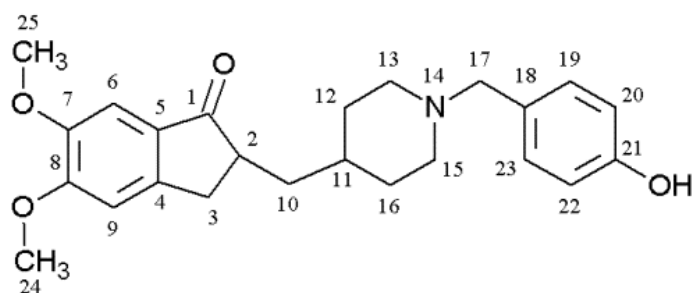
izolovanih jedinjenja ona su analizirana HPLC analitičkom metodom, a njihova hromatografska čistoća je iznosila 99%.

#### 4.5.1 Strukturna karakterizacija razgradnog proizvoda RRT 0,48

Maseni spektar proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida u vodenom rastvoru vodonik-peroksida je snimljen korišćenjem HPLC ESI – TOF/MS LC-MS sistema u pozitivnom modu jonizacije. Na MS spektru su detektovani molekularni joni sa m/z vrednostima 396,2183 [M+H]<sup>+</sup> u pozitivnom modu, ukazujući da je molekulska formula jedinjenja C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>.

Spektralni podaci dobijeni iz <sup>1</sup>H NMR spektara donepezil-hidrohlorida i nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,48 ukazuju na postojanje slične strukture nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,48 i donepezila. Razlika između molarnih masa nepoznatog jedinjenja i donepezila je ukazala na prisutnost hidroksi grupe u nepoznatom jedinjenju.

Asignacija <sup>1</sup>H NMR signala je urađena je na osnovu <sup>1</sup>H NMR spektara donepezil-hidrohlorida. Na osnovu NMR analize struktura nepoznatog proizvoda razgradnje je okarakterisana kao 2-((1-((4-hidroksifenil)metil)piperidin-4-il)metil)-5,6-dimetoksi-2,3-dihidro-1H-inden-1-on (Slika 69). Uporedna asignacija <sup>1</sup>H NMR spektara za donepezil i nepoznati proizvod razgradnje je data u sledećoj tabeli (Tabela 25). Ilustrativni <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C TOCSY, NOESY, HSQC i HMBC NMR spektri donepezila i nepoznatog jedinjenja prikazani su na slikama 48-54 i 70 u prilogu.



Slika 69. Struktura razgradnog proizvoda oksidativne razgradnje RRT 0,48

Tabela 25. Usporedna  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR asignacija za donepezil i proizvod razgradnje u vodenom rastvoru vodonik-peroksida

Položaj	Donepezil-hidrochlorid			Razgradni proizvod RRT 0,48		
	$^1\text{H}$	J (ppm)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	J (ppm)	$^{13}\text{C}$
1	-	-	206,8	-	-	-
2	1H	2,66 (m)	44,2	1H	2,67 (m)	-
3	2H	2,65 (m)	33,7	2H	2,70 (m)	-
4	-	-	148,5	-	-	-
5	-	-	128,7	-	-	-
6	1H	7,11 (s)	104,1	1H	7,15 (s)	-
7	-	-	149,3	-	-	-
8	-	-	155,5	-	-	-
9	1H	6,86 (s)	107,2	1H	6,85 (s)	-
10	Ha	1,91 (m)	37,8	Ha	1,85 (m)	-
	Hb	1,49 (m)		Hb	1,32 (m)	
11	1H	1,94 (m)	32,0	1H	1,44 (m)	-
12 i 16	4H	2,05 (m)	29,1	4H	1,69 (m)	-
		1,85 (m)	28,5		1,41 (m)	
13 i 15	4H	3,50 (m)	52,2	4H	3,39 (m)	-
		2,79 (m)	52,1		1,98 (m)	
14	-	-	-	-	-	-
17	2H	4,03 (s)	60,6	2H	3,92 (s)	-
18	-	-	128,1	-	-	-
19 i 23	2H	7,67 (m)	131,4	2H	7,24 (m)	-
20 i 22	2H	7,43 (m)	129,8	2H	7,24 (m)	-
21	1H	7,43 (m)	129,0	-	-	-
24	3H	3,96 (s)	56,1	3H	3,96 (s)	-
25	3H	3,89 (s)	55,9	3H	3,90 (s)	-

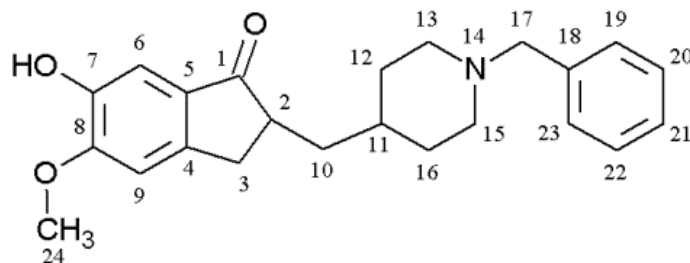
#### 4.5.2 Strukturna karakterizacija razgradnog proizvoda RRT 0.58

Maseni spektar proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida u vodenom rastvoru vodonik-peroksida je snimljen korišćenjem HPLC ESI – TOF/MS LC-MS sistema u pozitivnom i negativnom modu jonizacije. Na MS spektrima su detektovani molekularni jon sa m/z vrednosti 366,2089 [M+H]<sup>+</sup> u pozitivnom modu i m/z, ukazujući da je molekulska formula jedinjenja C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>.

Spektralni podaci dobijeni iz <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR spektara donepezil-hidrohlorida i nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58 ukazuju na postojanje slične strukture nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58 i donepezila. Razlika između molarnih masa nepoznatog jedinjenja i donepezila je ukazala na gubitak metilenske grupe u nepoznatom jedinjenju.

Asignacija <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR signala je urađena uz pomoć snimljenih HSQC, HMBC, COSY i NOESY 2D NMR spektara. Signali protonovanih ugljenika su asignirani na osnovu korelacija u HSQC spektru, dok su signali neprotonovanih ugljenika asignirani na osnovu odgovarajućih korelacija u HMBC spektru. Na osnovu NMR analize struktura nepoznatog proizvoda razgradnje je okarakterisana kao 2-[(1-benzilpiperidin-4-il)metil]-6-hidroksi-5-metoksi-2,3-dihidroinden-1-on (Slika 71).

Uporedna asignacija <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR spektara za donepezil i nepoznati proizvod razgradnje je data u sledećoj tabeli (Tabela 26). Ilustrativni <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C TOCSY, NOESY, HSQC i HMBC NMR spektri donepezila i nepoznatog jedinjenja prikazani su na slikama 48-54 i 72-77 u prilogu.



Slika 71. Struktura razgradnog proizvoda oksidativne razgradnje RRT 0,58



Tabela 26. Uporedna  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR asignacija za donepezil i proizvod razgradnje u vodenom rastvoru vodonik-peroksida

Položaj	Donepezil-hidrochlorid			Razgradni proizvod RRT 0,58		
	$^1\text{H}$	J (ppm)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	J (ppm)	$^{13}\text{C}$
1	-	-	206,8	-	-	209,1
2	1H	2,66 (m)	44,2	1H	2,68 (m)	46,7
3	2H	2,65 (m)	33,7	Ha	3,22 dd (8,3; 17,5 Hz)	35,0
				Hb	2,65 (m)	
4	-	-	148,5	-	-	149,0
5	-	-	128,7	-	-	131,5
6	1H	7,11 (s)	104,1	1H	7,22 (s)	109,6
7	-	-	149,3	-	-	147,3
8	-	-	155,5	-	-	154,4
9	1H	6,86 (s)	107,2	1H	6,83 (s)	108,4
10	Ha	1,91 (m)	37,8	Ha	1,89 ddd (4,7; 7,7; 13,5 Hz)	40,1
	Hb	1,49 (m)		Hb	1,31 ddd (6,1; 9,6; 13,5 Hz)	
11	1H	1,94 (m)	32,0	1H	1,54 (m)	35,6
12 i 16	4H	2,05 (m)	29,1	4H	1,72 (m)	33,8
		1,85 (m)	28,5		1,40 (m)	32,9
13 i 15	4H	3,50 (m)	52,2	4H	2,97 (m)	54,9
		2,79 (m)	52,1		2,04 (m)	
14	-	-	-	-	-	-
17	2H	4,03 (s)	60,6	2H	3,59 (s)	64,4
18	-	-	128,1	-	-	129,8
19 i 23	2H	7,67 (m)	131,4	2H	7,33 (m)	131,1
20 i 22	2H	7,43 (m)	129,8	2H	7,32 (m)	129,8
21	1H	7,43 (m)	129,0	1H	7,28 (m)	128,8
24	3H	3,96 (s)	56,1	3H	3,98 (s)	57,7
25	3H	3,89 (s)	55,9	-	-	-

#### 4.5.3 Predloženi putevi oksidativne razgradnje donepezil-hidrohlorida u vodenom rastvoru u prisustvu vodonik-peroksida

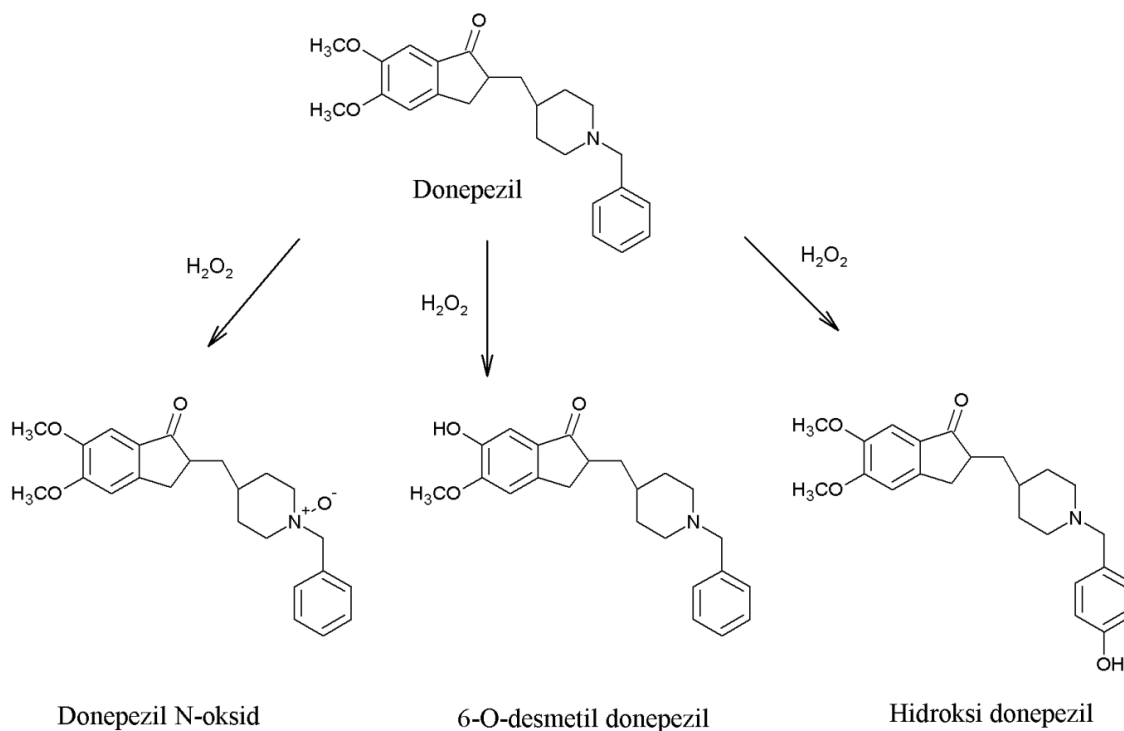
Forsiranom razgradnjom donepezil-hidrohlorida u rastvoru  $H_2O_2$  na povišenoj temperaturi dobijenu su višestruki proizvodi razgradnje. Rezultati forsirane razgradnje donepezil-hidrohlorida u uslovima oksidativne razgradnje pokazali su nastajanje jedinjenja na relativnom retencionom vremenu 1,79 molekulske formule  $C_{24}H_{29}NO_4$  koji je identifikovan na osnovu relativnog retencionog vremena referentnog standarda tog jedinjenja kao *N*-oksid derivat donepezila (2,3-Dihidro-5,6-dimetoksi-2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]metil]-1H-Inden-1-on *N*-Oksid). Ova transformacija molekula se može opisati kao oksidacija tercijarne amino grupe na piperidinskom prstenu molekula u amino oksid. Iz literaturnih podataka je poznato da tercijarni amini lako podležu oksidaciji dajući *N*-okside [115]. Ovo jedinjenje je proizvod metabolizma donepezil-hidrohlorida u ljudskom organizmu (M6) [21] i predstavlja najverovatniji proizvod razgradnje leka u gotovom proizvodu u roku trajanja, što je opisano i u USP monografiji za gotov proizvod donepezil tablete [119].

U eksperimentu je dobijeno još nekoliko proizvoda razgradnje od kojih su u potpunosti strukturno okarakterisani proizvodi razgradnje sa relativnim retencionim vremenima 0,48 i 0,58. Izmerene mase *m/z* jona ovih jedinjenja su 366,2051 i 396,2158 (koje odgovaraju izmerenim masama 365,1978 i 395,2085) iz kojih su izvedene njihove molekulske formule  $C_{23}H_{27}NO_3$  i  $C_{24}H_{29}NO_4$ . Iz rastvora oksidativno razgrađenog donepezil-hidrohlorida u prisustvu vodonik-peroksida koristeći semi-preparativnu HPLC metodu je izvršena izolacija frakcija nepoznatih jedinjenja, a zatim je urađena i njihova spektroskopska karakterizacija primenom ESI-LC-TOF analize i NMR spektroskopije.

Na osnovu NMR analize struktura nepoznatog proizvoda razgradnje sa relativnim retencionim vremenom RRT 0,48 je okarakterisana kao 2-({1-[(4-hidroksifenil)metil]piperidin-4-il}metil)-5,6-dimetoksi-2,3-dihidro-1H-inden-1-on. Ovo jedinjenje je posledica transformacije molekula koja je nastala reakcijom aromatične hidroksilacije na benzenovom prstenu. Na osnovu literaturnih podataka hidroksilacija aromatične strukture se odvija preko mehanizma slobodnih radikala, pri kome u prvom stupnju dolazi do reakcije hidroksi radikala sa benzenovim prstenom-eliminacija

protona i nastajanje intermedijera fenoksi radikala koji zatim u drugom stupnju reaguje sa molekulom rastvarača i dolazi do formiranja fenolne funkcionalne grupe [120]. Ovo jedinjenje predstavlja proizvod metabolizma donepezil-hidrohlorida u ljudskom organizmu (M3).

Na osnovu NMR analize struktura nepoznatog proizvoda razgradnje sa relativnim retencionim vremenom RRT 0,58 je okarakterisana kao 2-[(1-benzilpiperidin-4-il)metil]-6-hidroksi-5-metoksi-2,3-dihidroinden-1-on. Ovo jedinjenje je posledica transformacije molekula koja je nastala reakcijom *O*-demetilacije metoksi grupe na indenonskom prstenu. Na osnovu literaturnih podataka može se pretpostaviti da se ova reakcija odvija najverovatnije preko mehanizma formiranja sekundarnog karbonijum jona uz katalitičko dejstvo vodonik-peroksida, nakon čega karbonijum jon reaguje sa rastvaračem, vodom, gradeći alkohol, a oslobađa se molekul metanola [121]. Ovo jedinjenje je poznato pod nazivom 6-O-desmetil-donepezil i predstavlja jedini aktivni metabolit donepezil-hidrohlorida u ljudskom organizmu (M1). Na slici 78 prikazani su putevi razgradnje donepezil-hidrohlorida u vodenom rastvoru uz prisustvo vodonik-peroksida.

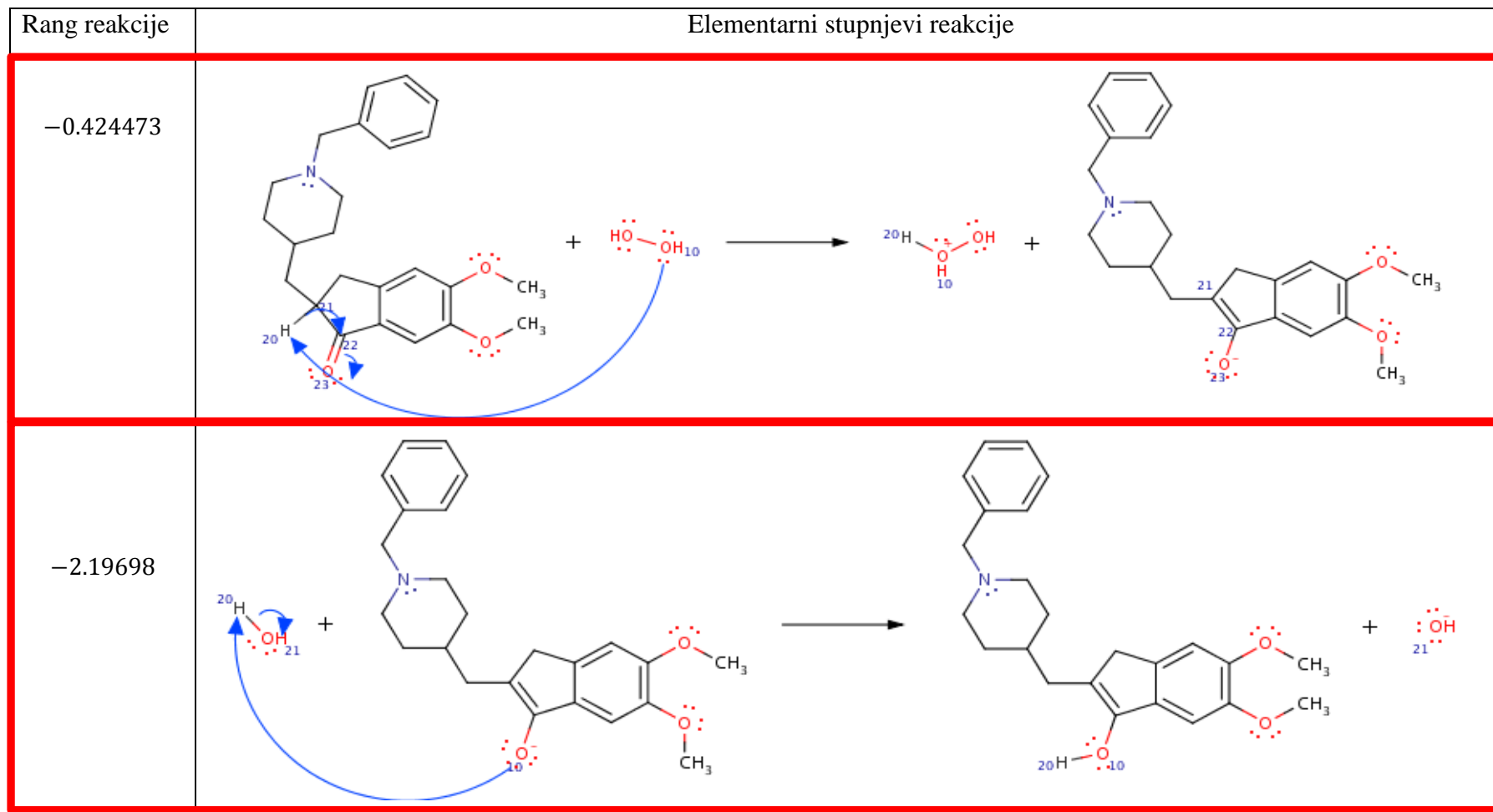


Slika 78. Transformacije donepezil-hidrohlorida ostvarene forsiranom razgradnjom u vodenom rastvoru vodonik-peroksida

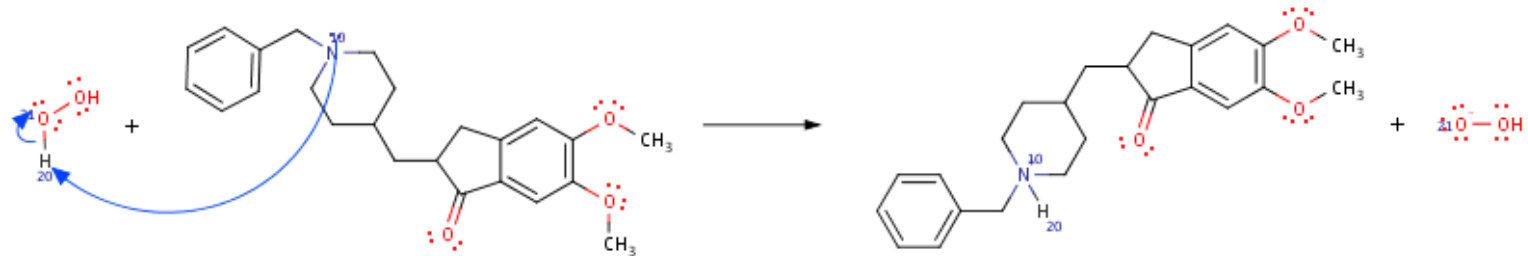
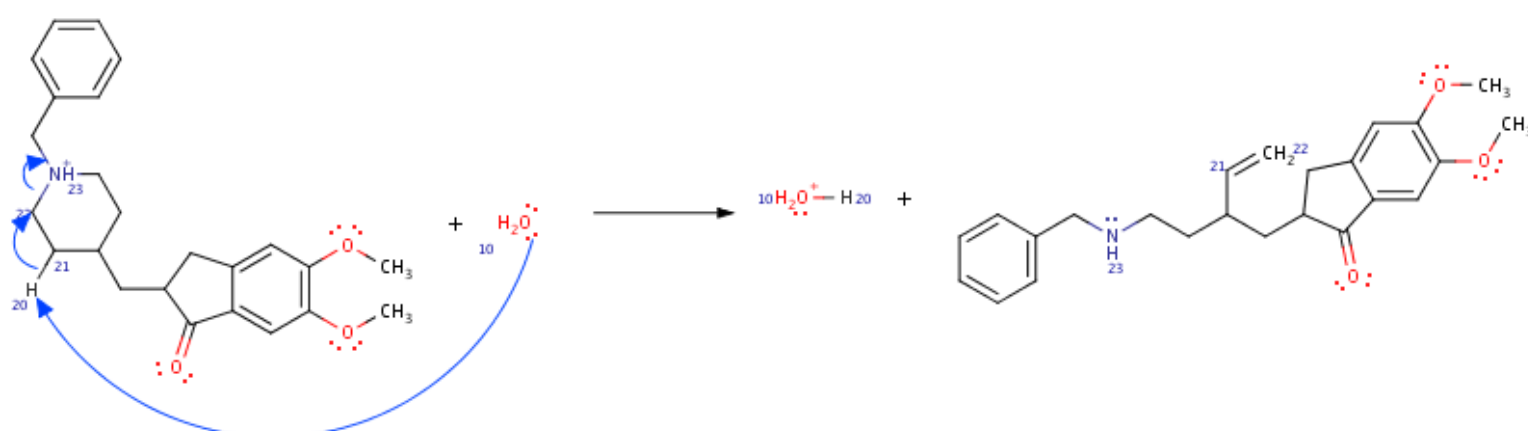
#### 4.6 Poređenje eksperimentalno dobijenih podataka sa softverskim podacima rezgradnje donepezila

Reaction predictor <http://reactions.igb.uci.edu> softver za predviđanje hemijskih reakcija vrši predviđanje proizvoda hemijske reakcije koristeći sledeće procese: (1) za dati sistem reaktanata i reakcionih uslova, softver vrši identifikaciju donorskih i akceptorskih mesta reaktivnosti u molekulu; (2) u drugom koraku softver kombinuje popunjene orbitale kao donorska mesta reakcije sa nepopunjenim orbitalama akceptorskih mesta reakcije i na taj način postavlja listu svih potencijalnih elementarnih reakcija za dati sistem reaktanata i reakcionih uslova. Ovaj softver sadrži bazu koja se sastoji od velikog broja unetih elementarnih reakcija i na osnovu ugrađenih pravila kreira analogne elementarne reakcije za dati sistem reaktanata. Elementarna reakcija je reakcija koja se odigrava u jednom stupnju u kojoj dolazi do premeštanja jednog elektrona (slobodno-radikalske reakcije), jednog para elektrona (adicija ili disocijacija veze) ili složenih premeštanja više elektrona (periciklične ili reakcije E2 eliminacije); (3) nakon utvrđivanja svih potencijalnih elementarnih reakcija, softver vrši njihovo rangiranje odnosno identifikaciju statističke verovatnoće odigravanja elementarnog stupnja reakcije; (4) ponovno unošenje elementarnih reakcija sa najvećom statističkom verovatnoćom u softver; (5) ponavljanje ovih procesa do dobijanja stabilnog jedinjenja.

Rezultati softverskog predviđanja proizvoda hemijskih reakcija za donepezil-hidrohlorid pod datim reakcionim uslovima u prisustvu vodonik-peroksida prikazani su na sledećim slikama 79-83.



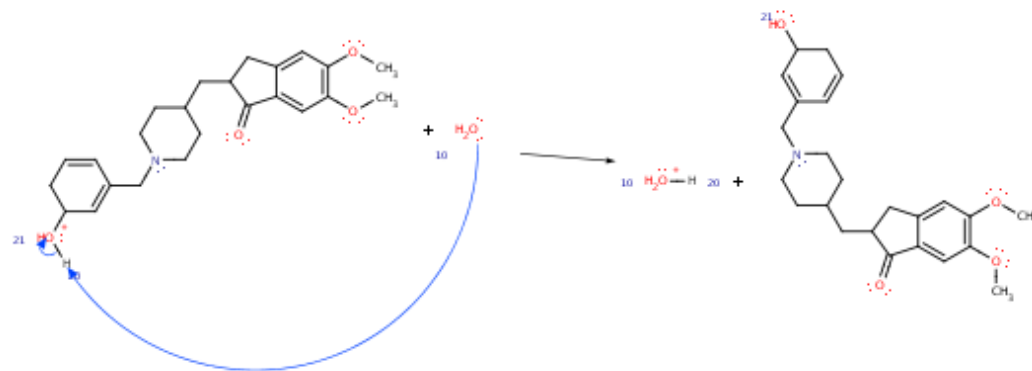
Slika 79. Elementarni stupnjevi hemijske reakcije donepezil-hidroklorida i vodonik-peroksida (1) Prvi stupanj nukleofilni napad molekula vodonik-peroksida na molekul donepezila-oduzimanje protona; (2) Drugi stupanj je reakcija oksianjona sa prisutnim rastvaračem u kojoj nastaje alkoholna funkcionalna grupa

Rang reakcije	Elementarni stupnjevi reakcije
-3.15774	
-4.48722	

Slika 80. Elementarni stupnjevi hemijske reakcije donepezil-hidrohlorida i vodonik-peroksida (1) Prvi stupanj elektrofilni napad molekula vodonik-peroksida na molekul donepezila-prenos protona; (2) Drugi stupanj je reakcija amonijum-katjona sa molekulom rastvarača i nastajanje alkena

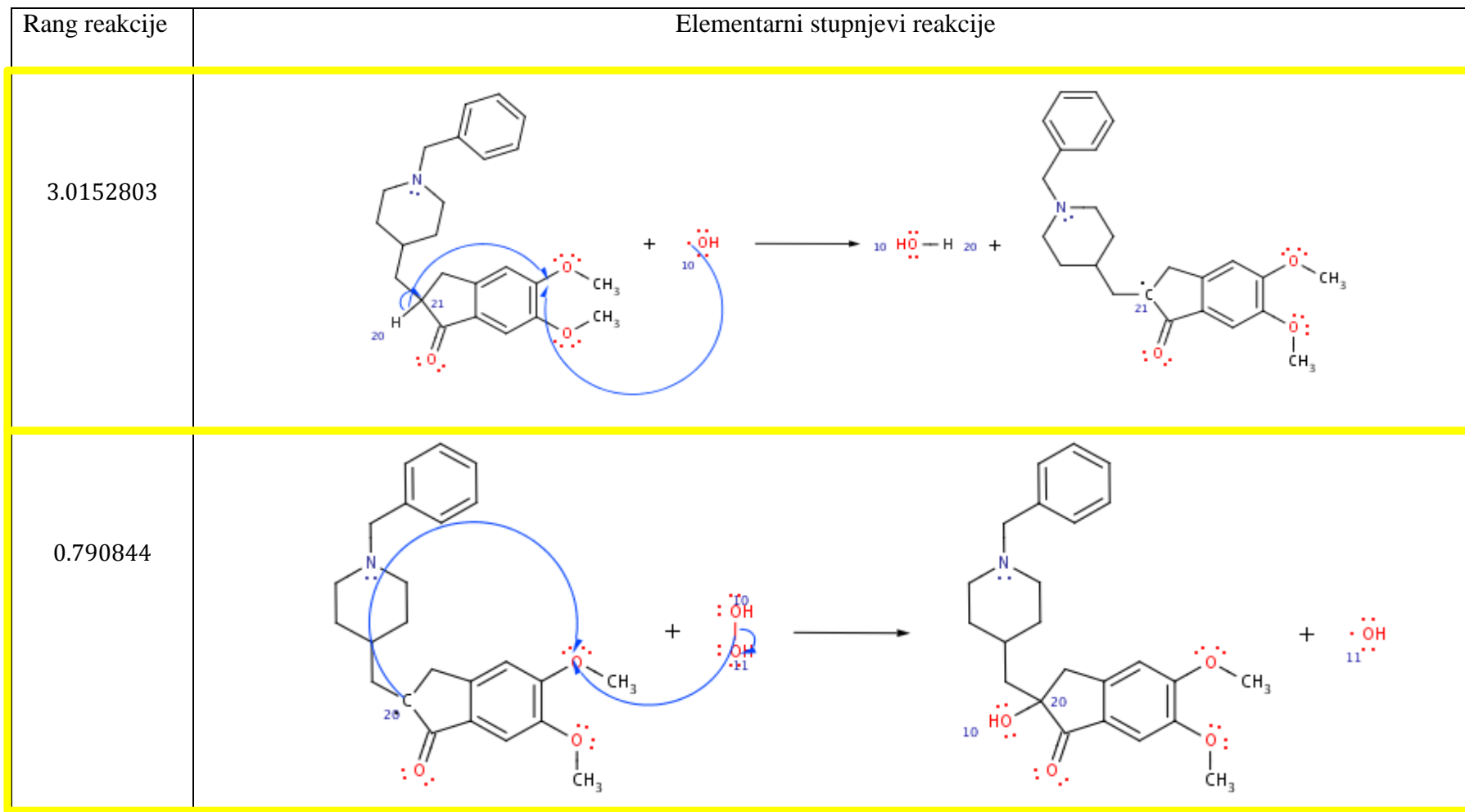
Rang reakcije	Elementarni stupnjevi reakcije
-3.66736	
0.8769083	

1.39842567

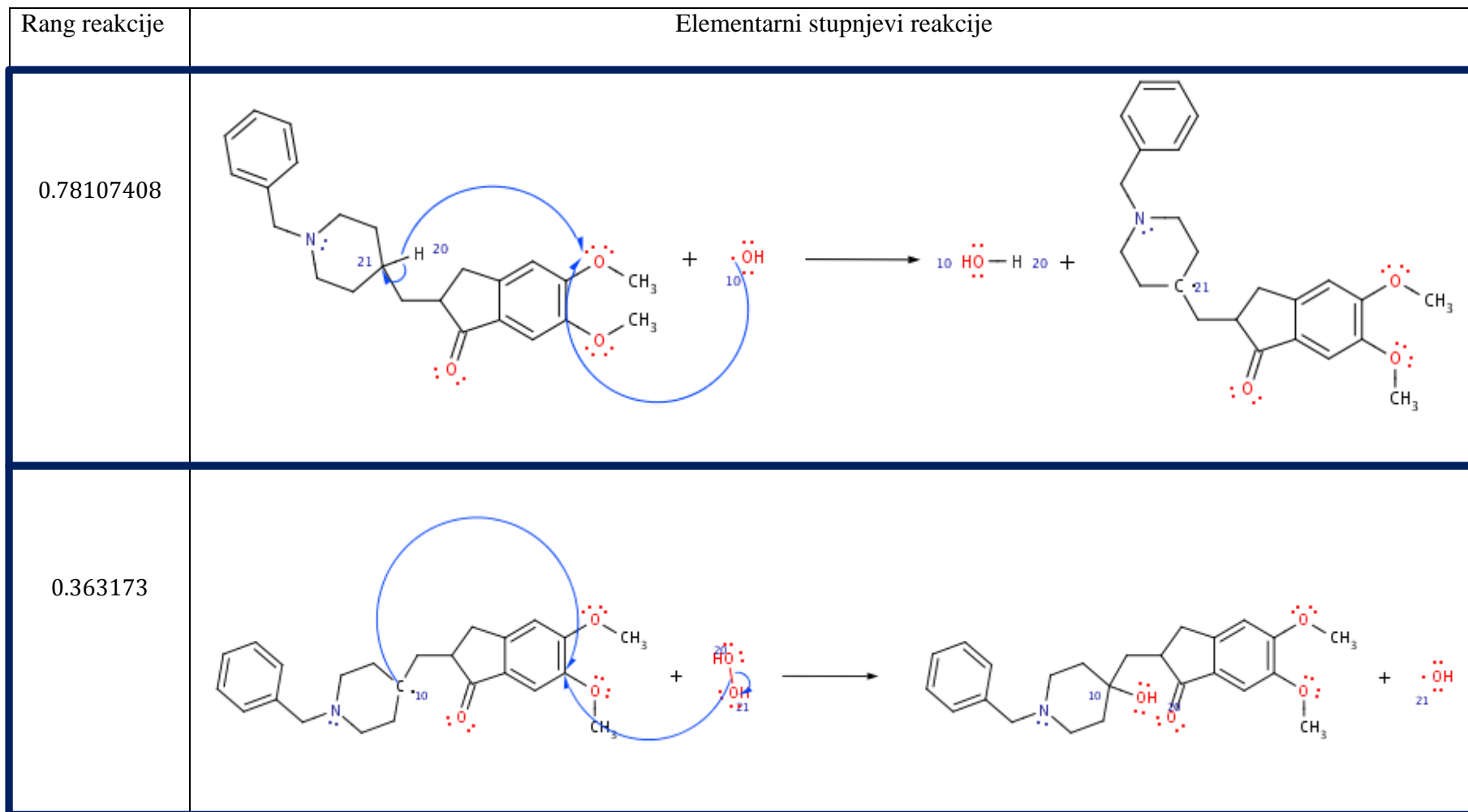


Slika 81. Elementarni stupnjevi hemijske reakcije donepezil-hidrohlorida i vodonik-peroksida (1) Prvi stupanj elektrofilni napad molekula vodonik-peroksida na molekul donepezila-prenos protona; (2) Drugi stupanj je reakcija karbokatjona sa rastvaračem-nastanak oksonijum jona; (3) treći stupanj je reakcija oksonijum jona sa rastvaračem i nastajanje alkoholne funkcionalne grupe





Slika 82. Elementarni stupnjevi hemijske reakcije donepezil-hidroklorida i vodonik-peroksida (1) Prvi stupanj napad hidroksi radikala na molekul donepezila-oduzimanje protona; (2) Drugi stupanj je reakcija nastalog radikala sa vodonik-peroksidom i nastajanje alkoholne funkcionalne grupe



Slika 83. Elementarni stupnjevi hemijske reakcije donepezil-hidroklorida i vodonik-peroksida (1) Prvi stupanj napad hidroksi radikala na molekul donepezila-oduzimanje protona; (2) Drugi stupanj je reakcija nastalog radikala sa vodonik-peroksidom i nastajanje alkoholne funkcionalne grupe

Na osnovu rezultata koji su dobijeni korišćenjem softvera za predviđanje elementarnih stupnjeva reakcije može se zaključiti da donepezil-hidrohlorid u posmatranim uslovima reakcije oksidacije u vodenom rastvoru u prisustvu vodonik-peroksida može da reaguje kroz različite mehanizme:

1. Nukleofilno/elektrofilni proces, i
2. Mehanizamom slobodnih radikala.

Prema dobijenim rezultatima za rang reakcije odnosno mogućnosti odvijanja elementarnog stupnja reakcije, donepezil-hidrohlorid najverovatnije reaguje sa vodonik-peroksidom posredstvom mehanizma slobodnih radikala. Mehanizam nukleofilnog ili elektrofilnog procesa je manje verovatan proces.

Razlog zašto softver nije identifikovao sve eksperimentalno određene proizvode razgradnje u prisustvu vodonik-peroksida je verovatno u tome što su reakcije nastajanja ovih jedinjenja kompleksnog mehanizma, pa samim tim u svojoj bazi podataka ne sadrži elementarne reakcije analognog tipa koje bi softver selektovao kao moguće elementarne stupnjeve ovih reakcija. Osim toga ovaj softver od velikog broja mogućih reakcija vrši statističko rangiranje odigravanja pojedinih analognih elementarnih reakcija za dati sistem reaktanata i uslova reakcije, tako da je moguće da koristeći postojeći skup pravila za određivanje mogućih reakcija, sistem nije uspeo da rangira neke od elementarnih reakcija koje su eksperimentalno dobijene kao moguće elementarne reakcije.

Pored uočenih nedostataka ovaj softver je vrlo jednostavan i brz za upotrebu i može dati vrlo korisne podatke na opštem nivou o postojanju akceptorskih i donorskih reakcionih mesta u molekulu, koja su podložna za odigravanje određenih hemijskih transformacija.

## 5. ZAKLJUČAK

1. U ovom radu proučavani su proizvodi razgradnje donepezil-hidrohlorida u rastvoru i čvrstom stanju

2. U toku ispitivanja stabilnosti donepezil-hidrohlorida i određivanja mogućih puteva razgradnje leka, izvršena je potpuna strukturna identifikacija nekoliko proizvoda razgradnje korišćenjem hromatografskih i spektrometrijskih tehnika.

3. U skladu sa ICH Q2B regulativom validirana je “*stability indicating*” RP-HPLC metoda za određivanje srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida u API sirovini i gotovom proizvodu. Predložena RP-HPLC metoda je selektivna, tačna i reproduktivna u opsegu metode i može se primeniti za kvantifikaciju srodnih supstanci donepezil-hidrohlorida u rutinskoj kontroli i za praćenje stabilnosti gotovog proizvoda.

4. Proučavanje razgradnih proizvoda donepezila (DP) je urađeno korišćenjem razvijene i validirane “*stability indicating*” RP-HPLC metode. Studija forsirane razgradnje API supstance i gotovog proizvoda pod različitim uslovima razgradnje izvedena je u cilju ispitivanja stabilnosti donepezil-hidrohlorida tj. prepoznavanja mogućih puteva razgradnje leka i identifikacije potencijalnih proizvoda razgradnje, kao i u cilju potvrđivanja specifičnosti korišćene hromatografske metode.

5. API supstanca donepezil-hidrohlorid i donepezil tablete su podvrgnuti različitim uslovima razgradnje koje preporučuje Internacionalna Konferencija za Harmonizaciju (ICH). Rastvori donepezil-hidrohlorida su podvrgnuti kiseloj i baznoj hidrolizi, hemijskoj oksidaciji i termičkoj razgradnji. Donepezil-hidrohlorid je pokazao stabilnost prema uslovima hidrolitičke razgradnje, oksidacije i termičke razgradnje, koje predlaže ICH. Samo mali procenat razgradnje je ostvaren u uslovima kisele hidrolize i termičke razgradnje. U primenjenim uslovima kisele hidrolize (5 mol/L rastvoru HCl na temperaturi od 80°C tokom 1 h) u uzorcima donepezil-hidrohlorida i donepezil tableta postignuta je razgradnja u nivou manjem od 1%. Rezultati ispitivanja termičke razgradnje donepezil-hidrohlorida sirovine i donepezil tableta u čvrstom stanju na temperaturi od 105°C u trajanju od 72 h su pokazali procenat razgradnje u nivou od 1%, a detektovani su višestruki proizvodi razgradnje u vrlo niskim koncentracijama.

6. Značajna razgradnja donepezil-hidrohlorida u ispitivanim uzorcima je dobijena u uslovima alkalne hidrolize i pod uticajem vodonik-peroksida. Utvrđena je razgradnja donepezila u alkalnoj sredini u 5 mol/L rastvoru NaOH na temperaturi od

80°C tokom 0,5 h u granicama od 1% do 1,5%. Razgradnjom donepezil-hidrohlorida API supstance i farmaceutskog oblika donepezil tablete u 3% rastvoru vodonik-peroksida na temperaturi od 80°C tokom 0,5 h dobijeno je oko 1,5% i 3,5% proizvoda degradacije.

7. Za proučavanje elektrohemijskog ponašanja donepezil-hidrohlorida su primenjene različite elektrohemisjke metode (ciklična voltimetrija i voltimetrija sa pravougaonim impulsima) na elektrodi od zlata u različitim elektrolitima. Za analizu elektrolita je korišćena i visokoefikasna tečna hromatografija (HPLC) radi potvrde podataka dobijenih elektrohemijskim ispitivanjima.

8. U ispitivanjima elektrohemijskog ponašanja donepezil-hidrohlorida proučavani su proizvodi razgradnje donepezil-hidrohlorida koji su nastali u rastvoru elektrolita u elektrohemijskoj ćeliji nakon 140 sati ciklizacije potencijala. Ukupni efekat razgradnje je iznosio 12,3%. Detekcija razgradnih proizvoda iz elektrohemijske razgradnje je izvedena korišćenjem visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC). Razgradni proizvod označen kao RRT 0,57 (na osnovu relativnog retencionog vremena) je identifikovan kao glavni razgradni proizvod koji je izolovan korišćenjem semi-preparativne hromatografske tehnike u cilju strukturne identifikacije. Hromatografska čistoća izdvojenog razgradnog proizvoda je iznosila 99,0%, pre dalje spektroskopske karakterizacije primenom ESI-LC-TOF analize i NMR spektroskopije. Identifikovani proizvod elektrohemijske oksidacije je okarakterisan kao hidroksi derivat donepezil-hidrohlorida i ova nečistoća je specificirana kao poznata procesna nečistoća u monografiji USP farmakopeje za aktivnu supstancu donepezil-hidrohlolid.

9. Kvantitativna određivanja donepezil-hidrohlorida su vršena koristeći voltetriju sa pravougaonim impulsima. Ispitivanje reakcije je urađeno u alkalnim elektrolitima (pH 8,4 i 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>) i kiselom elektrolitu (pH 3, fosfatni pufer). Najbolja osetljivost je postignuta u fosfatnom puferu sa akumulacijom na 0,0 V tokom 120 s. Donepezil-hidrohlolid je ispitan kao sirovina i dobijena je linearna zavisnost vrednosti anodnih struja od koncentracija donepezil-hidrohlorida u opsegu 29,1 to 65,4 µg cm<sup>-3</sup>.

10. Pored RP-HPLC metode, za analizu proizvoda razgradnje u uzorcima koji su dobijeni forsiranom razgradnjom donepezil-hidrohlorida korišćena je i LC-MS kompatibilna metoda koja je postavljena modifikovanjem prvobitno razvijene HPLC

analitičke metode. Identifikacija proizvoda razgradnje donepezil-hidrohlorida je urađena primenom kuplovane tehnike tečne hromatografije (HPLC) i masene spektrometrije visoke rezolucije. Razgradni proizvodi koji su dobijeni u studijama forsirane razgradnje su okarakterisani na osnovu izvedenih molekulskih formula supstanci koje su dobijene na osnovu dobijenih preciznih masa iz masenog spektra.

11. Uspešnim razvojem i međusobnim kombinovanjem više različitih hromatografskih i spektrometrijskih metoda, i teorije, proučavani su oksidativni putevi razgradnje donepezil-hidrohlorida u rastvorima u prisustvu vodonik-peroksida. Glavni proizvodi oksidativne razgradnje koji se javljaju pod ovim uslovima su izolovani korišćenjem semi-preparativne hromatografske tehnike radi strukturne identifikacije primenom masene spektrometrije i NMR spektroskopije. Glavni proizvodi razgradnje su hromatografski (HPLC), spektrometrijski ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, UV-Vis spektrofotometrija, MS spektrometrija) i strukturno okarakterisani i objašnjen je put njihovog nastanka. Identifikovani su sledeći proizvodi oksidativne razgradnje: donepezil *N*-oksid, 6-*O*-desmetil donepezil i hidroksi donepezil. Ovi identifikovani proizvodi predstavljaju proizvode metabolizma u ljudskom organizmu, dok donepezil *N*-oksid predstavlja i najverovatniji proizvod razgradnje leka u gotovom proizvodu u roku trajanja, što je opisano i u USP monografiji za gotov proizvod donepezil tablete.

12. Za određivanje potencijalnih proizvoda oksidativne razgradnje donepezil-hidrohlorida u prisustvu vodonik-peroksida kao i za pretpostavljanje mogućih mehanizama reakcija nastajanja potencijalnih proizvoda korišćen je softver za predviđanje proizvoda hemijskih reakcija.

13. Ispitivanje forsirane razgradnje farmakološki aktivne supstance donepezil-hidrohlorida omogućilo je uspostavljanje efikasne, selektivne i osetljive HPLC analitičke metode koja omogućava kvalitativno i kvantitativno određivanje nečistoća i razgradnih proizvoda u rutinskoj kontroli kvaliteta komercijalnog proizvoda i u dugoročnim studijama ispitivanja stabilnosti leka. Ispitivanjem razgradnih proizvoda i puteva razgradnje donepezil-hidrohlorida u studijama forsirane razgradnje dobijene su informacije o potencijalnim razgradnim proizvodima i mogućim mehanizmima razgradnje donepezil-hidrohlorida. Ove informacije su pružile veliki doprinos u odabiru optimalne farmaceutske formulacije gotovog proizvoda koja obezbeđuje kvalitet, efikasnost i bezbednost leka u njegovoj komercijalnoj primeni.

## 6. LITERATURA

- [1] Oliveira, A.A.; Hodges, H3.M. Alzheimer's Disease and Neuronal Transplantation as Prospective Cell Therapy. *Curr. Alzheimer Res.*, 2005; 2, 79-95
- [2] Jann, M.W., Grossberg, G., Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Consult. Pharm.*, 2000; 15(B); 7-15
- [3] Madden S., Spaldin, V., Park, B.K., Clinical pharmacokinetics of tacrine. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995; 28, 449-57
- [4] Nordberg, A., Svensson, A.L., Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf.*, 1998; 19, 465-80
- [5] Jann, M.W., Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*, 2000; 20(1), 1-12
- [6] Lopez, S., Bastida, J., Viladomat, F. & Codina, C., Solidphase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus confusus*. *Phytochem. Anal.*, 2002; 13, 311–15
- [7] Taylor P, Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1994; 34, 281-320
- [8] Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, Ariel N, Cohen S, Shafferman A. Dissection of the human acetylcholinesterase active centre determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268, 17083-95
- [9] Bourne Y, Taylor P, Bougis PB, Marchot P. Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274, 2963-70
- [10] Tóugu V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition– Central Nervous System Agents. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 1, 155-70
- [11] Becker, R.E., Giacobini, E., Mechanisms of cholinesterase inhibition in senile dementia of the Alzheimer type: Clinical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Drug Dev. Res.*, 1998; 12, 163–95
- [12] Reiner E, Radic Z, Mechanism of action of cholinesterase inhibitors. In: Giacobini E (ed). *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. Martin Dunitz: London, 2000, 103–19
- [13] Seltzer B., Donepezil in the treatment of dementia. *Aging Health*, 2005; 1, 7–17

- [14] Tiseo PJ, Perdomo CA, Friedhoff LT., Metabolism and elimination of <sup>14</sup>C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1998; 46 (1), 19–24
- [15] Tiseo P.J., Rogers S.L., Friedhoff L.T., Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following evening administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 46(I), 13-18
- [16] Farlow MR., Pharmacokinetic profiles of current therapies for Alzheimer's disease: implications for switching to galantamine. *Clin. Ther.*, 2001; 23 (A), 13–24
- [17] Farlow MR., Clinical pharmacokinetics of galantamine. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003; 42, 1383–92
- [18] Bentue-Ferrer D, Tribut O, Polard E, Clinically significant drug interactions with cholinesterase inhibitors. *CNS Drugs*, 2003; 17, 947–63
- [19] Rogers S.L., Friedhoff L.T., Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following single oral doses. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 46(I), 1-6
- [20] Rogers S.L., Cooper N.M., Sukovaty R., Pederson J.E., Lee J.N., Friedhoff L.T., Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCL following multiple oral doses. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1998; 46(I), 7-12
- [21] Matsui K., Mishima M., Nagai Y., Absorption, distribution, metabolism, and excretion of donepezil (Aricept) after a single oral administration to rat. *Drug Metab. Dispos.*, 1999; 27, 1406–14
- [22] Sugimoto H., Yamanishi Y., Imura Y., Kawakami Y., Donepezil hydrochloride E2020 and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med.Chem.*, 2000; 7(3), 303-39
- [23] Sugimoto H., Structure activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: Donepezil hydrochloride for the treatment of Alzheimer's Disease. *Pure Appl. Chem.*, 1999; 71(11), 2031-37
- [24] Sugimoto H., Research and Development of Donepezil Hydrochloride a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. *Jpn. J. Pharmacol.*, 2002; 89(1), 7 – 20
- [25] ICH Q3A(R2). Impurities in New Drug Substances, CPMP/ICH/2737/99 Rev. 2, August 2002, available at <http://www.ema.europa.eu/> (accessed 28/9/14)
- [26] ICH Q3B(R2). Impurities in New Drug Products. CPMP/ICH/2738/99, August 2003, available at <http://www.ema.europa.eu/> (accessed 28/9/14)
- [27] Ahuja S., Scypinski S., Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, 2001



- [28] Ohannesian L., Streeter A. J., Handbook of Pharmaceutical Analysis, Marcel Dekker, Inc., 2002
- [29] Brett C.M.A, Brett A.M.O., Electrochemistry, Principles, Methods and applications, Oxford University press, 1993, reprinted 2005
- [30] Scoog A., West D.M., Holler F.J., Analytical Chemistry, S.C.P., 1991
- [31] Despić A., Elektrohemijske tehnike i tehnologije, SANU, 2005
- [32] Wang J., Analytical Electrochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VCH, 2000
- [33] Bard A.J., Faulkner L.R., Electrochemical methods, Fundamentals and Applications, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, 2001
- [34] Despić A., Elektrohemijska, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2003
- [35] Kazakevich Y., Lobrutto R., HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley, 2007
- [36] Wada M., Alkhalil S. M., Nakashima K. N., Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples. Jordan J. Pharm. Sci., 2008; 1(1), 1-27
- [37] FDA Guidance for Industry. "Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics", Draft Guidance, 2015, <http://www.fda.gov/> (accessed 28/9/14)
- [38] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Terminology CPMP/ICH/381/95, June 1995, <http://www.ema.europa.eu/> (accessed 28/9/14)
- [39] Ardrey R.E, Liquid Chromatography–Mass Spectrometry:Introduction, Wiley, 2003
- [40] Niessen Wilfried M.A., Liquid-Chromatography-Mass spectrometry, Wiley, 2003
- [41] Lee S.M., LC/MS Application in Drug Development, Wiley, 2002
- [42] Rao C.N., Subbarayudu K., Venkateswarlu P., Electrochemical Reduction behaviour of Donepezil at  $\beta$ -Cyclodextrin Modified Carbon Paste Electrode. Port. Electrochim. Acta, 2010; 28(5), 349-57
- [43] Golcu, A. Ozkan, S. A, Electroanalytical determination of donepezil HCl in tablets and human serum by differential pulse and osteryoung square wave voltammetry at a glassy carbon electrode. Pharmazie, 2006; 61(9), 760-65
- [44] Sayed A. S., Mohamed F. Y., El-Sayed A.F.L., Stability Indicating Methods for Determination of Donepezil Hydrochloride According to ICH Guidelines. Chem. Pharm. Bull., 2006; 54(10), 1447-50
- [45] Sangshetti J.N., Mahaparale P.R., Paramane S. And Shinde D.B., Spectrophotometric Estimation of Donepezil Hydrochloride in Bulk and Tablet formulation. Trends Appl. Sci. Res., 2008; 3(1), 109-12

- [46] United States Pharmacopoeia USP 38<sup>th</sup> ed. 2015 [accessed 09/09/15] (str. 3196-98)
- [47] Pappa H, Farru R, Vilanova O, Palacios M and Pizzorno T, A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002; 27, 177-82
- [48] Yamreudeewong W, Dolence EK and Pahl D, Stability of donepezil in an extemporaneously prepared oral liquid. *J. Pharm. Pract.*, 2006; 19, 282-85
- [49] Kafkala S, Matthaiou S, Alexaki P, Abatzis M, Bartseliotis A and Katsiabani M., New gradient high-performance liquid chromatography method for determination of donepezil hydrochloride assay and impurities content in oral pharmaceutical formulation. *J. Chromatogr. A*, 2008; 1189, 392-97
- [50] Chothe P. Paresh, Subramanian C. Ramaa, Kadam J. Vilasrao, Stability Assessment Of Donepezil Hydrochloride Using Validated RP-HPLC Method. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.*, 2010; 1 (3), 296-05
- [51] Mostafa Gamal A., Al-Zoman Nourah Z., Hefnawy Mohamed M., Al-Majed Abdul-Rahman A., Alanazi Amer M., Chiral stability-indicating HPLC method for analysis of Donepezil in pharmaceutical formulations. *Dig. J. Nanomater. Bios.*, 2013; 8(2), 825-34
- [52] Srinivasan V., Sivaramakrishnan H., Karthikeyan B., Renugadevi G., Balaji T.S. and Vijayabaskar S., A new validated, stability-indicating, rp-uplc method for determination of donepezil HCl assay and impurities content in bulk drug. *Int. J. Curr. Res.*, 2010; 5, 88-96
- [53] Ahmed Reema H., Bhusari K.P& Tajne M.R, Stress degradation studies and development of validated stability indicating method for assay of donepezil. *Journal of Global Pharma Technology*, 2011; 3(11); 1-7
- [54] Matsui K, Oda Y, Nakata H., Yoshimura T., Simultaneous determination of donepezil (aricept) enantiomers in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1999; 729, 147-55
- [55] Xie Z, Liao Q, Xu X, Yao M, Wan J and Liu D., Rapid and sensitive determination of donepezil in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2006; 20, 3193-98
- [56] Radwan MA, Abdine HH, Al-Quadeb BT, Aboul-Enein HY and Nakashima K., Stereoslective HPLC assay of donepezil enantiomers with UV detection and its application to pharmacokinetics in rats. *J. Chromatogr. B*, 2006; 830, 114-19

- [57] Yasui-Furukori N, Furuya R, Takahata T and Tateishi T., Determination of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B*, 2002;768,261-65
- [58] Patel BN, Sharma N, Sanyal M and Shrivastav PS, Quantitation of donepezil and its active metabolite 6-O-desmethyl donepezil in human plasma by a selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Anal. Chim. Acta*, 2008; 629, 145-157
- [59] Haginaka J., Seyama C., Determination of enantiomers of 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon)-2-yl]methylpiperidine hydrochloride (E2020), a centrally acting acetylcholine esterase inhibitor, in plasma by liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Chromatogr.*, 1992; 577(1), 95-102
- [60] Mostafa Gamal A.E., Abonassif Mohammed A., Hefnawy Mohammed M., Kassem Mohamed G., Determination of donepezil hydrochloride in human plasma and pharmaceutical formulations by HPLC with fluorescence detection. *Acta Pharm.*, 2011; 61, 403–413
- [61] Patel P.K. and Barot Tushar G., RP-HPLC Method for the Estimation of Donepezil Hydrochloride Dosage Form. *E-J. Chem.*, 2009; 6(2), 594-600
- [62] Kumar T. Senthil, Solairaj P., Thangathirupathi A., Analytical method development and validation of donepezil hydrochloride in tablets by RPHPLC. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011; 3 (3), 62-65
- [63] Reddy K.V.S.R. K., Babu J. M., Kumar P. A., Chandrashekar E.R.R., Mathad Vijayavithal T., Eswaraiah S., Reddy M. S., Vyas K., Identification and characterization of potential impurities of donepezil. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004; 35, 1047–58
- [64] Dutt S., Khokra S. L., Kumar H., Prashar D., Evaluation of Donepezil Hydrochloride Using Various Physical Parameters. *Int. J. Pharm. Clin. Res.*, 2011; 3(3), 63-65
- [65] Shetti P., Venkatachalam A., Development and validation of novel LC-MS method for quantification of donepezil from human plasma. *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, 2011 3(3), 1667-74
- [66] Lal Khokra S., Dhamija H., Chandel A., Gupta S., Dutt D. and Parashar B., Validation of a new simple Reverse Phase-HPLC method for determination of Donepezil hydrochloride. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.*, 2012; 2(1), 307-317

- [67] Suneetha D., Rao L., Stability indication HPLC method for the determination of Donepezil hydrochloride in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Int. J. Pharm. Sci. Tech.*, 2011; 6(2), 34-43
- [68] Kim HuYnh-Ba, *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development, Regulations, Methodologies and Best Practices*, Springer, 2009
- [69] Tonnesen H.H., *The Photostability of Drugs and Drug Formulations*, Taylor & Francis, 2003
- [70] ICH Q1A(R2). *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, CPMP/ICH/2736/99, August 2003, available at <http://www.ema.europa.eu/> (accessed 28/9/14)
- [71] Baertschi S., Jansen P., *Stress testing: A predictive tool in Pharmaceutical Stress Testing*, CRC Press, 2005
- [72] Hotha K. K., Reddy S. P. K., Raju V. K., Ravindranath L.K., Forced degradation studies: Practical approach-overview of regulatory guidance and literature for the drug products and drug substances. *International Research Journal Of Pharmacy*, 2013; 4(5), 78-85
- [73] Maheswaran R., *FDA Perspectives: Scientific Considerations of Forced Degradation Studies in ANDA Submissions*. *Pharm. Technol.*, 2012; 36, 73-80.
- [74] Ranjit S., Rehman Z., Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *Indian J. Pharm. Educ.*, 2012; 2, 54-63
- [75] Michael. K., *Forced Degradation Studies: Regulatory Considerations and Implementation* Stress testing studies are conducted to challenge specificity of stability-indicating and impurity- monitoring methods as part of validation protocol. *Bio. Pharm. Int.* 2005; 18 (7), 1-7
- [76] Singh S., Bakshi M., "Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs". *Pharm. Technol.* 2000; 24, 1-14
- [77] Kovaleski J., Kraut B., Matiuz A., Giangiulio M., Brosbst G., Cango W. Impurities in generic pharmaceutical development. *Adverse Drug Rev.*, 2007; 59, 56-63
- [78] Bakshi M., Singh S., "Development of Validated Stability-Indicating Assay Methods: Critical Review". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 28, 1011-40
- [79] Hong D.D., Shah M., *Development and Validation of HPLC stability-indicating assays*, In: *Drug Stability: Principles and Practices*, J.T. Carstensen, C.T. Rhodes (Eds.) Marcel Dekker, New York, 2000; 329-84

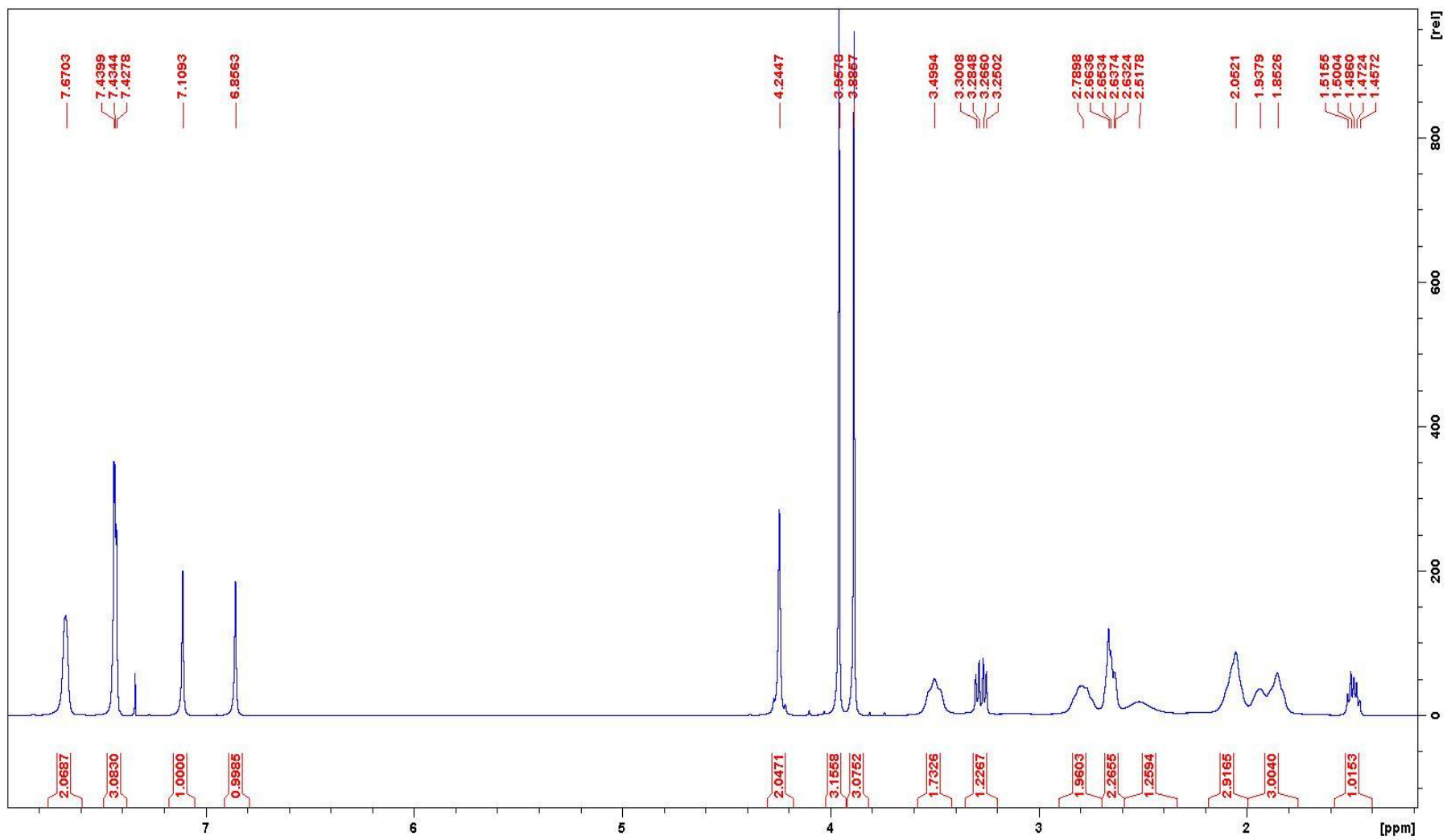
- [80] Min Li, *Organic Chemistry of Drug Degradation*, Royal Society of Chemistry, 2012
- [81] Waterman K.C., Adami R.C., Alsante K.M., Antipas A.S., Arenson D.R., Carrier R., Hong J., Landis MS., Lombardo F., Shah J.C., Shalaev E., Smith S.W., Wang H., Hydrolysis in pharmaceutical formulations. *Pharm. Dev. Technol.* 2002; 7(2), 113-46
- [82] Airaksinen S., Karjalainen M., Shevchenko A., Westermarck S., Leppänen E., Rantanen J., Yliruusi J., Role of water in the physical stability of solid dosage formulations. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94(10), 2147-65
- [83] Waterman KC, Adami RC, Alsante KM, Hong J, Landis MS, Lombardo F, Roberts CJ., Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharm Dev Technol.* 2002; 7, 1-32
- [84] Qiu Y., Chen Y., Zhang G.G.Z., Liu L., Porter W. R., *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory & Practice*, Elsevier Inc, 2009
- [85] Cosa G., Photodegradation and photosensitization in pharmaceutical products: Assessing drug phototoxicity. *Pure Appl. Chem.*, 2004; 76(2), 263–275
- [86] De Hoffmann E., Stroobant V., *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Wiley, 2007
- [87] Pramanik B., Lee M. S., Chen G., *Characterization of Impurities and Degradants Using Mass Spectrometry*, Wiley, 2011
- [88] Smith R. J., Webb M. L., *Analysis of Drug Impurities*, Blackwell Publishing, 2007
- [89] Mulla S., Rajendra N. M., Synthesis, Isolation and characterization of Donepezil open ring impurity. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2013; 5(3), 826-829
- [90] Ahuja S., Mills Alsante K., *Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals*, Academic Press 2003
- [91] Qiu F., Norwood D.L., Identification of pharmaceutical impurities. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2007; 30, 877–935
- [92] Kazakevich Y., Lobrutto R., *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, 2007
- [93] Holzgrabe U., Diehl B. W.K., Wawer I., NMR spectroscopy in pharmacy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998;17, 557–616
- [94] Keeler J., *Understanding NMR Spectroscopy*, University of Cambridge, Department of Chemistry. ©James Keeler, 2002
- [95] Jacobsen N. E., *NMR Spectroscopy Explained, Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*, University of Arizona, 2007

- [96] Claridge T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed. Chemistry Research Laboratory, Department of Chemistry, University of Oxford, 2009
- [97] Cembran, A.; Song, L.; Mo, Y.; Gao, J. Block-localized density functional theory (BLDFT), diabatic coupling, and their use in valence bond theory for representing reactive potential energy surfaces. *J. Chem. Theory Comput.*, 2009; 5, 2702–16
- [98] Lu, Z., Yang, W., Reaction path potential for complex systems derived from combined quantum mechanical and molecular mechanical calculations. *J. Chem. Phys.* 2004, 121, 89–100
- [99] Peters, B.; Heyden, A.; Bell, A. T.; Chakraborty, A., A growing string method for determining transition states: comparison to the nudged elastic band and string methods. *J. Chem. Phys.* 2004;120, 7877–86
- [100] Henkelman G, Uberuaga BP, Jonsson H, A climbing image nudged elastic band method for finding saddle points and minimum energy paths. *J. Chem. Phys.* 2000; 113, 9901–04
- [101] Olsen, R. A., Kroes, G. J., Henkelman, G., Arnaldsson, A., Jonsson, H., Comparison of methods for finding saddle points without knowledge of the final states. *J. Chem. Phys.*, 2004; 121, 9776–92
- [102] Cramer, C., *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2nd ed.; Wiley: West Sussex, England, 2004
- [103] Hemmer M.C., *Expert Systems in Chemistry Research*. CRC Press, 2008
- [104] Jorgensen W. L., CAMEO: a program from the logical prediction of the products of organic reactions. *Pure Appl. Chem.* 1990; 62, 1921–32
- [105] Hollering R., Gasteiger J., Steinhauer L., Schulz K.-P., Herwig A., Simulation of organic reactions: from the degradation of chemicals to combinatorial synthesis. *J. Chem. Inf. Model.* 2000; 40, 482–94
- [106] Socorro, I. M.; Taylor, K.; Goodman, J. M. ROBIA: a reaction prediction program. *Org. Lett.*, 2005; 7, 3541–44
- [107] Chen J. H., Baldi P., Synthesis explorer: a chemical reaction tutorial system for organic synthesis design and mechanism prediction. *J. Chem. Educ.*, 2008; 85, 1699–03
- [108] Chen J. H., Baldi P., No electron left behind: a rule-based expert system to predict chemical reactions and reaction mechanisms. *J. Chem. Inf. Model.*, 2009; 49, 2034–43
- [109] Rose P., Gasteiger J., Automated derivation of reaction rules for the EROS 6.0 system for reaction prediction. *Anal. Chim. Acta*, 1990; 235, 163–68

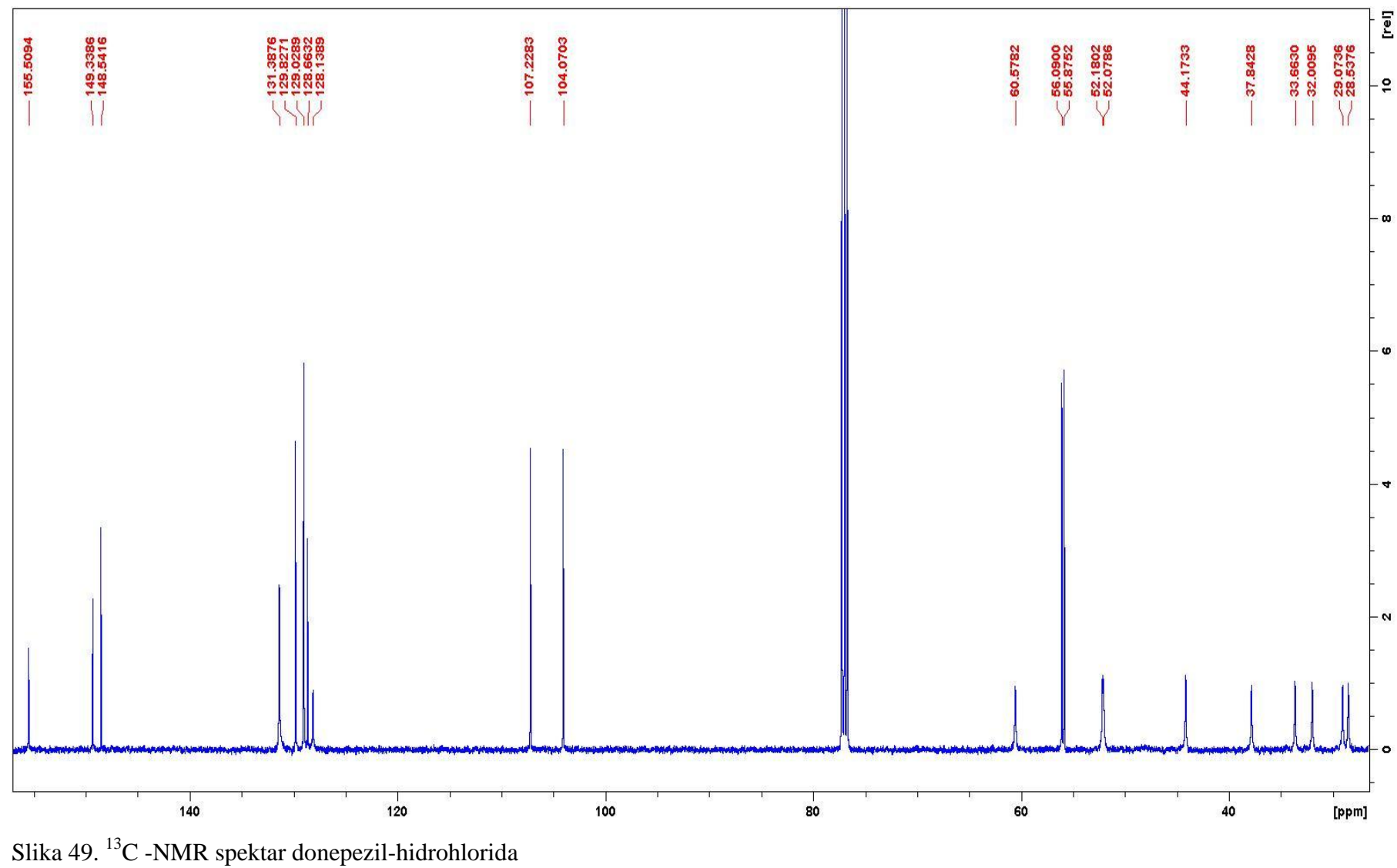
- [110] Mladenović A., Mijin D., Drmanić S., Vajs V., Jovanović V., Petrović S., Avramov-Ivić M., Electrochemical oxidation of donepezil and its voltametric determination at gold electrode, *Electroanalysis* 2014; 26 (5), 893–97
- [111] Krizmanic I., Lerman L., Samardzic Z., Kaczorowska K., Manikowski A., Zioro B., Grebenar I., Koruznjak J. D., US Patent Application 0298879A1 2009
- [112] Manikowski A., Ziobro B., Zaba A., Makosza M., Jerkovic J., Grebenar I., Mestrovic E., Mastelic Samardzic Z., Lerman L., Kaczorowska K., US Patent Application 0137811 A1 2009
- [113] Iimura Y., Naito T., Senaga M., Yamanishi Y., Japan Patent 09268176 A, 1997, CAN127:293137
- [114] Mladenović A., Jadranin M., Pavlović A., Petrović S., Drmanić S., Avramov-Ivić M., Mijin D., Liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of donepezil degradation products, *Chem. Ind. & Chem. Eng. Q.* 2015, 21 (3), 447-55
- [115] Monkovic I., Wong H., Bachand C., Secondary amines from the iron(II) ion-catalyzed reaction of amine oxides: A general method for the dealkylation of tertiary amines. *Synthesis-Stuttgart*, 1985; 8, 770–73
- [116] Prakash G.S., Krass N., Wand Q., Olah G.A., Electrophilic hydroxylation of aromatics with sodium perborate/trifluoromethane sulfonic acid. *Synlett* 1991; 4, 39-40
- [117] Matsuura T., Omura K., Photochemical hydroxylation of aromatic compounds. *Synthesis* 1976; 3:173-84
- [118] Meier-Davis SR, Murgasova R, Toole C, Arjmand FM, Diehl L, Comparison of Metabolism of Donepezil in Rat, Mini-Pig and Human, Following Oral and Transdermal Administration, and in an *in vitro* Model of Human Epidermis. *J. Drug. Metab. Toxicol.*, 2012; 3:129. doi: 10.4172/2157-7609.1000129
- [119] United States Pharmacopoeia USP 38<sup>th</sup> ed. 2015 [accessed 09/09/15] (str. 7384-86)
- [120] Karakhanov E.A., Narin S.Yu., Dedov A.G., On the mechanism of catalytic hydroxylation of aromatic hydrocarbons by hydrogen peroxide. *Appl. Organomet. Chem.*, 1991; 5(6), 445–61
- [121] Meunier G., Meunier B., Peroxidase-catalyzed *O*-Demethylation reactions. *J. Biol. Chem.*, 1985, 19(5), 10576-582

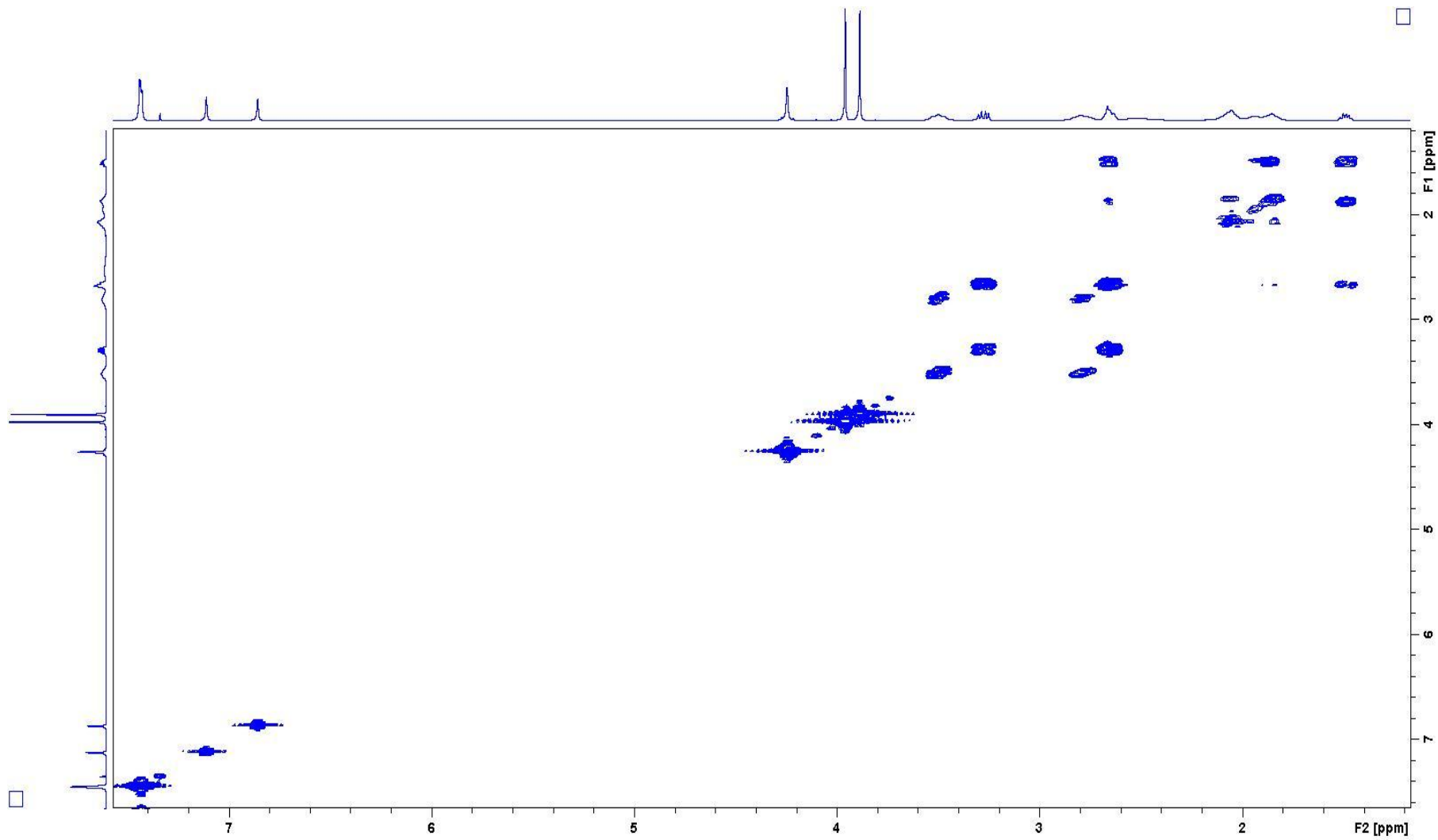
## **7. PRILOG**



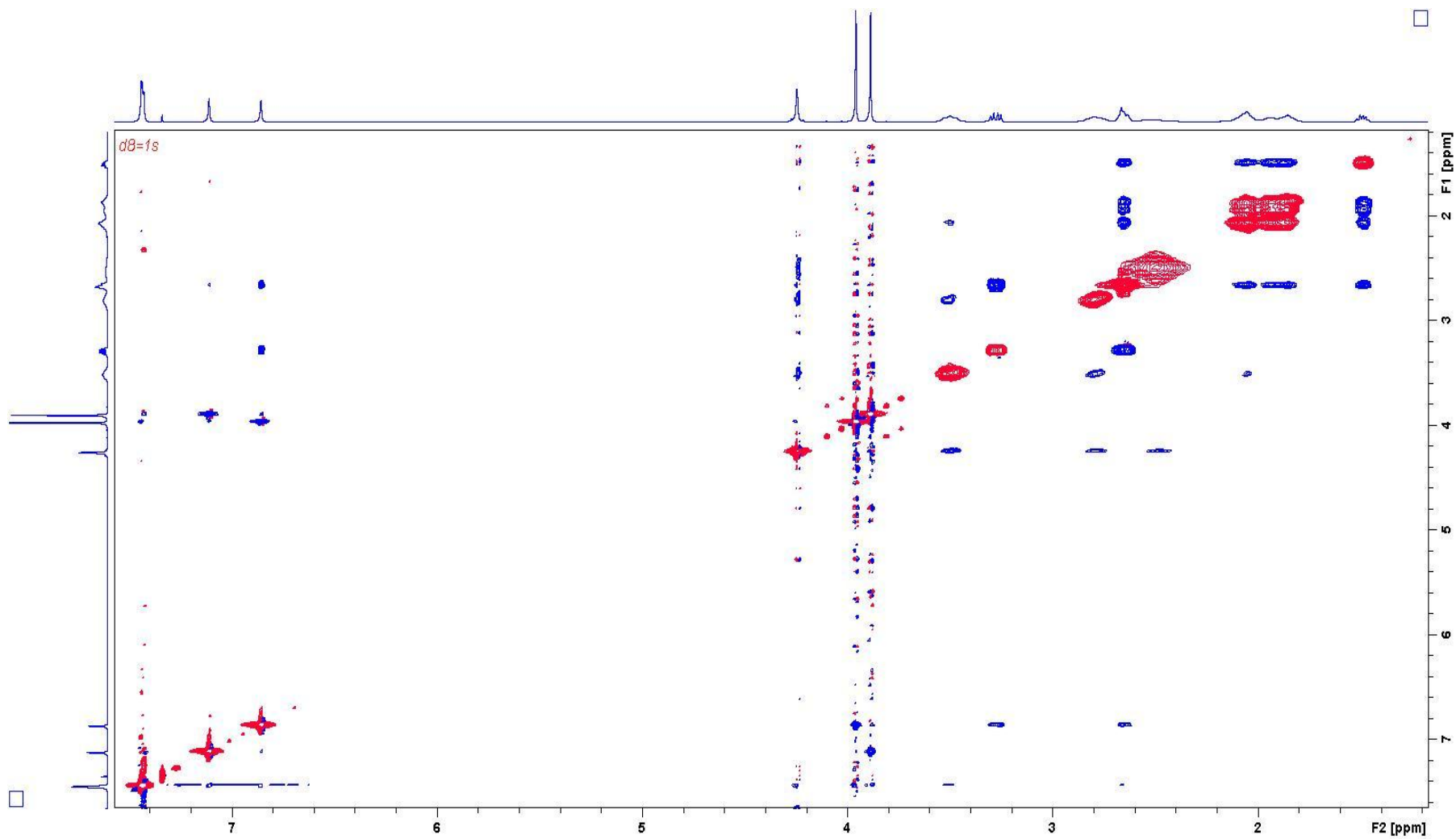


Slika 48. <sup>1</sup>H-NMR spektar donepezil-hidrohlorida

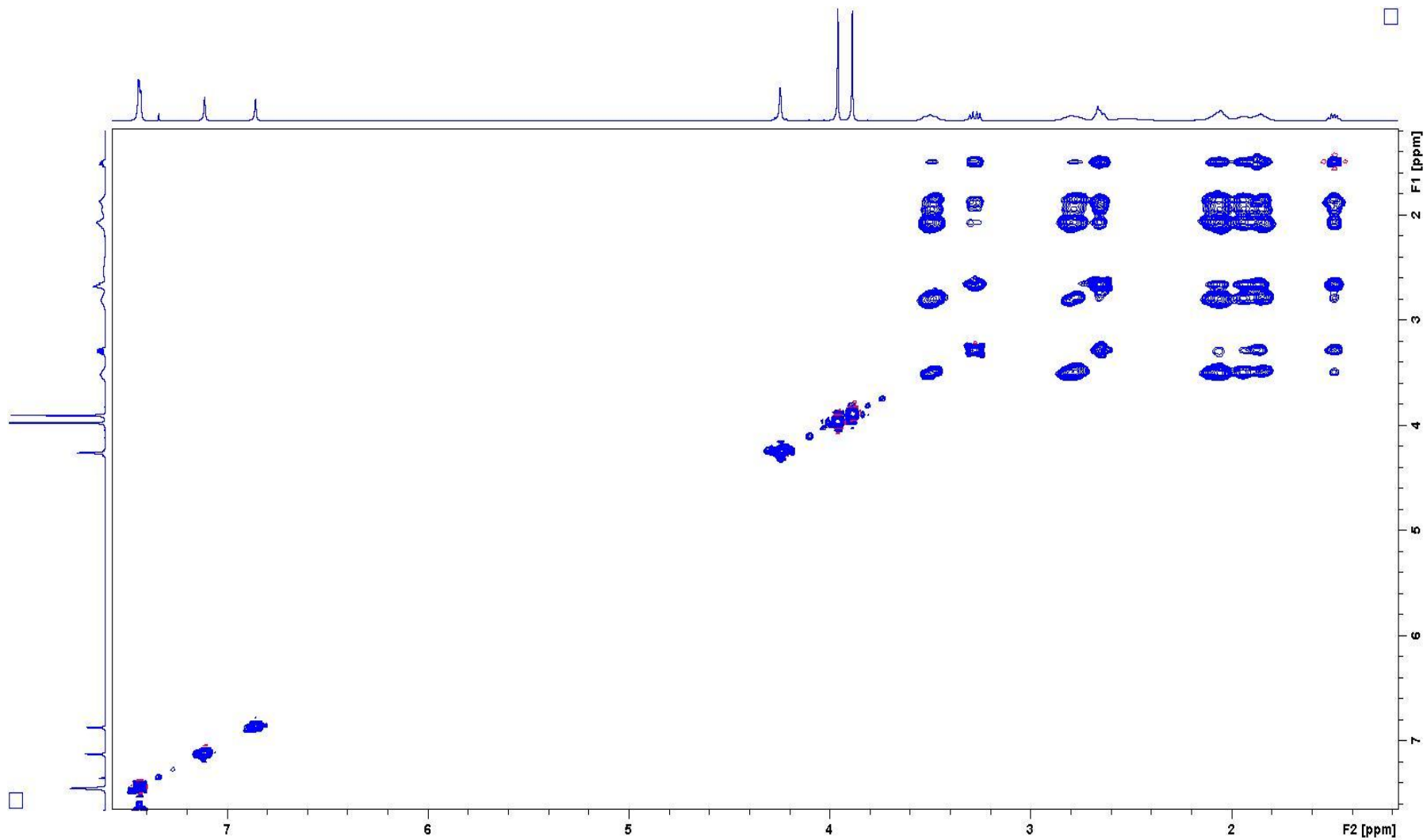




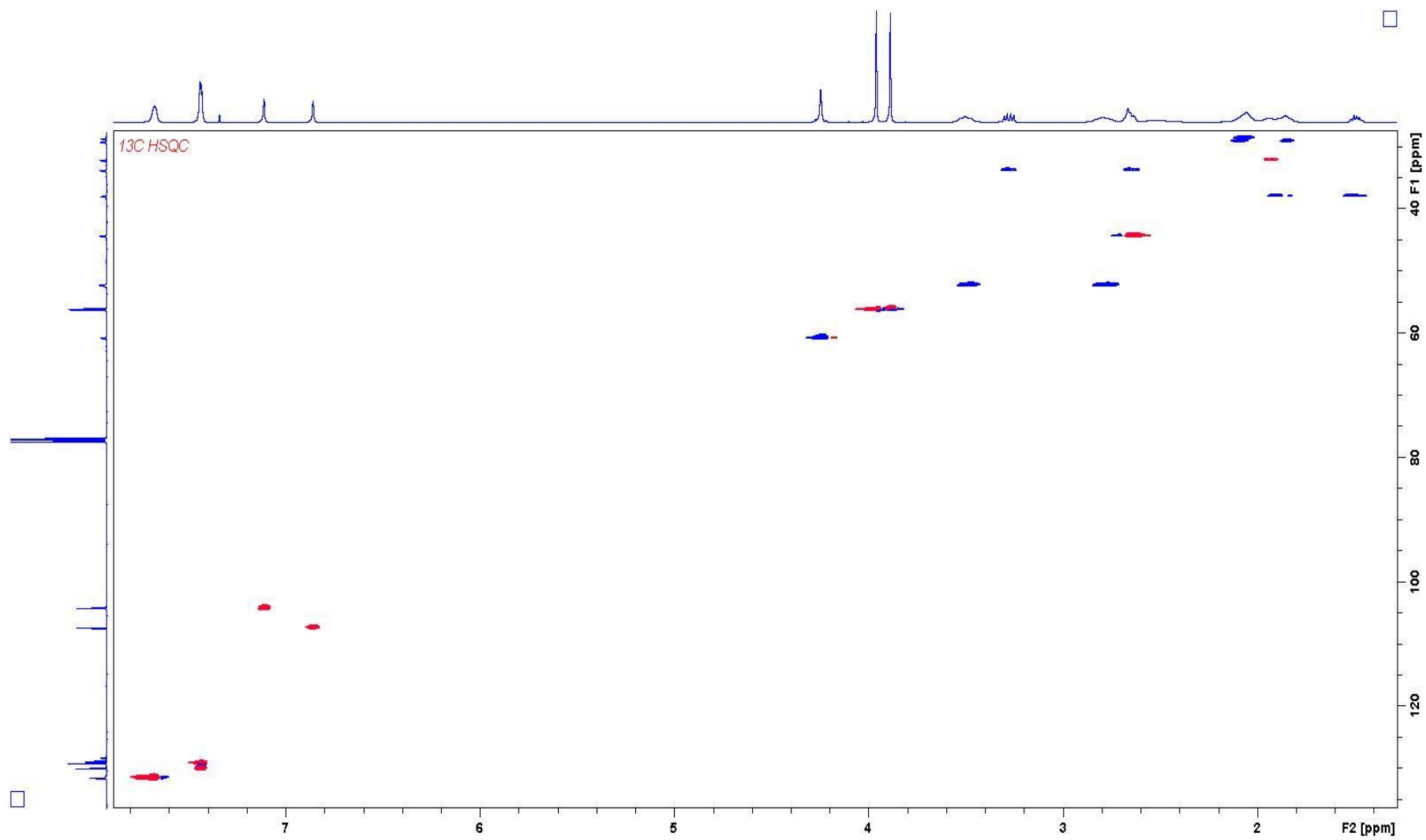
Slika 50. COSY NMR spektar donepezil-hidrohlorida



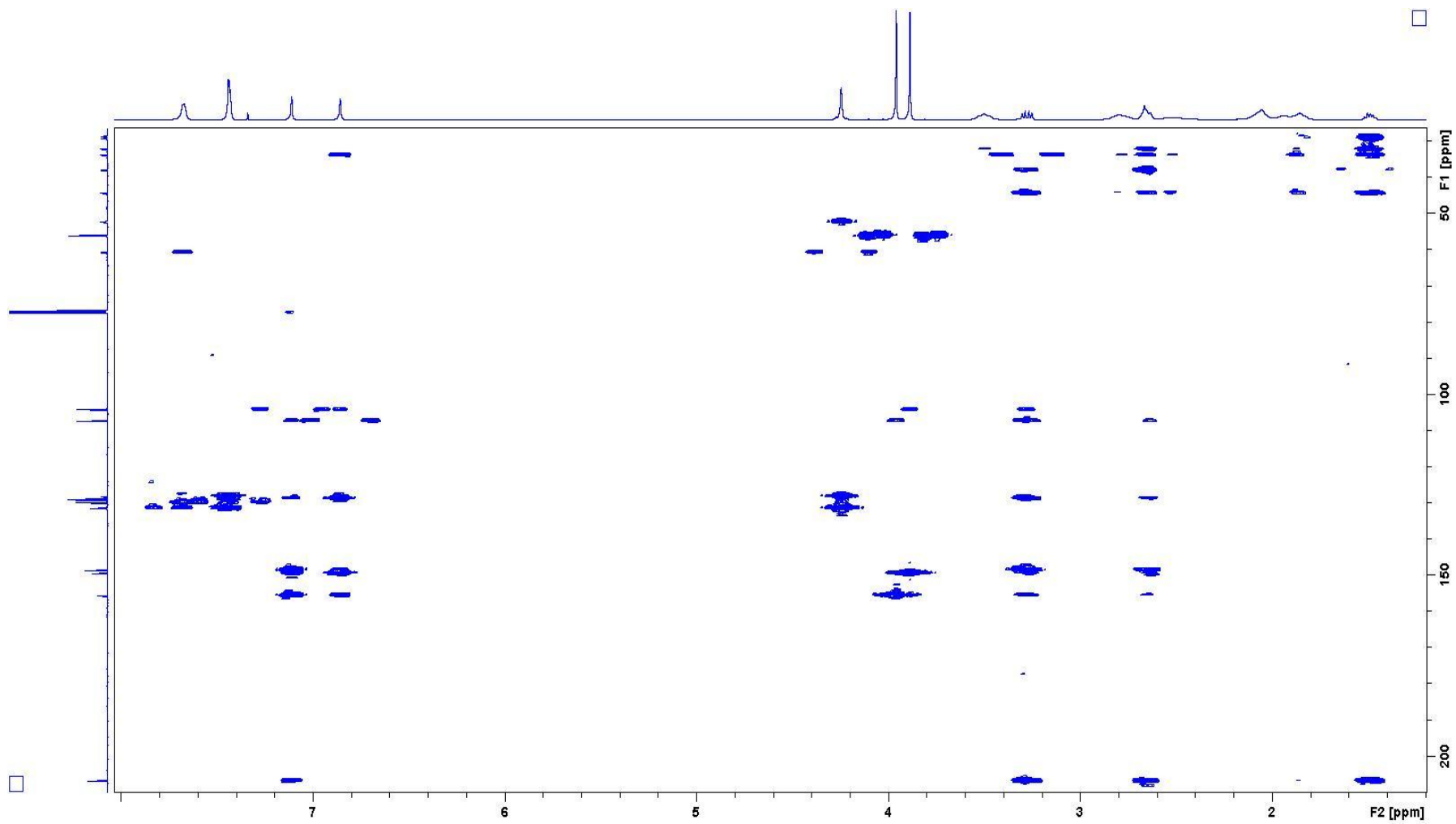
Slika 51. NOESY NMR spektar donepezil-hidrohlorida



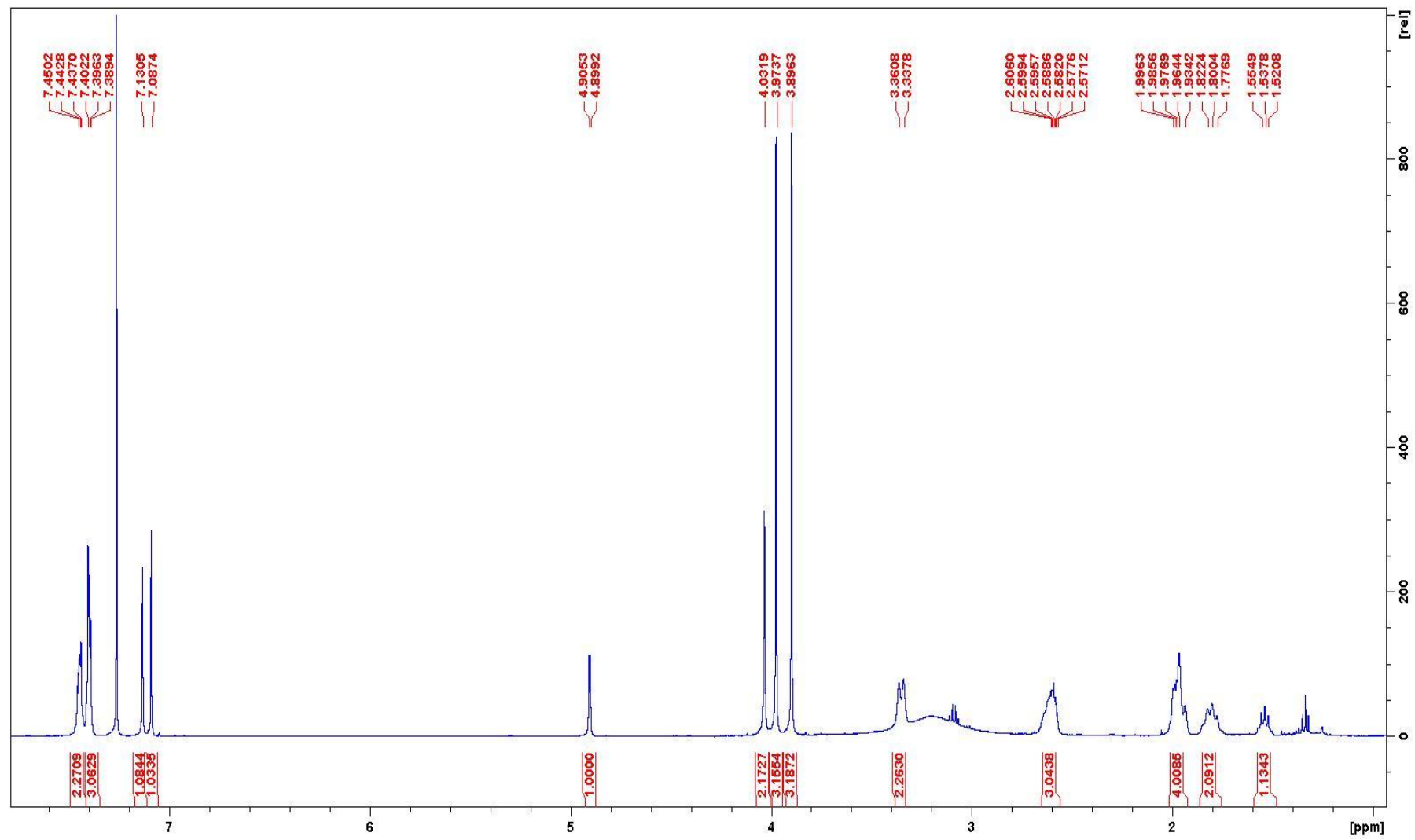
Slika 52. TOCSY NMR spektar donepezil-hidrohlorida



Slika 53. HSQC NMR spektar donepezil-hidrohlorida

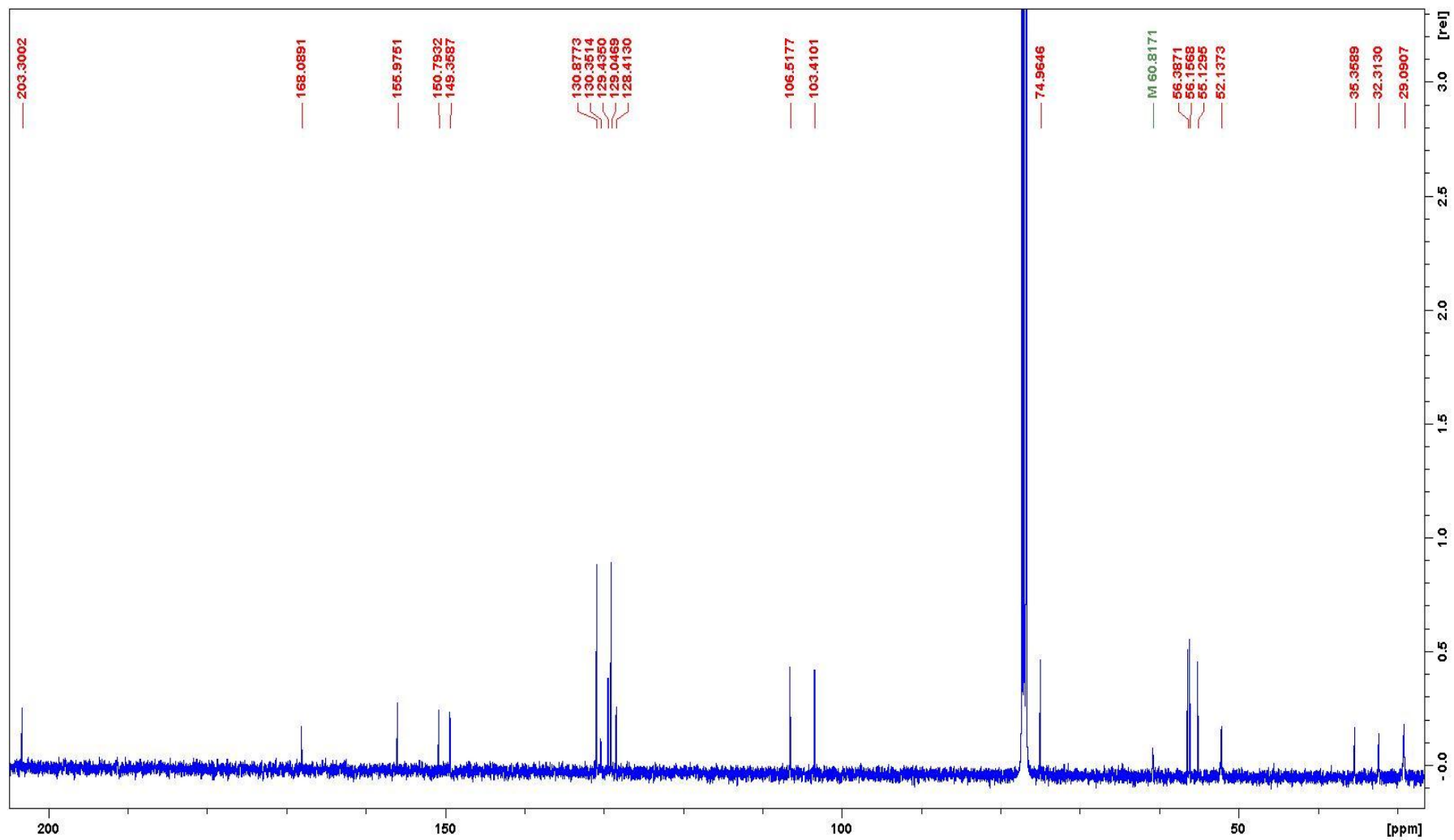


Slika 54. HMBC NMR spektar donepezil-hidrohlorida



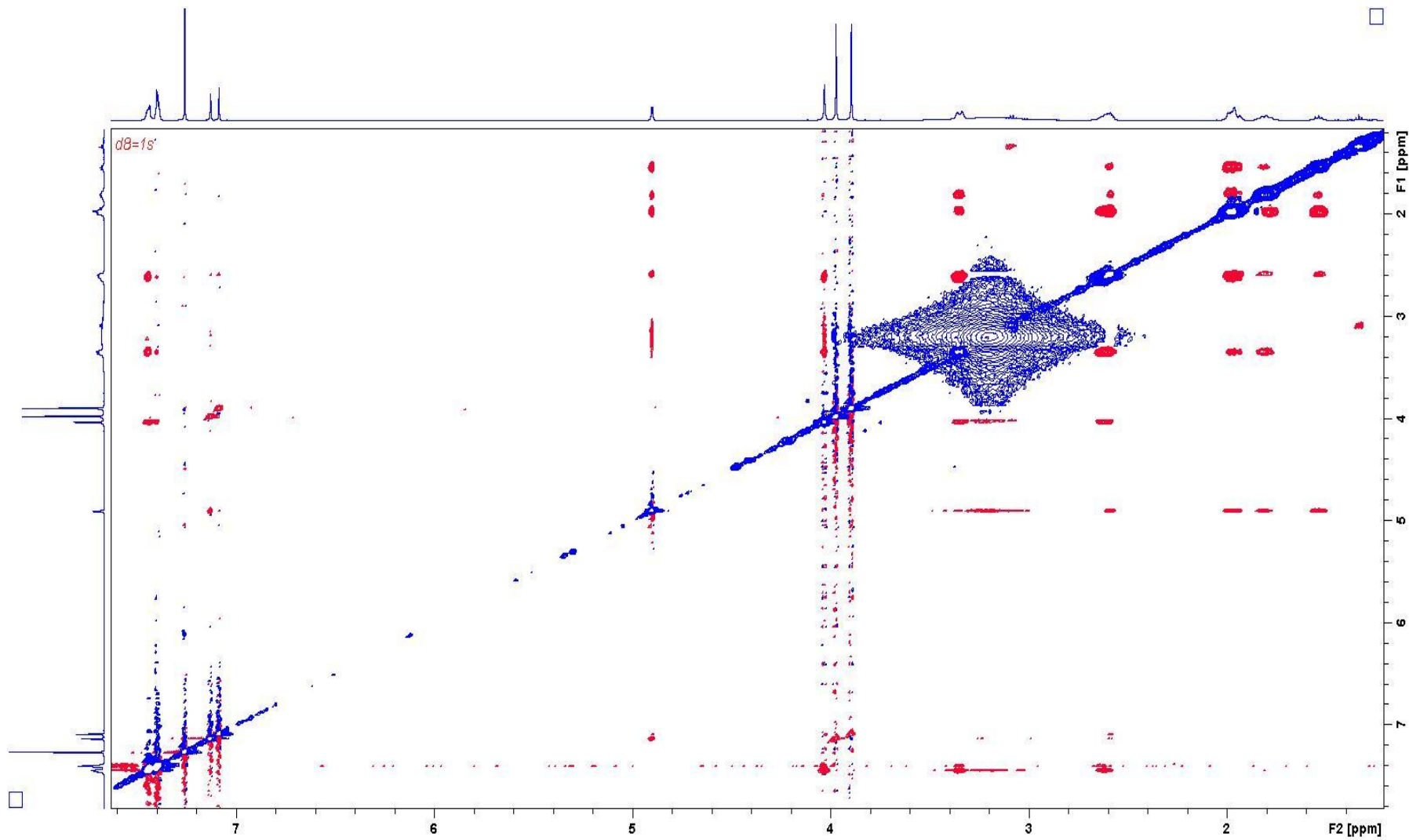
Slika 55.  $^1\text{H-NMR}$  spektar glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje donepezil-hidrohlorida



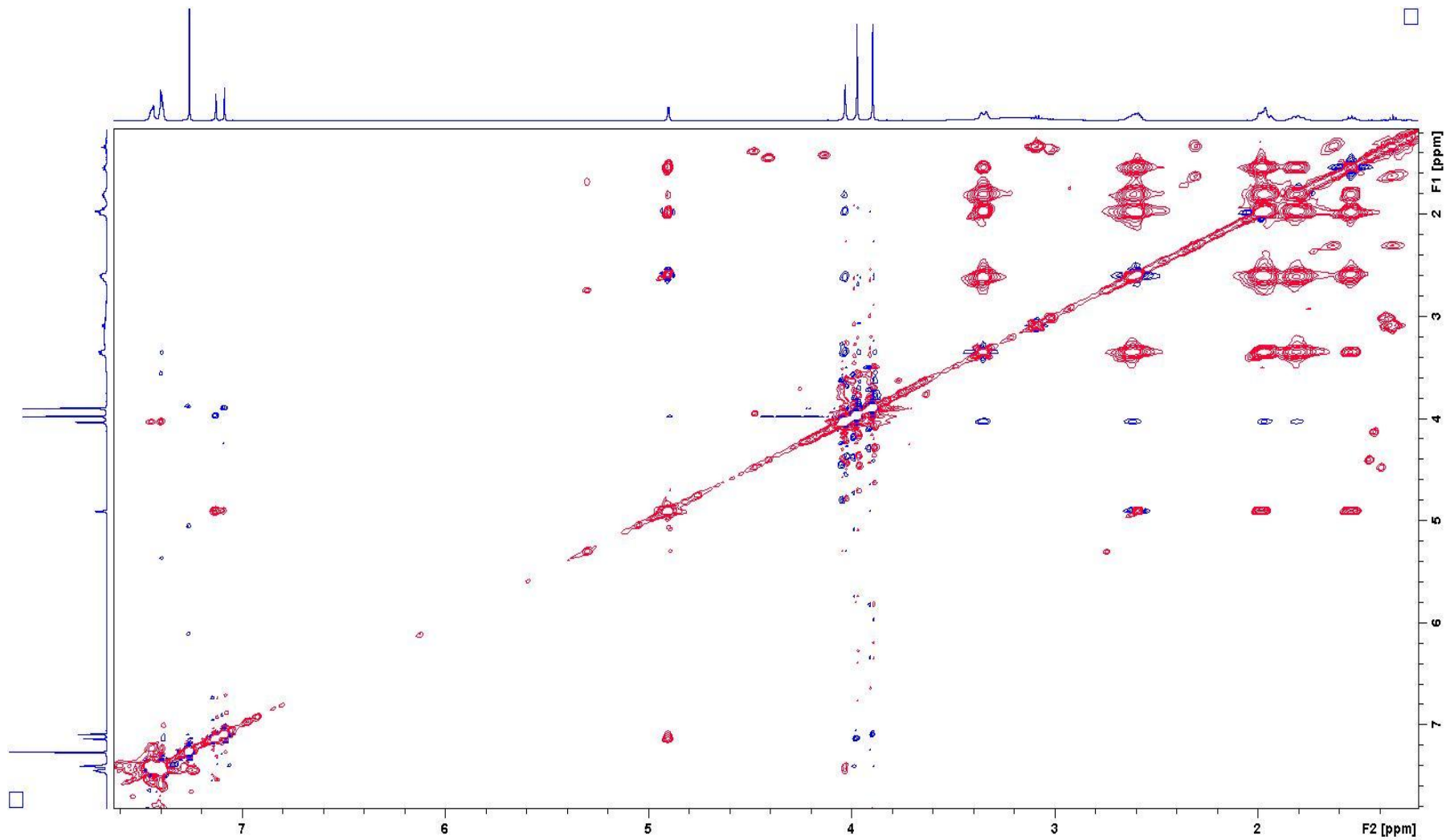


Slika 56.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektar glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje donepezil-hidroklorida

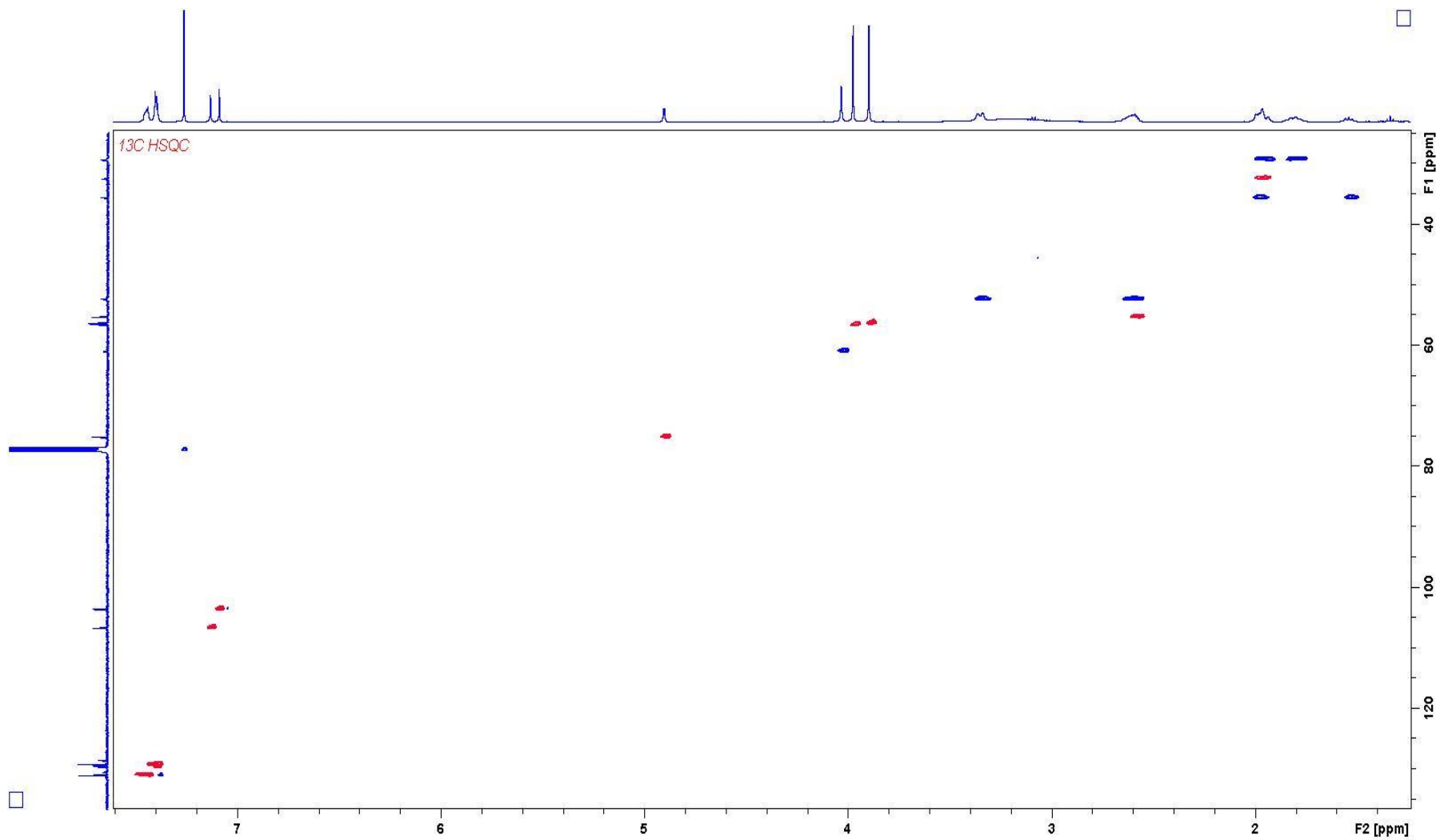




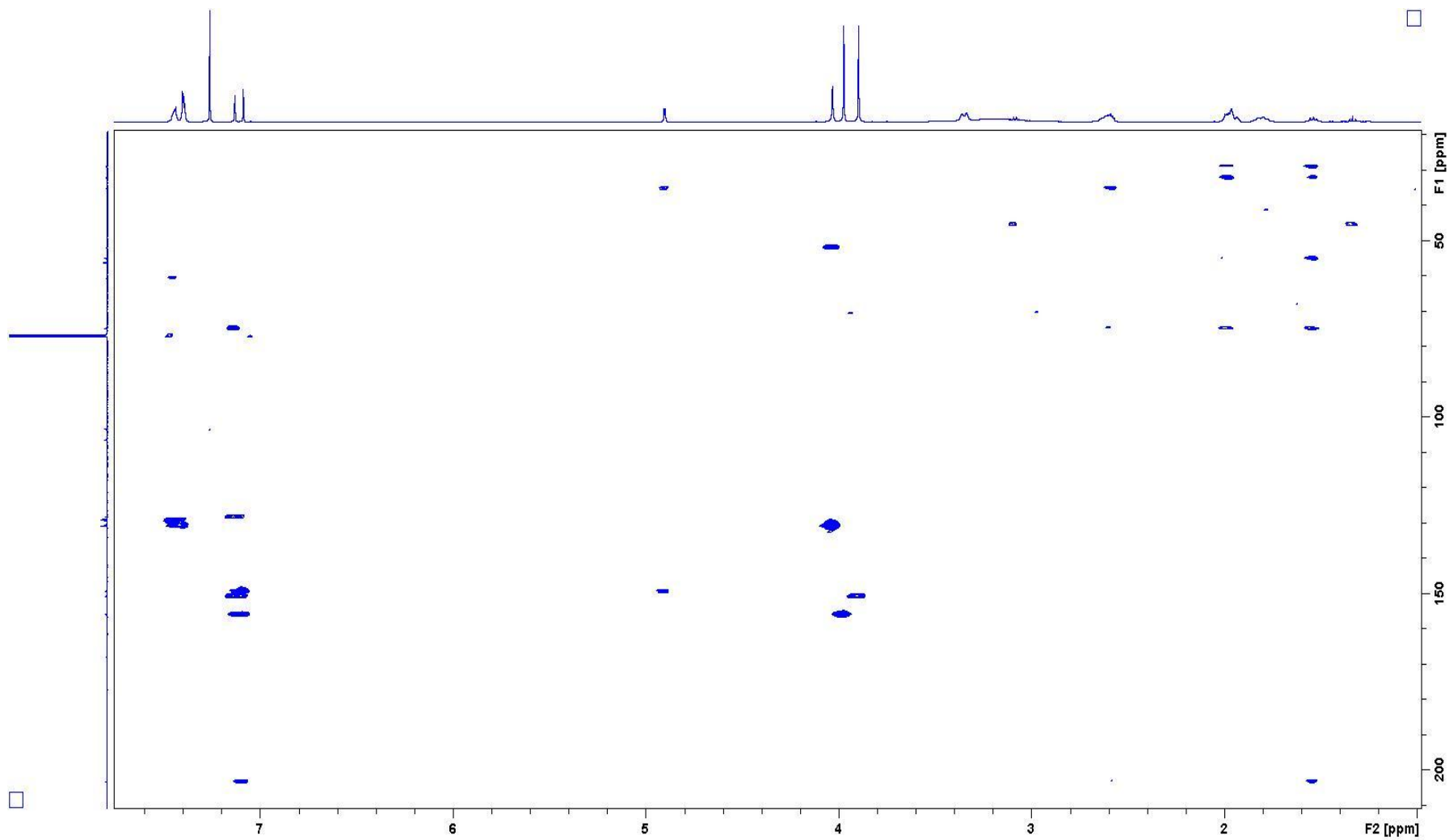
Slika 58. NOESY-NMR spektar glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje donepezil-hidrohlorida



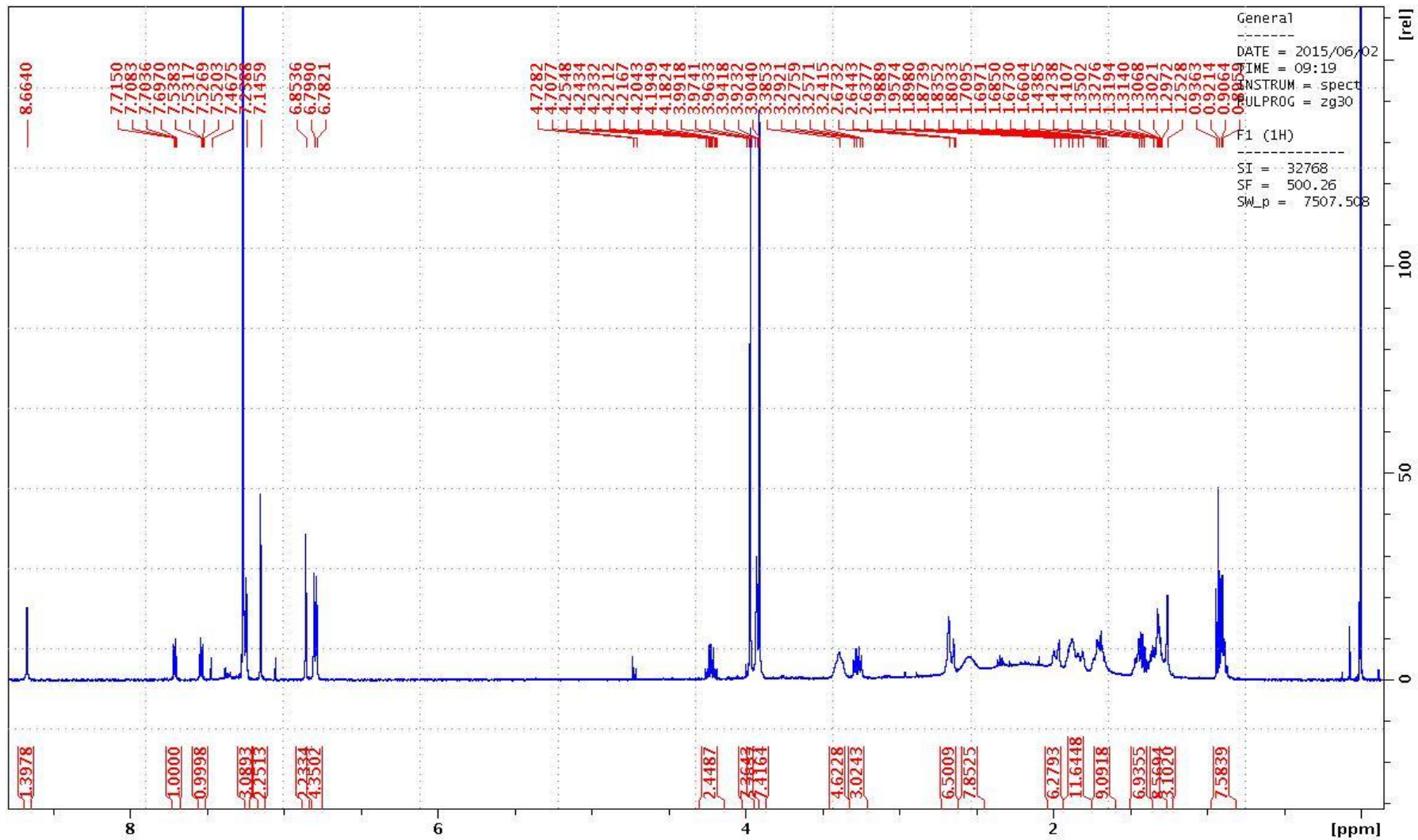
Slika 59. TOCSY-NMR spektar glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje donepezil-hidrohlorida



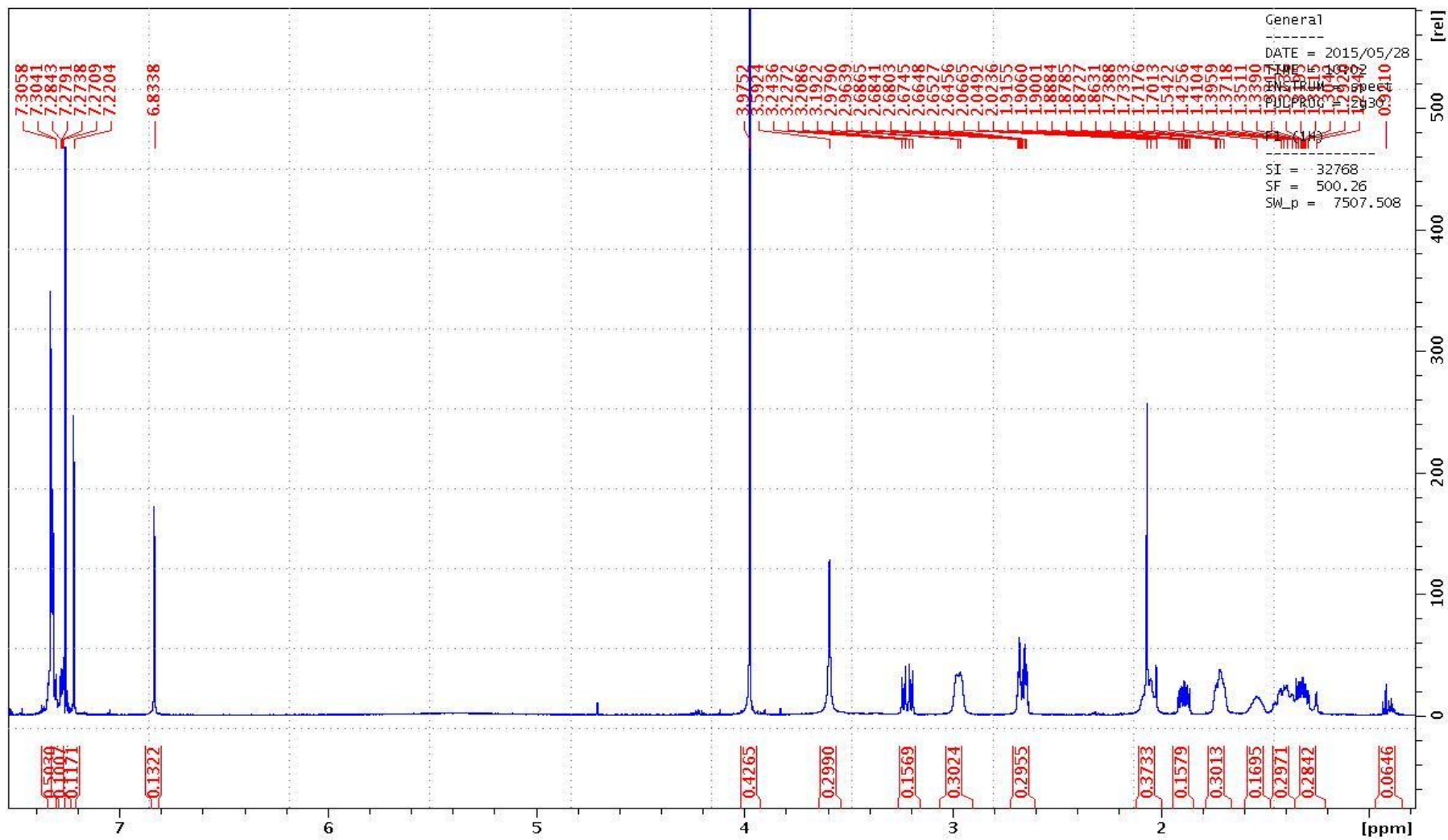
Slika 60. HSQC-NMR spektar glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje donepezil-hidroklorida



Slika 61. HMBC-NMR spektar glavnog proizvoda elektrohemijske razgradnje donepezil-hidroklorida

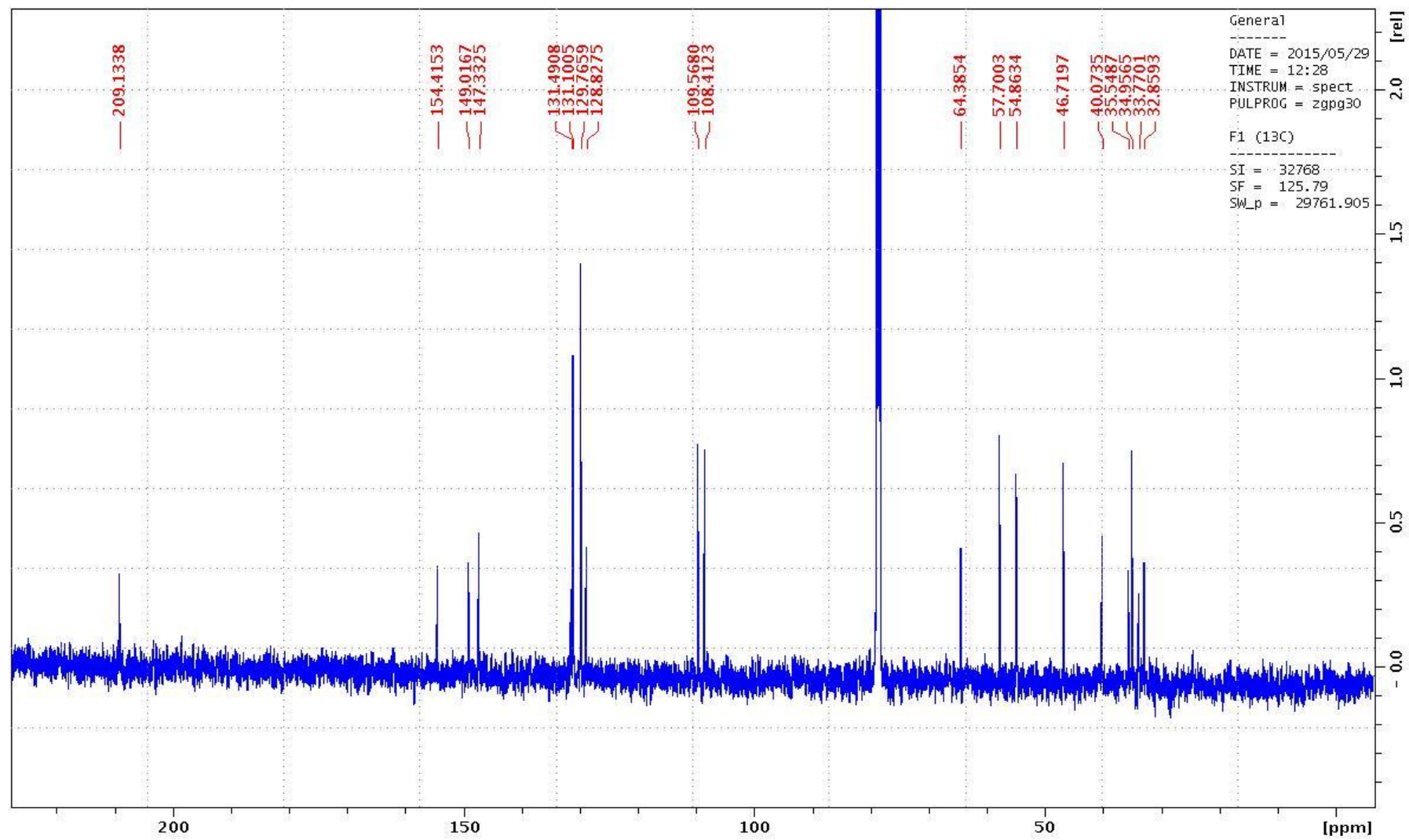


Slika 70. <sup>1</sup>H-NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,48

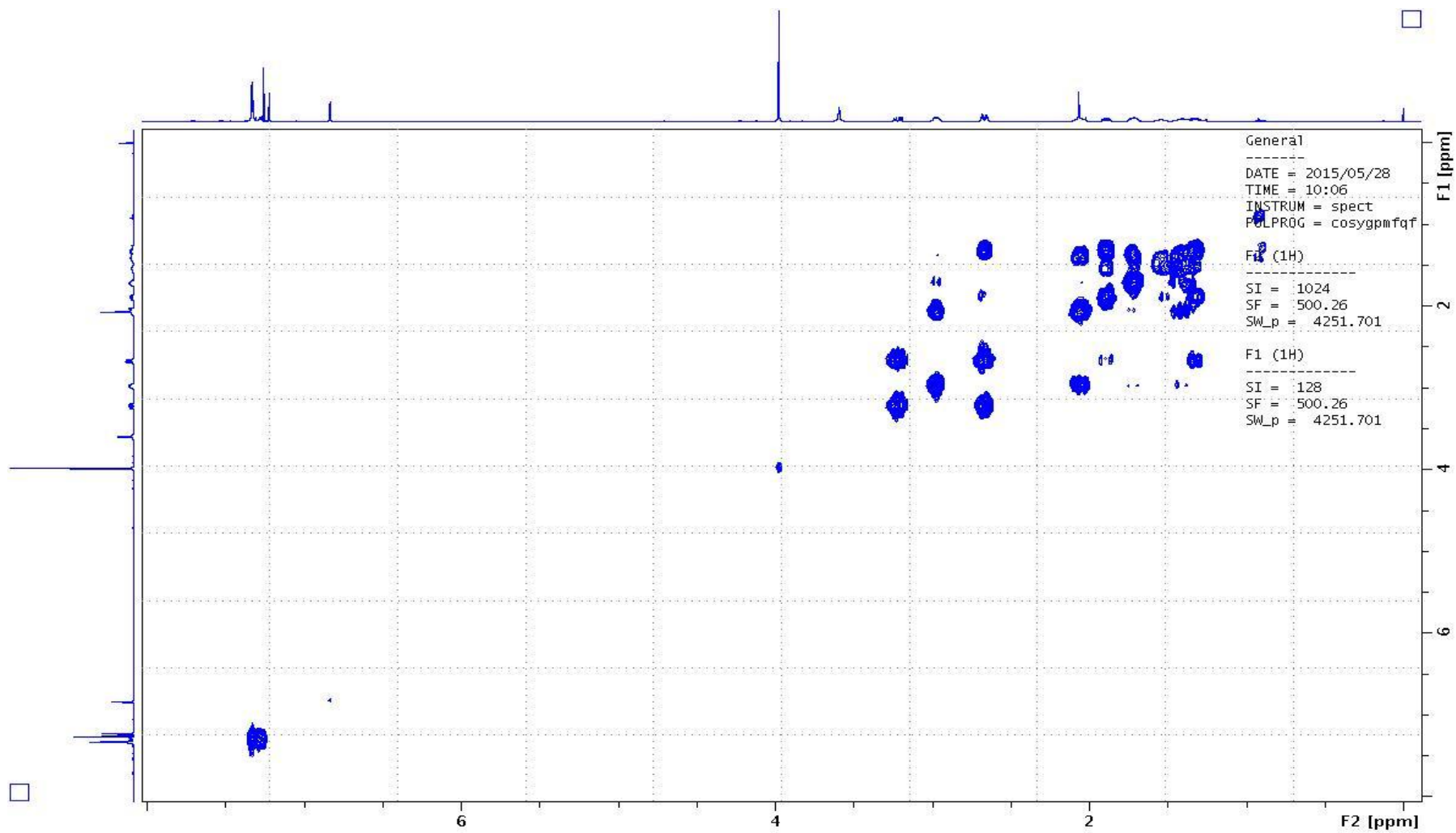


Slika 72. <sup>1</sup>H-NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58

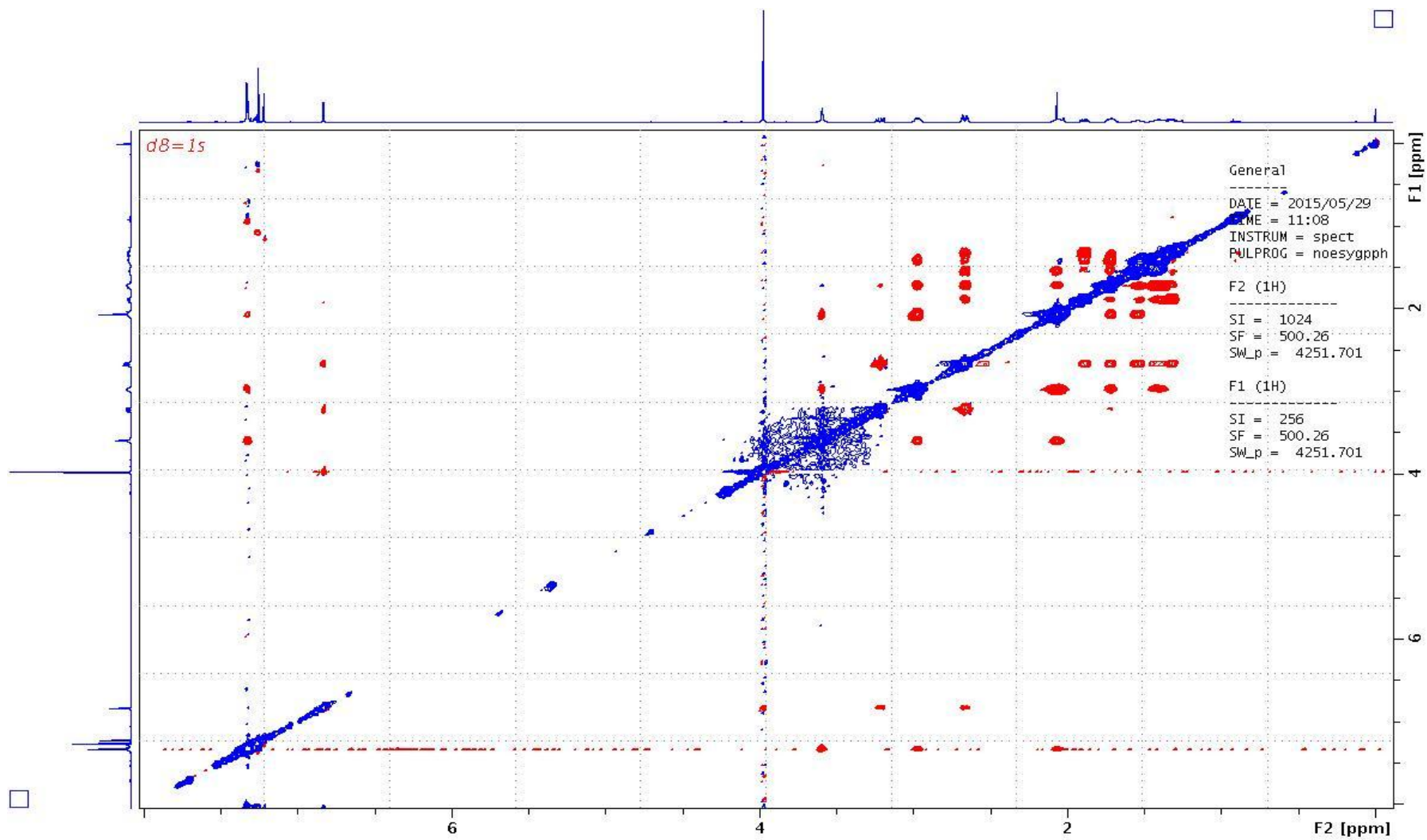




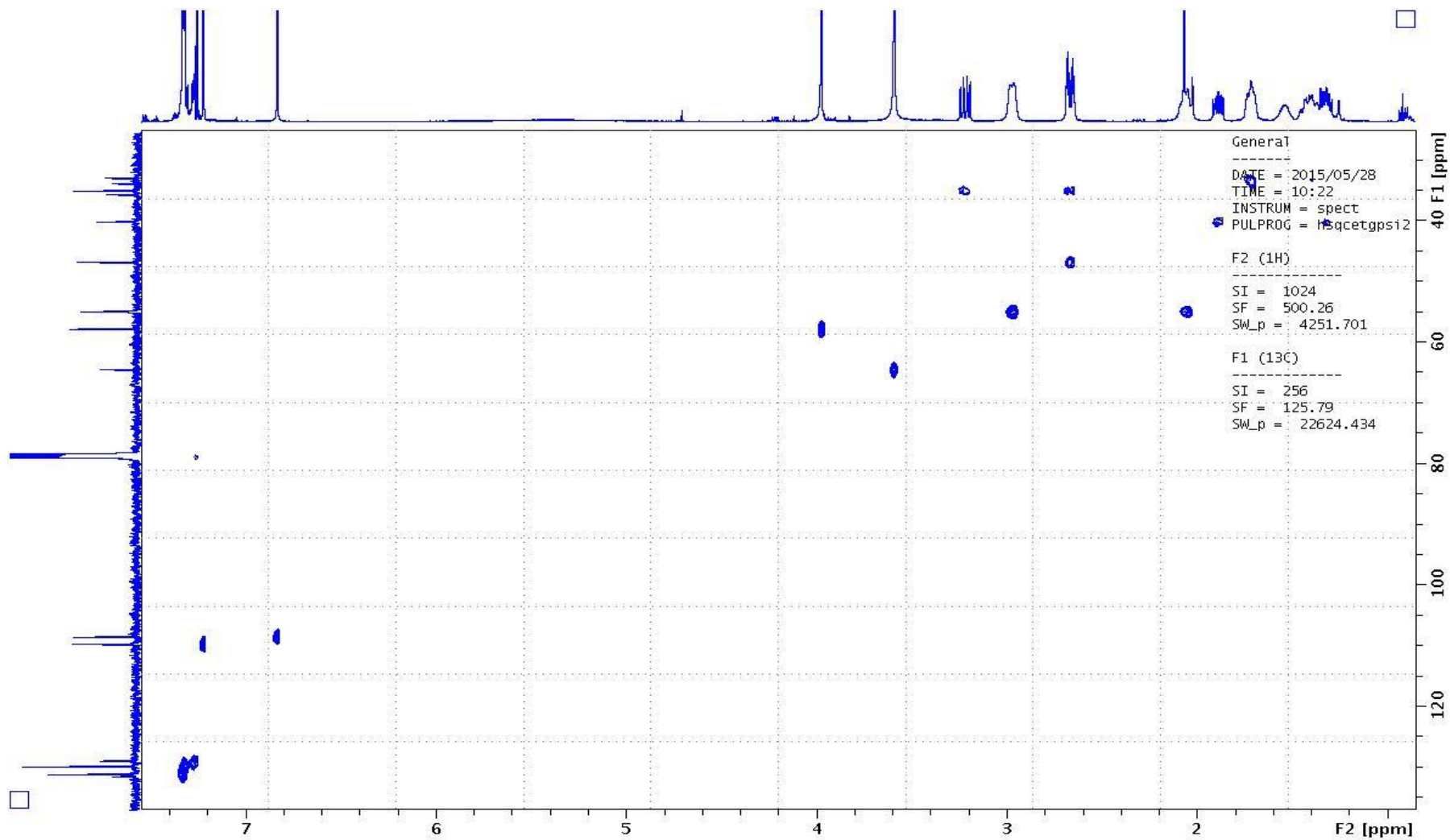
Slika 73.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58



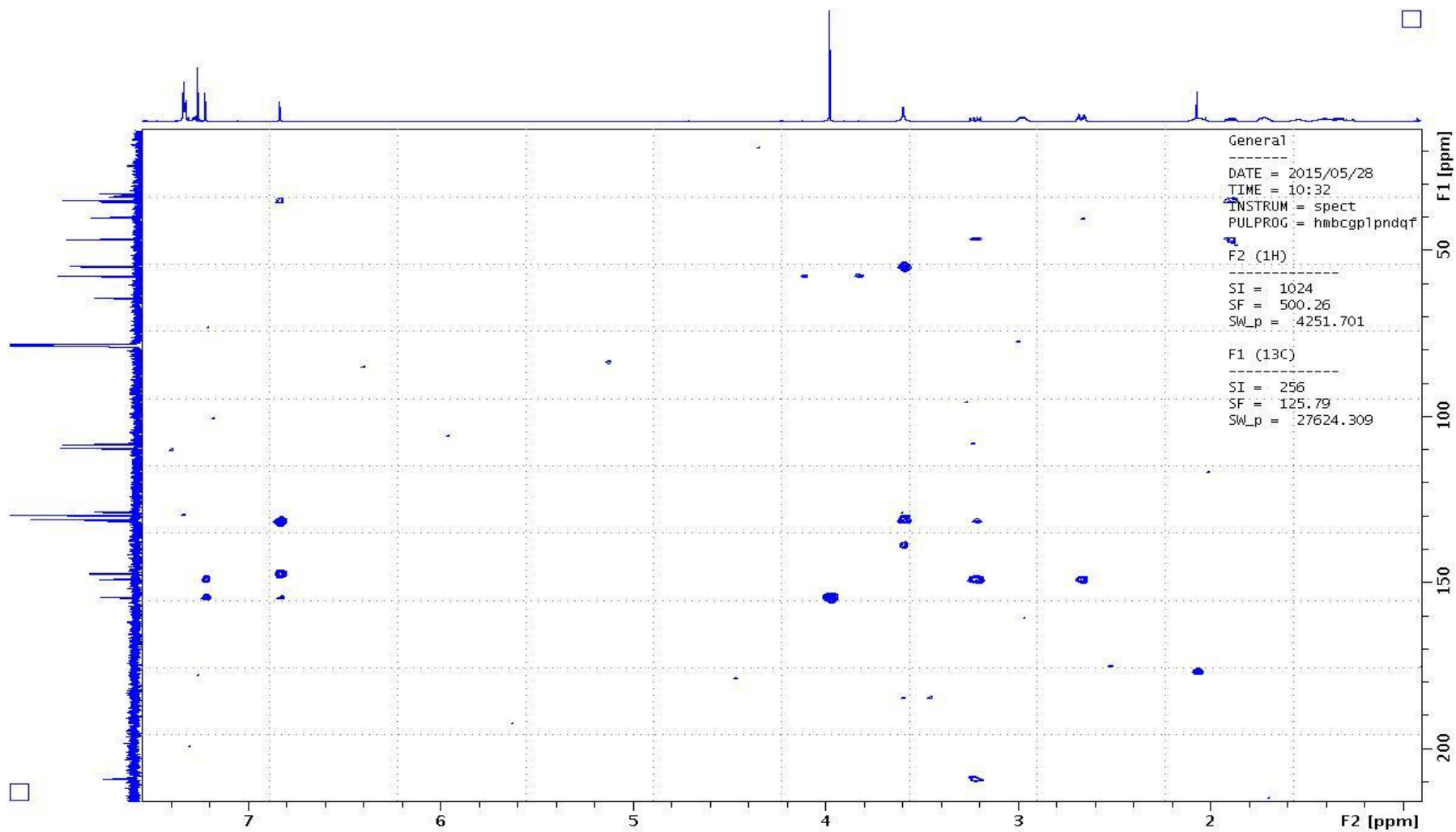
Slika 74. COSY NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58



Slika 75. NOESY NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58



Slika 76. HSQC NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58



Slika 77. HMBC NMR spektar nepoznatog razgradnog proizvoda RRT 0,58

## 8. BIOGRAFIJA KANDIDATA

Kandidat Aleksandar R. Mladenović rođen je 24.11.1978. godine u Zaječaru. Osnovnu i srednju školu završio je u Negotinu. Studije na Tehnološkom fakultetu u Beogradu upisao je 1997. godine, a diplomirao je na istom fakultetu 2003. godine i stekao zvanje diplomirani inženjer tehnologije za hemijsko inženjerstvo, sa prosečnom ocenom 9,19. Dobitnik je priznanja „Dr Panta Tutundžić” koje dodeljuje Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu za izuzetne uspehe postignute u toku redovnih studija (1998) i priznanja Srpskog hemijskog društva za uspeh postignut u toku studiranja (2003.godine).

Na Katedri za hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu upisao je doktorske studije 2011. Godine i položio sve ispite sa prosečnom ocenom 9,73.

Nakon završetka osnovnih studija, 2003. godine zapošljen je u Farmaceutsko-hemijskoj industriji Hemofarm A.D. Vršac. Radio je na poslovima stručnog saradnika u sektoru proizvodnje u pogonu injekcionih proizvoda. Od 2005. godine radi u Sektoru Istraživanja i razvoja u odeljenju razvoja analitike gde obavlja poslove na mestu samostalnog nosioca projekta.

## Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze

### M21. Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

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

### M23. Rad u međunarodnom časopisu

1. **Aleksandar R. Mladenović**, Milka B. Jadranin, Aleksandar D. Pavlović, Slobodan D. Petrović, Saša Ž. Drmanić, Milka L. Avramov-Ivić, Dušan Ž. Mijin, Liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of donepezil degradation products, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* (2015), OnLine-First (00):47-47 DOI:10.2298/CICEQ141023047M, ISSN 1451-9372.

2. **Aleksandar R. Mladenović**, Vladislava M. Jovanović, Slobodan D. Petrović, Dušan Ž. Mijin, Saša Ž. Drmanić, Milka L. Avramov-Ivić, Determination of clopidogrel using square wave voltammetry at gold electrode, *J. Serb. Chem. Soc.* (2013), vol.78 br.12, str. 2131-2140, ISSN 0352-5139.

### M34. Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu:

1. M. L. Avramov Ivić, **A.R. Mladenović**, D.Ž. Mijin, S.Ž. Drmanić, V.E. Vajs, V.M. Jovanović and S.D. Petrović „Electrochemical Oxidation of Donepezil and Its Voltammetric Determination at Gold Electrode“ 65<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Lausanne, Switzerland



## 9. IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani-~~a~~ ALEKSANDAR R. MLADENović

broj indeksa 4073/2011

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

### PROUČAVANJE STABILNOSTI DONEPEZIL-HIDROHLORIDA RAZLIČITIM ANALITIČKIM METODAMA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07.09.2015.

A. Mladenović



## 10. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE

Ime i prezime autora ALEKSANDAR R. MLADENović

Broj indeksa 4073/2011

Studijski program Hemija

Naslov rada PROUČAVANJE STABILNOSTI DONEPEZIL-  
HIDROHLORIDA RAZLIČITIM ANALITIČKIM METODAMA

Mentor DR SLOBODAN D. PETROVIĆ

---

Potpisani ALEKSANDAR R. MLADENović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07.09.2015.

A. Mladenović

## 11. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### PROUČAVANJE STABILNOSTI DONEPEZIL-HIDROHLORIDA RAZLIČITIM ANALITIČKIM METODAMA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno –deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07.09.2015.

A. Mnagehobist