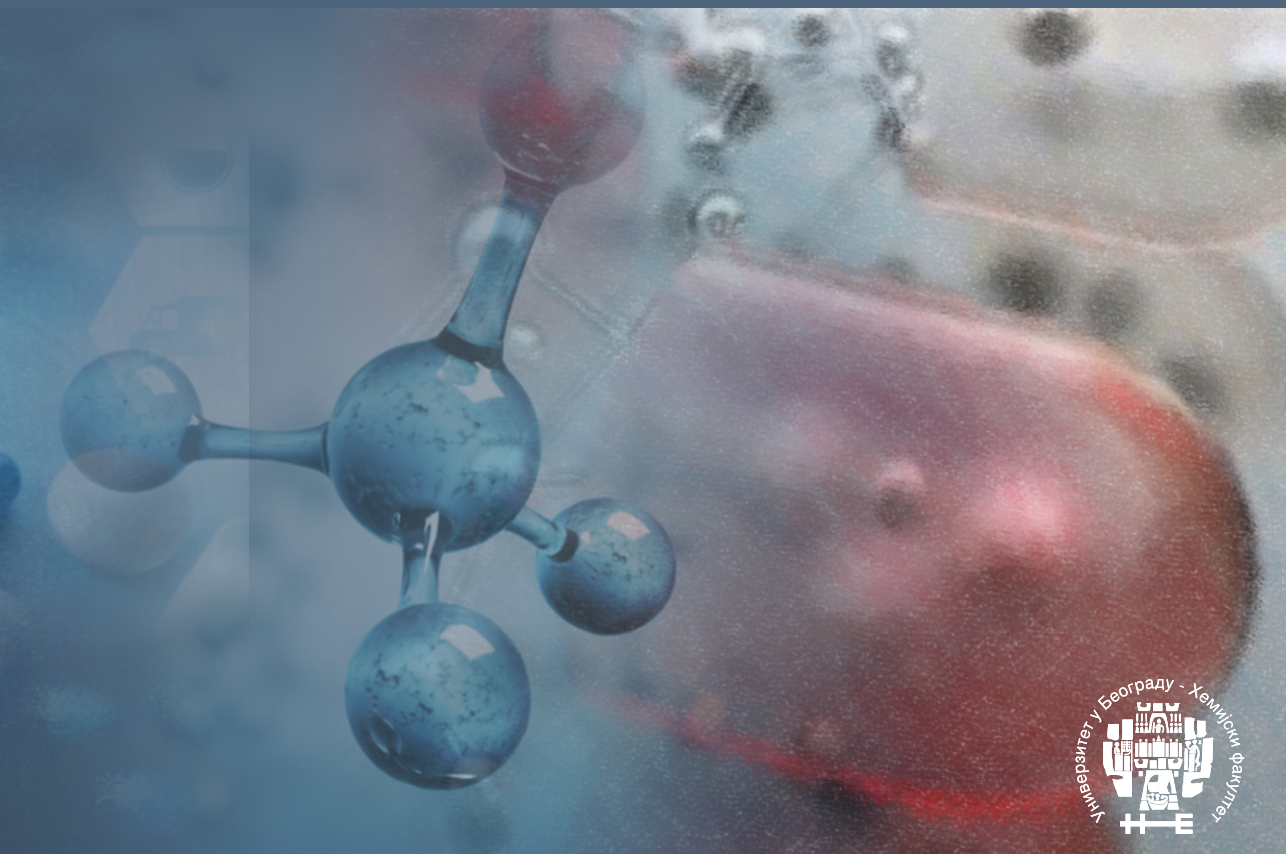


Analitičke metode u dizajnu i razvoju lekova

Tatjana Verbić
Olivera Marković
Miloš Pešić



Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet
Beograd 2025.

Tatjana Verbić
Olivera Marković
Miloš Pešić

Analitičke metode u dizajnu i razvoju lekova



Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
Beograd, 2025.

Analitičke metode u dizajnu i razvoju lekova

2025.

Autori

dr Tatjana Verbić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
dr Olivera Marković, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
dr Miloš Pešić, asistent sa doktoratom, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Recenzenti

dr Gordana Popović, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
dr Mire Zloh, redovni profesor u penziji, *University of Hertfordshire, School of Pharmacy*, Velika Britanija i redovni profesor, Univerzitet privredna akademija – Farmaceutski fakultet, Novi Sad
dr Aleksandar Lolić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Tehnička obrada i priprema za štampu

Autori

Dizajn korica

dr Aleksandar Dekanski, naučni savetnik u penziji, Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Izdavač

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, Studentski trg 12–16, Beograd
Za izdavača: prof. dr Goran Roglić, dekan

Tiraž

150 primeraka

Štampa i korićenje

Planeta print d.o.o, Beograd

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta koja je održana 10. jula 2025. godine prihvaćena je recenzija ovog rukopisa i odobrena njegova štampa (odluka broj 472/3) kao udžbenika za izborni predmet Analitičke metode u dizajnu i razvoju lekova (356H2, MAS Hemija, IAS Nastava hemije) i pomoćnog udžbenika za predmete Bioanalitička hemija (341A2, OAS Hemija, OAS Biohemija, IAS Nastava hemije) i Odabrane oblasti analitičke hemije (349A2, OAS Hemija, OAS Hemija životne sredine, IAS Nastava hemije).

ISBN 978-86-7220-132-1

PREDGOVOR

Ovaj rukopis osmišljen je kao udžbenik za predmet **Analitičke metode u dizajnu i razvoju lekova** za studente master akademskih studija „Hemija“. Podeljen je u 14 tematskih celina (poglavlja) koje obuhvataju uvod u proces dizajna i razvoja lekova, opis fizičko-hemijskih svojstava koja su u ovom procesu važna i detaljan prikaz metoda koje se koriste za karakterizaciju novih supstanci u ranoj fazi dizajna i razvoja lekova.

Delovi udžbenika napisani su na osnovu profesionalnog iskustva autora i rezultata dobijenih tokom dugogodišnjeg naučno-istraživačkog rada u ovoj oblasti koju su na Hemijskom fakultetu 80-ih godina XX veka započele prof. dr Lidija Pfendt i prof. dr Gordana Popović. Prof. dr Gordana Popović je svojim višestrukim mentorstvima u našoj istraživačkoj grupi oblikovala naš naučno-istraživački rad, a sada je u ulozi recenzenta doprinela i finalnom izgledu ovog udžbenika. Udžbenik je napisan u skladu sa savremenim saznanjima objavljenim u naučnoj literaturi, ali je prilagođen studentima na osnovu iskustva autora tokom implementacije opisanih oblasti u program predavanja, teorijskih i laboratorijskih vežbi na različitim predmetima i studijskim programima na Hemijskom fakultetu.

Autori ovom prilikom izražavaju veliku zahvalnost dr Alex-u Avdeef-u, *in-ADME Research*, Njujork, SAD i prof. dr Abu Serajuddin-u, *College of Pharmacy and Health Sciences, St. John's University, Queens*, Njujork, SAD, na više od decenije dugoj saradnji iz koje su proistekli brojni rezultati od kojih su neki prikazani i u ovom udžbeniku. Dr Avdeef i prof. dr Serajuddin su, kao vrhunski svetski stručnjaci u ovoj oblasti, brojnim diskusijama o svojim iskustvima u radu na univerzitetu i u farmaceutskoj industriji, značajno doprineli razvoju i sadržaju ovog predmeta kod nas. Zahvaljujemo i dr Klari Valko, *Bio-Mimetic Chromatography Ltd, Hertfordshire*, Velika Britanija na brojnim diskusijama i svim podeljenim iskustvima u eksperimentalnom radu u ovoj oblasti.

Zahvaljujemo se i prof. dr Dragani Milić na pomoći u izradi nekoliko slika prikazanih u udžbeniku i svim korisnim komentarima, sugestijama i podršci tokom nastajanja ovog udžbenika.

Posebno se zahvaljujemo recenzentima prof. dr Miretu Zlohu i prof. dr Aleksandru Loliću na pažljivom čitanju i oblikovanju rukopisa svojim komentarima, kao i na višegodišnjoj uspešnoj i prijatnoj saradnji.

Zahvaljujemo se i svim prošlim, sadašnjim i budućim studentima zbog kojih je ovaj rukopis i nastao, a čiji trud, radoznalost i zalaganje predstavljaju posebnu inspiraciju u radu.

Iako je ovaj udžbenik namenjen prvenstveno studentima, iskreno se nadamo da će biti od koristi i svim nastavnicima i istraživačima koji se interesuju za ove oblasti naučno-istraživačkog rada.

U Beogradu,
avgusta 2025.

Autori

SADRŽAJ

1. Uvod u proces dizajna i razvoja lekova	1
Literatura	13
2. Fizičko-hemijska karakterizacija supstanci: osnovna ADME svojstva	14
Literatura	20
3. Kiselinsko-bazne ravnoteže. Značaj i metode određivanja kiselinskih konstanti	21
3.1 Uvod u hemijske ravnoteže	21
3.2 Opšte metode za određivanje ravnotežnih konstanti	23
3.2.1 Funkcija građenja – Bjerrum-ova funkcija	24
3.3 Kiselinske konstante	27
3.3.1 Uticaj temperature na kiselinske konstante	31
3.3.2 Uticaj dielektrične konstante rastvarača na kiselinske konstante	35
3.4 Značaj određivanja kiselinskih konstanti	38
3.5 Metode za određivanje kiselinskih konstanti	41
3.5.1 Kalibracija i standardizacija elektrode za merenje pH vrednosti	43
3.5.2 Potenciometrijsko određivanje kiselinskih konstanti	50
3.5.3 Spektrofotometrijsko određivanje kiselinskih konstanti	67
3.6 Dijagram raspodele i kriva puferskog kapaciteta	74
Literatura	77
4. Biorelevantni medijumi	80
Literatura	89
5. Rastvorljivost. Značaj i metode određivanja rastvorljivosti	90
5.1 Definicije rastvorljivosti	90

5.2 Uticaj različitih faktora na eksperimentalno određivanje rastvorljivosti	91
5.2.1 pH vrednost	91
5.2.2 Formiranje agregata u rastvoru	99
5.2.3 Temperatura	102
5.2.4 Jonska sila	102
5.2.5 Puferski rastvori	103
5.2.6 Sastav čvrste faze	105
5.2.7 Količina čvrste supstance u višku	110
5.2.8 Vreme uspostavljanja ravnoteže	111
5.2.9 Razdvajanje faza	112
5.3 Značaj određivanja rastvorljivosti	113
5.4 Metode za određivanje kinetičke rastvorljivosti	115
5.5 Metode za određivanje termodinamičke rastvorljivosti	116
5.5.1 Klasična <i>shake-flask</i> metoda	116
5.5.2 pH- <i>Ramp shake-flask</i> metoda	117
5.5.3 Automatizovane <i>shake-flask</i> metode	119
5.5.4 Potenciometrijske metode	121
5.5.5 <i>Micro dissolution</i> (μ DISS) metoda	123
5.5.6 <i>Facilitated dissolution</i> metoda	124
Literatura	126
6. Brzina rastvaranja. Značaj i metode određivanja brzine rastvaranja	130
6.1 Rastvaranje	130
6.2 Rastvaranje aktivne supstance iz farmaceutskog oblika leka	132
6.3 Značaj i primena testova za ispitivanje brzine rastvaranja	134

6.4 Faktori koji utiču na brzinu rastvaranja	137
6.4.1 Fizičko–hemijska svojstva aktivne supstance	138
6.4.2 Pomoćne supstance	140
6.4.3 Proces proizvodnje	141
6.4.4 Eksperimentalni uslovi	142
6.5. Dizajn testova za ispitivanje brzine rastvaranja	146
6.5.1 <i>Sink/nonsink</i> uslovi	146
6.5.2 Izbor medijuma za rastvaranje	147
6.5.3 Izbor aparature za ispitivanje brzine rastvaranja	150
6.5.4 Brzina mešanja	156
6.5.5 Vreme trajanja eksperimenta	157
Literatura	159
7. Primena metoda termičke analize u dizajnu i razvoju lekova	161
7.1 Uvod u termičku analizu	162
7.2 Termogravimetrijska analiza (TGA)	165
7.2.1 Termogravimetrijski analizator – termovaga	167
7.2.2 Faktori koju utiču na rezultate TGA analize	170
7.2.3 Tumačenje TGA termograma	172
7.2.4 Kombinacija TGA i drugih metoda	178
7.3. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	179
7.3.1 Diferencijalni skenirajući kalorimetar	180
7.3.2 Faktori koju utiču na rezultate DSC analize	183
7.3.3 Termički prelazi	187
7.3.3.1 Topljenje	187
7.3.3.2 Kristalizacija	189

7.3.3.3 Desolvatacija/dehidratacija	189
7.3.3.4 Polimorfni prelazi	192
7.3.3.5 Termička degradacija	199
7.3.3.6 Staklasti prelaz	201
7.3.3.7 Entalpijska relaksacija	203
7.3.4 Primena DSC metode	204
Literatura	207
8. Metode za povećanje rastvorljivosti aktivnih farmaceutskih komponenti	209
8.1 Prevođenje u soli	209
8.2 Prevođenje u amorfan oblik i čvrstu disperziju	212
8.3 Kompleksiranje ciklodekstrinima	218
8.4 Formulacije na bazi lipida	223
8.5 Smanjenje veličine čestica	229
8.6 3D štampa	232
Literatura	237
9. Ravnoteže u rastvorima kompleksnih jedinjenja. Značaj i metode određivanja konstanti stabilnosti	241
9.1 Potenciometrijsko određivanje konstanti stabilnosti	244
9.2 Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti	256
9.2.1 Job-ova metoda	256
9.2.2 Metoda molskog odnosa	260
Literatura	263
10. Lipofilnost. Značaj i metode određivanja lipofilnosti	265
10.1 Particioni koeficijent i koeficijent distribucije	266
10.2 pH Profili lipofilnosti	269
10.3 Metode za određivanje $\log P(D)$ vrednosti	272

10.3.1 <i>Shake-flask</i> metoda	272
10.3.2 Potenciometrijske kiselinsko-bazne titracije	275
10.3.3 Reversno-fazna tankoslojna hromatografija (RP-TLC)	281
10.3.4 Reversno-fazna visokoefikasna tečna hromatografija (RP-HPLC)	283
Literatura	292
11. Permeabilnost. Značaj i metode određivanja permeabilnosti	295
11.1 Fizičko-hemijske osnove i koeficijent permeabilnosti	297
11.2 Metode za određivanje koeficijenta permeabilnosti	300
11.2.1 Caco-2 i MDCK testovi	302
11.2.2 Testovi sa veštačkim membranama – PAMPA model	305
Literatura	312
12. Proučavanje vezivanja malih molekula za proteine plazme	314
12.1 Nekovalentne interakcije u vezivanju malih molekula za proteine plazme	318
12.2 Eksperimentalne metode za proučavanje vezivanja malih molekula za proteine plazme	319
12.2.1 Dijaliza	320
12.2.2 Ultrafiltracija	322
12.2.3 Ultracentrifugiranje	323
12.2.4 Biomimetska visokoefikasna tečna hromatografija	325
12.2.5 Kapilarna elektroforeza, CE	329
12.2.6 Fluorescentna spektroskopija	335
12.2.7 Izotermalna titraciona kalorimetrija, ITC	341
12.2.8 Rezonancija površinskog plazmona, SPR	344
Literatura	348
13. Nuklearna magnetna rezonancija – značaj i primena u dizajnu i razvoju lekova	352

13.1 Uvod u nuklearnu magnetnu rezonanciju	352
13.2 NMR tehnike značajne u razvoju lekova	353
13.3 Prednosti i mane primene NMR u razvoju lekova	356
13.4 Primena NMR u strukturnim i kvantitativnim određivanjima	357
13.5 Proučavaje kiselinsko-baznih ravnoteža pomoću NMR spektroskopije	359
13.5.1 Proučavanje reakcija hidrolize	361
13.5.2 Određivanje mesta protonovanja	362
13.5.3 Određivanje mikroskopskih konstanti kiselosti	366
13.6 Primena NMR spektroskopije za praćenje procesa dimerizacije	369
13.7 Praćenje kompleksiranja lekova sa ciklodekstrinima NMR spektroskopijom	372
13.8 NMR spektroskopija u proučavanju interakcija između malih molekula i biomakromolekula	378
Literatura	381
14. Infracrvena spektroskopija – značaj i primena u dizajnu i razvoju lekova	385
14.1 Opšte karakteristike funkcionalnih grupa u IC spektru	386
14.2 IC spektroskopija kao pomoćna metoda u karakterizaciji jedinjenja	387
14.3. Primena IC spektroskopije u ispitivanju interakcija između komponenata u formulaciji leka	389
14.4. Analiza mikrostrukture formulacija	393
14.5. Ispitivanje polimorfizma pomoću IC spektroskopije	395
14.6. Primena IC <i>imaging</i> -a u proučavanju rastvaranja lekova	396
Literatura	401