



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tomislav Vrbanec

**PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF
OMEPRAZOLE AND ITS SALTS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Tomislav Vrbanec

**FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
OMEPRAZOLA I NJEGOVIH SOLI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jože Grdadolnik

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Tomislav Vrbanec

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF OMEPRAZOLE AND ITS SALTS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Jože Grdadolnik, Ph.D.

Zagreb, 2017

Ovaj rad izrađen je u KRKA, d.d, Novo mesto te se ovim putem zahvaljujem što mi je omogućeno pohađanje doktorskog studija kemije i izrada rada.

Zahvalu upućujem mojem mentoru izv. prof. dr. sc. Jožetu Grdadolniku, uz čiju sam pomoć, strpljivost, savjete i brojne telefonske razgovore izradio ovaj rad, te objavio znanstveni članak.

Također se zahvaljujem Vodstvu Razvoja analitike, te svim kolegicama i kolegama iz Odjela za strukturne analize, a posebno onima iz Laboratorija za spektroskopiju, Laboratorija za rentgensku difrakciju, Laboratorija za termičku analizu te Laboratorija za mikroskopiju, koji su izdvojili svoje vrijeme, te su analizama, nesebičnim savjetim i konstruktivnim prijedlozima, doprinjeli u izradi ovog rada.

Dr. sc. Primožu Šketu se zahvaljujem na NMR analizama.

Dr. sc. Franciju Merzelu hvala za teoretski račun VASP, koji je mnogo pomogao u interpretaciji snimljenih Ramanovih i FTIR spektara.

Veliko hvala i članovima Povjerenstva za ocjenu disertacije doc. dr. sc. Vladimiru Stilinoviću i dr. sc. Vlasti Mohaček Grošev, v. znan. sur., na pomoći, prijedlozima i savjetima. ♦

Zahvaljujem se i svim zaposlenicima Kemijskog odsjeka PMF-a, koji su na bilo koji način pridonijeli u izradi ovog rada, a posebno izv. prof. dr. sc. Ines Primožič.

Mojim roditeljima i bratu zahvaljujem na ustrajnosti, potpori i trudu koji su ulagali u mene tijekom cijelog mojeg školovanja, kako bih postao odrastao i samostalan čovjek.

Naposljetku želim se zahvaliti voljenoj supruzi Gordani na strpljivosti, pomoći i podršci tijekom svih ovih godina, a kćerima Katarini i Veroniki na dječjoj radosti i osmjesima, koji su mi bili motivacija u teškim trenucima.

Tomislav

Sadržaj

SADRŽAJ	IX
SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Prazoli – inhibitori protonske pumpe.....	3
2.1.1. <i>Mehanizam djelovanja inhibitora protonske pumpe.....</i>	<i>5</i>
2.2. Omeprazol.....	7
2.3. Kristalna struktura omeprazola	10
2.4. Natrijeva sol omeprazola.....	13
2.5. Magnezijeva sol omeprazola	15
2.6. Kalijeva, kalcijeva i litijeva sol omeprazola.....	16
2.7. Fizikalne osnove molekulskih vibracija	16
2.8. Sekularna determinanta	18
2.9. Infracrvena i Ramanova spektroskopija	19
2.10. Vibracije višeatomnih molekula	25
2.11. Grupne vibracije	26
2.12. Simetrija.....	27
2.13. Tehnike snimanja Ramanovih i infracrvenih spektara	29
2.13.1. <i>Ramanova spektroskopija.....</i>	<i>29</i>
2.13.2. <i>Koherentna anti-Stokesova Ramanova spektroskopija</i>	<i>30</i>
2.13.3. <i>Rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS)</i>	<i>30</i>
2.13.4. <i>Površinski pojačano Ramanovo raspršenje</i>	<i>31</i>
2.13.5. <i>Transmisijska infracrvena spektroskopija.....</i>	<i>31</i>
2.13.6. <i>Difuzna reflektancija</i>	<i>32</i>
2.13.7. <i>Atenuirana ukupna refleksija</i>	<i>32</i>
2.13.8. <i>Zrcalna refleksija</i>	<i>33</i>
2.14. Područja primjene spektroskopije	33
2.15. Mikrospektroskopija	34
2.15.1. <i>Mapiranje</i>	<i>34</i>
2.15.2. <i>Polimorfija i morfologija.....</i>	<i>35</i>
2.15.3. <i>Analiza na termopostolju.....</i>	<i>36</i>

2.15.4. Dinamička sorpcija vlage.....	37
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	39
3.1. Priprava uzoraka	39
3.1.1. Polazni spojevi.....	39
3.1.2. Priprava soli omeprazola.....	39
3.2. Nuklearna magnetska rezonancija	42
3.3. Difrakcija rentgenskog zračenja na praškastim uzorcima	42
3.4. Vibracijska spektroskopija	43
3.4.1. Ramanova spektroskopija	43
3.4.2. Ramanova mikroskopija.....	43
3.4.3. Fourier transformiran infracrvena spektroskopija.....	44
3.4.4. Fourier transformirana infracrvena mikroskopija	44
3.5. Termička istraživanja.....	45
3.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija.....	45
3.5.2. Termogravimetrijska analiza	45
3.5.3. Temperaturno ovisna analiza.....	45
3.5.4. Mjerenja dinamične sorpcije vlage.....	46
3.6. Teoretski račun VASP	46
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	49
4.1. Priprava soli omeprazola.....	49
4.1.1. Difrakcija rentgenskog zračenja na praškastim uzorcima.....	49
4.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija.....	55
4.1.3. Termogravimetrijska analiza	59
4.1.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC).....	61
4.2. Vibracijska spektroskopija omeprazola i njegovih soli	63
4.2.1. Asignacija vibracijskih spektara omeprazola	63
4.2.1.1. Karakteristične vibracije supstituiranog piridinskog prstena	63
4.2.2. Benzimidazol	67
4.2.3. Izvanravninske vibracije	71
4.2.4. Vibracija sulfoksidne skupine	71
4.2.5. Vibracija metoksi skupine	71
4.2.6. Molekula omeprazola.....	73
4.2.7. Asignacija karakterističnih vrpca soli omeprazola.....	78
4.2.7.1. Asignacija karakterističnih vrpca litijeve soli omeprazola	78
4.2.7.2. Asignacija karakterističnih vrpca natrijeve soli omeprazola	80
4.2.7.3. Asignacija karakterističnih vrpca kalijeve soli omeprazola.....	82
4.2.7.4. Asignacija karakterističnih vrpca magnezijeve soli omeprazola.....	84
4.2.7.5. Asignacija karakterističnih vrpca kalcijeve soli omeprazola	86

4.3. Opis razlika omeprazola i njegovih soli	88
4.4. Dinamička sorpcija vlage i "in situ" Ramanova spektroskopija	92
4.5. Temperaturno ovisna analiza i "in situ" Ramanova spektroskopija	93
4.6. Ramanova mikrospektroskopija–mapiranje	95
4.6.1. Mapiranje komercijalnog uzorka omeprazola–prez pelete.....	95
4.6.2. Zasoljavanje česticama	97
4.6.3. Presoljavanje na granici faza	98
§ 5. ZAKLJUČAK	99
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	101
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	102
§ 8. DODATAK	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIII





Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA OMEPRAZOLA I NJEGOVIH SOLI

Tomislav Vrbanec

Krka, d.d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, Novo mesto, Slovenija

U razvoju lijekova važno je izabrati najprimjereniju kristalnu formu aktivne tvari. Tvari, koje su stabilne samo u određenom pH području, predstavljaju izazov za razvoj formulacije. Istraživana molekula omeprazol spada u skupinu prazola; lijekova koji su inhibitori protonske pumpe u ljudskom organizmu, a njihovo je glavno obilježje snažno i dugotrajno smanjenje stvaranja želučane kiseline. Za prazole je poznato, da su osjetljivi na degradaciju u kiselom okruženju. Zato se u formulaciji stabiliziraju alkalnim dodacima ili se daju u obliku bazičnih soli. Priprava i karakterizacija bazičnih soli je potrebna u slučaju izravne uporabe u formulaciji, odnosno i za praćenje mogućeg zasoljavanja slobodne molekule. Za potrebe istraživanja sintetizirane su soli omeprazola iz skupine alkalijskih (Li, Na, K) i zemnoalkalijskih metala (Mg, Ca). Istražena su i fizikalno-kemijska svojstva pet soli, koristeći neke analitičke metode (Ramanovu i Fourier-transformiranu infracrvenu mikroskopiju, analizu na termopostolju, dinamičku sorpciju vlage, nuklearnu magnetsku rezonanciju, difrakciju rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku, termogravimetriju, diferencijalnu pretražnu kalorimetriju te teorijski izračun vibracijskih frekvencija). Zaključeno je, da je vibracijska spektroskopija prikladna spektroskopska metoda, koja na točan, brz i nedestruktivan način određuje fizikalno-kemijske karakteristike omeprazola i njegovih soli.

(108 stranica, 44 slike, 16 tablica, 138 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: asignacija karakterističnih vrpca / fizikalna karakterizacija / mikrospektroskopija / soli omeprazola / spektroskopska karakterizacija / vibracijska spektroskopija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jože Grdadolnik, Kemijski inštitut Ljubljana, Slovenija

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Vladimir Stilinović, PMF, Zagreb
izv. prof. dr. sc. Jože Grdadolnik, Kemijski inštitut Ljubljana, Slovenija
dr. sc. Vlasta Mohaček Grošev, v. zn. sur., IRB, Zagreb

Rad prihvaćen: 6. prosinca 2017.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF OMEPRAZOLE AND ITS SALTS

Tomislav Vrbanec

Krka, d.d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, Novo mesto, Slovenia

In drug development, it is important to have a suitable crystalline form of the active substance. Substances that are stable only within a certain pH range are a challenge for the formulation development. Omeprazole molecule belongs to the group of prazoles; drugs which are proton pump inhibitors in the human body, but their main characteristic is a strong and long-lasting reduction of gastric acid formation. For the prazoles, it is known to be sensitive to degradation in an acid environment. The formulation is then stabilized with alkaline additives or is used in the form of basic salts. Preparation and characterization of basic salts is needed in the case of use in the formulation and to monitor any possible salinization of free molecule. For purposes of this study, the salts of omeprazole from the group of alkali metal (Li, Na, K) and alkaline earth metals (Mg, Ca) were synthesized. Also the physicochemical properties of five salts were probed, using Fourier-transform infrared and Raman microscopy, hot stage, dynamic vapour sorption, nuclear magnetic resonance, thermogravimetry, differential scanning calorimetry and theoretical calculation of vibrational frequencies. It was found, that vibrational spectroscopy serves as appropriate spectroscopic tool which in accurate, quick and non-destructive way determines the physico-chemical characteristics of omeprazole and its salts.

(108 pages, 44 figures, 16 tables, 138 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: characteristic bands assignation / microspectroscopy / omeprazole salts / physical characterization / spectroscopic characterisation / vibrational spectroscopy

Supervisor: Assoc. Prof. Jože Grdadolnik, Ph.D., National Institute of Chemistry, Slovenia

Reviewers: Assist. Prof. Vladimir Stilinović, Ph.D., Faculty of Science, Zagreb
Assoc. Prof. Jože Grdadolnik, Ph.D., National Institute of Chemistry, Slovenia
Sen. Research Assoc. Vlasta Mohaček Grošev, Ph.D., Ruđer Bošković Institute

Thesis accepted: 6th December 2017

§ 1. UVOD

U razvoju lijekova važno je izabrati najprimjereniju kristalnu formu aktivne tvari. Većinom su osnovne opcije uporaba slobodne baze, kiseline ili soli. Tvari, koje su stabilne samo u određenom pH području, predstavljaju izazov za razvoj formulacije. Za prazole je poznato, da degradiraju u kiselom okruženju. Zato se u formulaciji stabiliziraju alkalnim dodacima ili se daju u obliku bazičnih soli.¹ Priprava i potpuna karakterizacija bazičnih soli je potrebna u slučaju izravne uporabe u formulaciji, odnosno i za praćenje mogućeg zasoljavanja slobodne molekule. Za potrebe istraživanja sintetizirat će se soli omeprazola s metalima iz skupine alkalijskih (Li, Na, K) i zemnoalkalijskih metala (Mg, Ca). Istražit će se i fizikalno-kemijska svojstva koristeći analitičke metode Ramanova i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom te mikrospektroskopija, analiza na termopostolju/Raman, dinamička sorpcija vlage/Raman, NMR (nuklearna magnetska rezonancija), XRPD (engl. *X-Ray powder diffraction* – difrakcija rentgenskih zraka na polikristalnom uzorku), TGA (termogravimetrijska analiza), DSC (engl. *Diferencial scanning calorimetry* – diferencijalna pretražna kalorimetrija). Cilj je potpuna spektroskopska karakterizacija spomenutih soli, a bit će istražene i kemijske veze s obzirom na uporabljeni kation pomoću spektroskopskih podataka, točnije promjene na N–H vezi benzimidazolnog prstena koje slijede zbog deprotonacije i blizine iona alkalijskih odnosno zemnoalkalijskih metala.

Spoj 5-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1*H*-benzimidazol (u daljnjem tekstu omeprazol ili OMP) je inhibitor protonske pumpe na način da ireverzibilno blokira enzimski sustav vodik/kalij adenzin trifosfataze (H^+/K^+ -ATPaze) želučane parijetalne stanice. Spoj se koristi u uvjetima gdje inhibicija izlučivanja želučane kiseline može biti od koristi, uključujući sapiracijske sindrome, dispepsiju, bolest peptičnog čira, Zollinger-Ellisonov sindrom i druge.² U pripravi gotovih oblika (formulaciji) koriste se pak razni stabilizatori kako bi se spriječila kemijska reakcija pomoćnih tvari i omeprazola. Pri tome postoji teoretska mogućnost presoljavanja. Ovim istraživanjem željela se pokazati mogućnost praćenja tog efekta infracrvenom i Ramanovom spektroskopijom. Tehnike, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, difrakcija rentgenskih zraka na praškastom uzorku te nuklearna magnetska rezonancija korištene su primarno za identifikaciju soli

omeprazola (usporedba sa literaturnim podacima). Nadalje, infracrvena i Ramanova spektroskopija bit će korištene za asignaciju karakterističnih vrpca karakterističnih za pojedinu sol. Prije svega to se odnosi na veze karakteristične za benzimidazolni prsten (N–H, C=C–N i S–C=N) te S=O vezu koja je most između benzimidazalnog prstena na kojem se događaju promjene i ostatka molekule.^{3,4,5}

U farmaceutskoj industriji od presudne je važnosti raspolaganje stabilnim proizvodom određene topljivosti i bioraspoložljivosti. Pripravom soli aktivne tvari (u ovom slučaju omeprazola) moguće je utjecati na stabilnost i topljivost/bioraspoložljivost. S obzirom na postojanje stereokemijskog centra omeprazol postoji kao *R* i *S* izomer, pri čemu oba pokazuju aktivnost, ali se *S* izomer metabolizira sporije i reproducibilnije što rezultira produženim djelovanjem *S*-omeprazola (njegova se koncentracija kroz duže vrijeme održava u krvi).⁶ Omeprazol, organska molekula koja iskazuje kiselostvo (benzimidazolni dio), praćena je pri različitim uvjetima temperature i vlage (fizikalnim parametrima kojima je sama aktivna tvar najviše izložena), a primarna tehnika praćenja bila je vibracijska spektroskopija. Osim u razumijevanju stabilnosti pripremljenih spojeva pomoću različitih spektroskopskih tehnika, potpuna karakterizacija vibracijskih spektara trebala bi pomoći u razumijevanju procesa nastajanja soli te dati odgovor na to što se događa s molekulom omeprazola prilikom nastajanja soli.

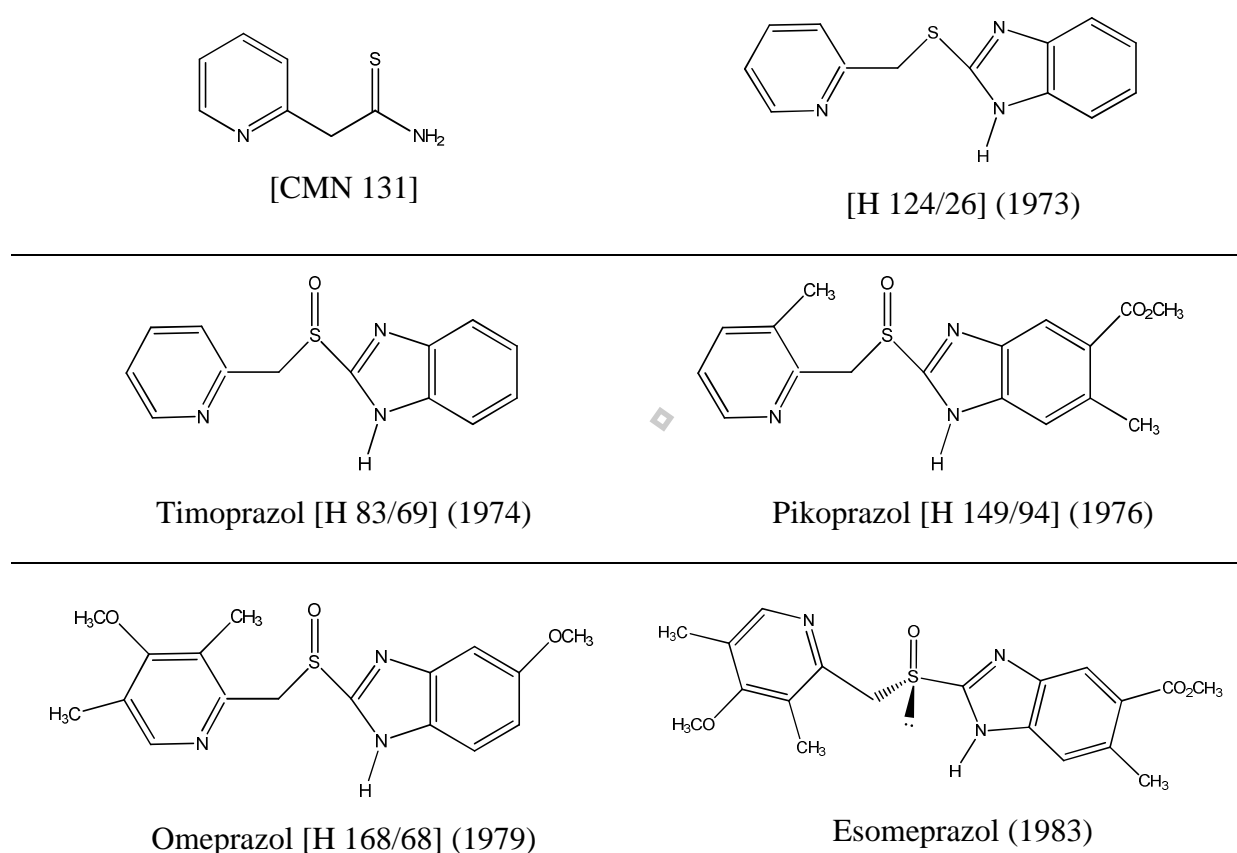
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Prazoli – inhibitori protonske pumpe

Prazoli su kemijski spojevi koji spadaju u skupinu inhibitora protonske pumpe (engl. *proton pump inhibitors*, PPI) čije je glavno obilježje smanjenje proizvodnje/lučenja želučane kiseline. Ta skupina lijekova koristi se za liječenje brojnih bolesti i stanja organizma kao što su sindrom kisele aspiracije, dispepsiju, bolest peptičnog čira, Zollinger-Ellisonov sindrom, kao dio terapije u liječenju *Helicobacter pylori* i druge. Potreba za sintezom i primjenom takvih lijekova intenzivirala se 60-ih godina dvadesetog stoljeća, zbog želje da se umanje vrlo neugodne tegobe prouzročene pojačanim lučenjem želučane kiseline, od kojih su kardialgija (žgaravica) i peptični čir najučestalije među stanovništvom. Tadašnja terapija peptičnog čira uključivala je primjenu antacida kako bi se neutralizirao suvišak želučane kiseline, no to je bila samo privremena mjera i operacija je bila jedino trajno rješenje uz sve posljedice koje nosi sa sobom.

Razvojni put prazola započinje krajem 60-ih godina kada još detaljan biokemijski put lučenja želučane kiseline iz parijetalnih stanica nije bio poznat, a danas je objašnjen do zadnjeg detalja. Prvi komercijalno primjenjeni spoj bio je cimetidin (patentiran kasnih 70-ih godina), no njegova mana bila je kratko vrijeme djelovanja. Paralelno započinje „projekt omeprazol“ koji je kao ishodište istraživanja imao spoj 2-(piridin-2-il)etantioamid (u daljnjem tekstu CMN131), koji zbog svoje toksičnosti nije bio primjenjiv.⁷ Nastavkom istraživanja sintetiziran je antisekretorni benzimidazolni spoj 2-((piridin-2-ilmetil)tio)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (u daljnjem tekstu H 124/26), koji nije bio toksičan, no zbog patenta koji je postojao za taj spoj u liječenju tuberkuloze, iskorišten je njegov metabolit s još boljim antisekrecijskim djelovanjem, koji je nazvan timoprazol (H 83/69).⁸ Daljnja toksikološka istraživanja na tom spoju otkrila su da timoprazol uzorkuje proširenje štitnjače (tiroidne žlijezde), pa je sintetiziran pikoprazol koji nije imao tih nuspojava.⁹ Razvojem biokemijskih istraživanja na novo otkrivenoj protonskoj pumpi (H^+/K^+ -ATPaza), objavljeni su radovi u kojima je pokazano da je aktivacija protonske pumpe u sekrecijskim membranama parijetalne stanice konačni korak u izlučivanju kiseline.^{10,11} Ta činjenica u kombinaciji sa znanjem o djelovanju benzimidazolnih spojeva na sprečavanje sekrecije želučane kiseline potakla je

daljnji razvoj tijekom kojeg je i potvrđeno da supstituirani benzimidazolni spojevi inhibiraju lučenje želučane kiseline blokirajući $H^+/K^+-ATPazu$.^{12,13} Pristupilo se "optimizaciji" molekule pikoprazola. Budući da se slabe baze akumuliraju u kiselom dijelu parijetalne stanice blizu protonske pumpe, dodavani si supstituenti na piridinski dio molekule kako bi se postigla viša pK_a vrijednosti i time maksimizirala akumulacija unutar parijetalne stanice. U konačnici to je rezultiralo spojem koji je nazvan omeprazol. Razvojni put prazola od spoja CMN131 do omeprazola, a opisan u prethodnom tekstu grafički je reprezentiran preko strukturnih formula sintetiziranih spojeva na slici 1.



Slika 1. Razvojni put inhibitora protonske pumpe.²³

Želja za poboljšavanjem rezultata liječenja rezultirala je daljnjim istraživanjima na prazolima pa je otkriveno da optički izomer omeprazola – esomeprazol ima još bolje djelovanje kao PPI (opisano u poglavlju 2.2., stranica 10), a do danas su patentirani i u komercijalnu uporabu stavljeni još i lansoprazol, deksalansoprazol, pantoprazol, rabeprazol i ilaprazol za liječenje

sličnih bolesti. Istraživanje u svrhu ispitivanja učinkovitosti pojedinih od predhodno navedenih lijekova objavili su P. Miner i suradnici¹⁴ testirajući 34 pacijenta različite životne dobi sa simptomima bolesti gastroesofagalnog refluksa, a koji su bili negativni na *Helicobacter pylori*. Na njima su ispitivali djelovanje esomeprazola, omeprazola, lanzoprazola, rabeprazola i pantoprazola kroz pet dana. Cilj istraživanja je bio otkriti, koji će od navedenih lijekova najduže zadržati intragastričnu pH vrijednost iznad 4. Studijom je utvrđeno da značajno duže djelovanje u održavanju pH vrijednosti ima esomeprazol (14 sati), dok su rabeprazol (12,1 sat), omeprazol (11,8 sati), lanzoprazol (11,5 sati) i pantoprazol (10,1 sat) imali redom slabije djelovanje. Razlog za takve rezultate nalaze u jasnoj vezi između stupnja izloženosti esofagelnoj kiselini liječenjem erozivnog esofagitisa,¹⁵⁻¹⁸ s obzirom da esomeprazol ima učinkovitiju farmakodinamiku potiskivanja kiseline od ostalih ispitivnih inhibitora protonске pumpe.

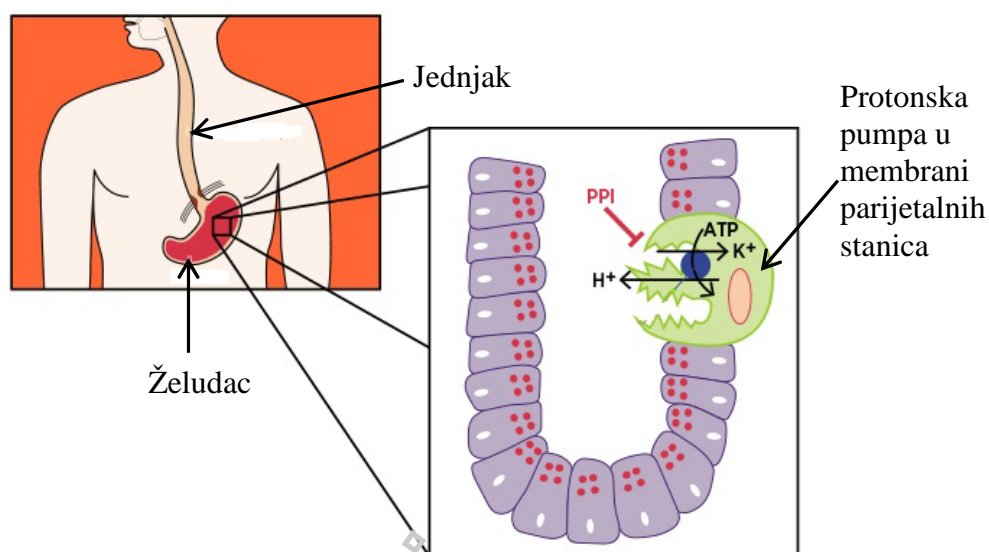
Slično, ali još opsežnije istraživanje na 274 pacijenata šest godina kasnije, opisao je u svojem radu Ri-Nan Zheng,¹⁹ gdje je uspoređivana je učinkovitost omeprazola, lanzoprazola, pantoprazola te esomeprazola u liječenju simptoma bolesti gastroesofagenalnog refluksa (GERD)^{20,21} odnosno kardialgije. Po analizi rezultata zaključeno je, da je esomeprazol učinkovitiji u suzbijanju simptoma kardialgije od ostala tri ispitivana prazola, pogotovo primjenom kroz duži period (nekoliko tjedana), no te razlike u učinkovitosti nisu bile izražene u tolikoj mjeri da bi dovele u pitanje daljnju primjenu terapije omeprazolom, pantoprazolom ili lanzoprazolom. Slična istraživanja proveli su i neki drugi znanstvenici, a jedno opsežno istraživanje na opisanu temu potpisuje S. J. Edwards sa suradnicima.²²

2.1.1. *Mehanizam djelovanja inhibitora protonске pumpe*

Želučana kiselina je zaslužna za razgradnju hrane u želucu, ali prevelika količina izlučivanja iste može uzrokovati kardialgiju. Smanjivanje količine kiseline u želucu može smanjiti vjerojatnost nastanka kardialgije. Na želučanoj stijenci postoje milijuni gastičkih jama iz kojih se izlučuje želučana kiselina. Stanice koje se nalaze na gastičkoj jami su mukozne stanice koje izlučuju sluz, G stanice koje izlučuju gastrin (peptidni hormon) i parijetalne stanice (stanice želučanog epitela) koje izlučuju klorovodičnu kiselinu. Protonska pumpa prisutna u parijetalnim stanicama je odgovorna za izlučivanje kiseline i locirana je na

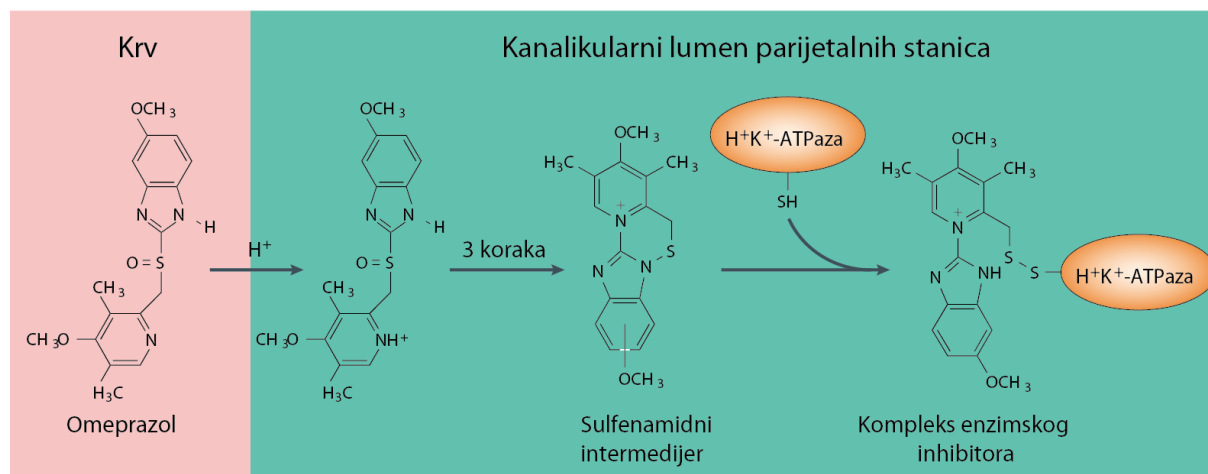
luminalnoj strani parijetalne stanice, a uloga joj je da aktivno prenosi protone (s ATP-a) u želučani lumen, dok kalij prenosi nazad u parietalnu stanicu uz hidrolizu ATP-a.^{2,23}

PPI su lijekovi koji sprečavaju mnogo aktivnih protonskih pumpi u proizvodnji želučane kiseline. Lijek se ireverzibilno veže na protonsku pumpu sprečavajući aktivni prijenos protona odnosno njihovo vezanje (slika 2). To posljedično uzrokuje smanjeno lučenje želučane kiseline iz želuca.²



Slika 2. Mehanizam djelovanja inhibitora protonske pumpe u organizmu.²⁴

U slučaju inhibitora protonske pumpe omeprazola djelovanje započinje tek prelaskom tog spoja u aktivni oblik u kiselom okruženju. On je slaba baza i specifično se koncentrira u kiselim sekrecijskim kanalikulama parietalne stanice, gdje se aktivira procesom protonske katalize kako bi nastao sulfenamid.²⁵ Taj nastali sulfenamid veže se kovalentno sa sulfidrilnim skupinama cisteinskih ostataka u vanjskostaničnom okolišu H^+K^+ -ATPaze (Cys 813) te tako inhibira njezinu aktivnost.²⁶ Na slici 3 prikazan je način aktivacije i djelovanje molekule omeprazola u parijetalnoj stanici.



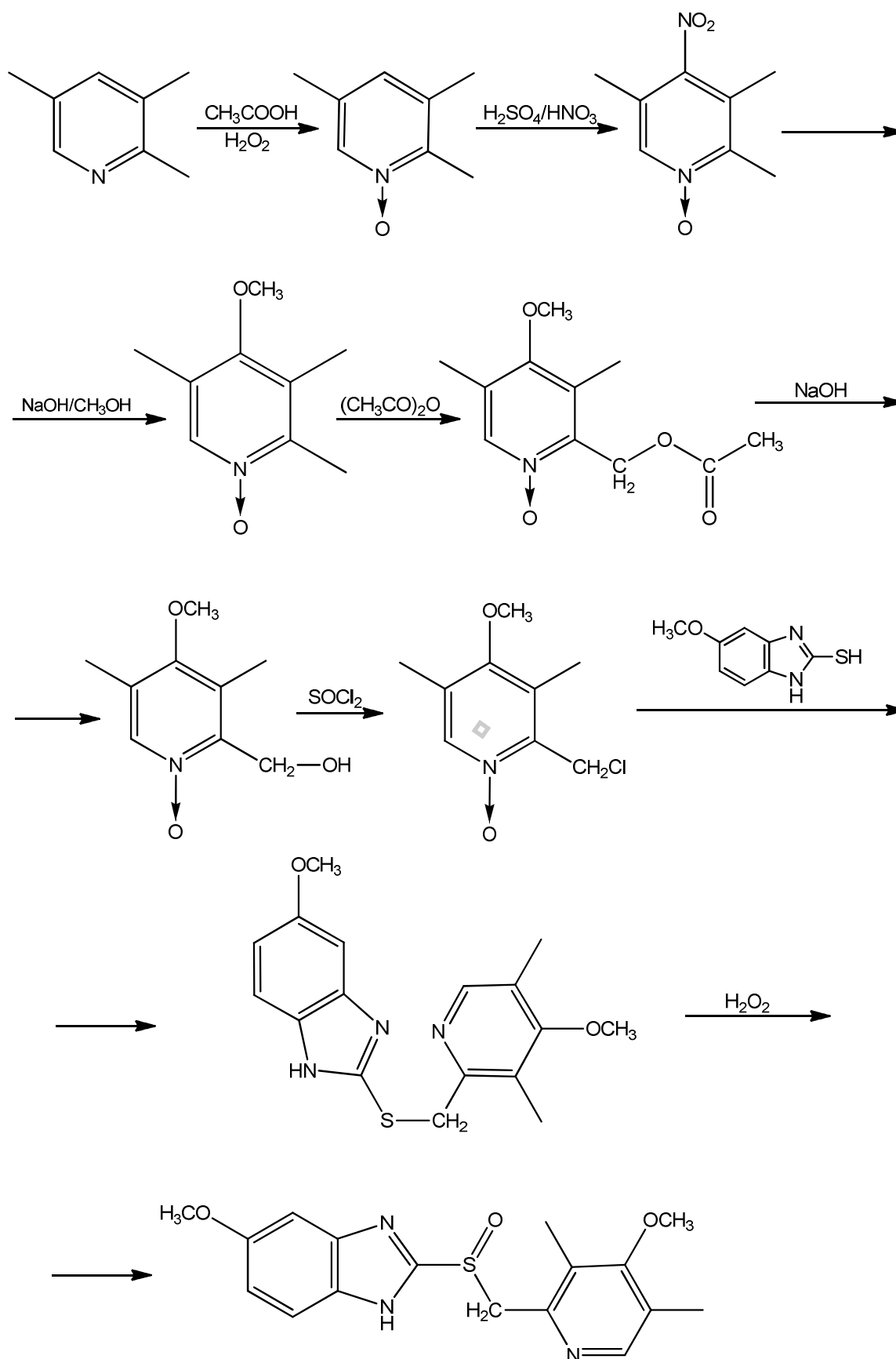
Slika 3. Aktivacija i djelovanje molekule omeprazola u parijetalnoj stanici.²³

2.2. Omeprazol

Istraživana molekula 5-metoksi-2-[[[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1*H*-benzimidazol (omeprazol) spada u skupinu prazola; lijekova koji su inhibitori protonske pumpe u ljudskom organizmu. Njihovo je glavno obilježje snažno i dugotrajno smanjenje stvaranja želučane kiseline. Inhibitori protonske pumpe su među najprodavanijim lijekovima u svijetu, a prvi među njima je omeprazol koji je na listi esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije.² Detaljan opis djelovanja inhibitora protonske pumpe nalazi se u poglavlju 2.1.1.

Omeprazol se može davati oralno kao baza ili magnezijeva sol, odnosno intravenozno u obliku natrijeve soli. Oralna primjena ovog lijeka moguća je preko tableta ili kapsula koje sadrže pelete – male kuglice reda veličine najčešće oko 1000 μm , sastavljene iz šećerne jezgre koja je obložena s nekoliko slojeva; sloj koji sadrži aktivnu tvar, zaštitni sloj te vanjski sloj, što omogućuje postepeno otpuštanje lijeka u organizam.

Postoji više puteva sinteze omeprazola,^{27–34} no među najcitiranijima je priprava omeprazola objavljena u patentu iz 1986. godine, koju su objavili Brandstorm i Lamm.³⁵ Reakcija sinteze prikazana je na slici 4.



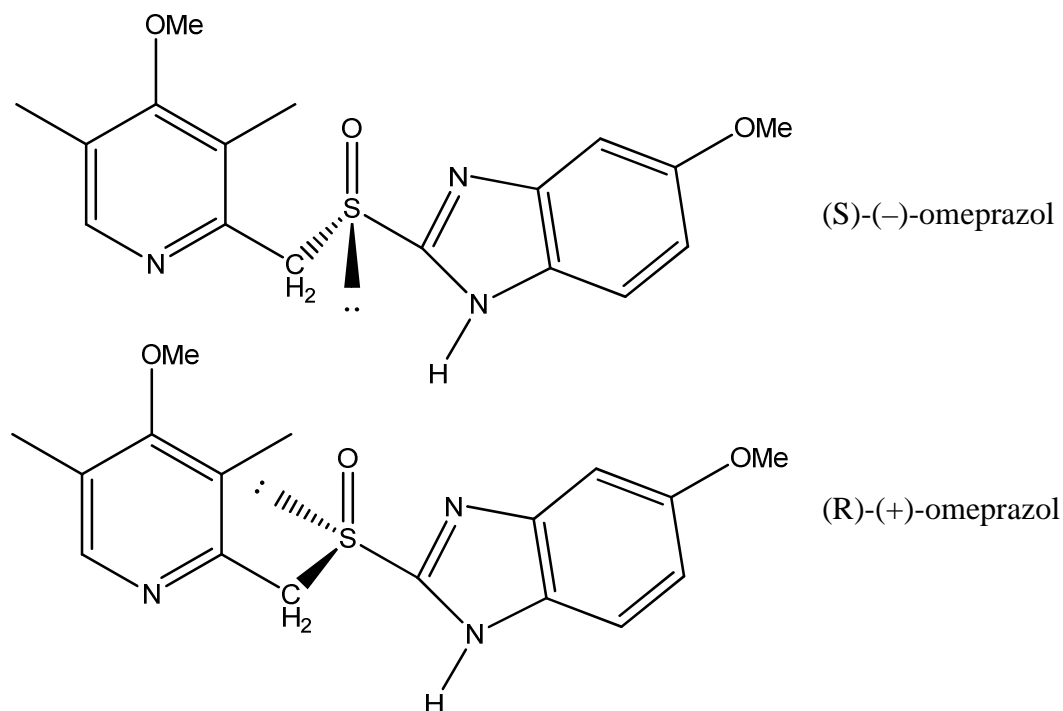
Slika 4. Sinteza molekule omeprazola objavljena u patentu US 4,620,008.

Reakcija se sastoji od deset koraka, a započinje iz 2,3,5-trimetilpiridina (1), koji se oksidira vodikovim peroksidom u octenoj kiselini dajući *N*-oksid (2). Slijedi nitriranje koristeći smjesu sumporne i dušične kiseline kojom nastaje 4-nitro derivat (3). Nitro skupina se zatim uklanja hidrosimetilacijom dajući međuprodukt (4). Dodavanjem anhidrida octene kiseline formira se esterski derivat (5), a u šestom koraku korištenjem jake baze nastaje alkohol, čija se hidrokسيلna skupina potom zamjenjuje kloridom koristeći tionil-klorid. Tako nastaje 2-klorometil-4-metoksi-2,3,5-trimetilpiridin (7). Daljnjom reakcijom sa benzimidazolom (8) klor izlazi iz spoja, pa nastaje spoj (9), koji u finalnom koraku oksidacijom tioeterske skupine pomoću vodikovog peroksida daje omeprazol (10).

Molekula omeprazola sastoji se od tri glavna dijela: benzimidazalnog prstena, premošćujuće sulfoksidne skupine i piridinskog dijela. Nadalje bitan utjecaj imaju i metoksi skupine, pa je tako benzimidazolni dio na jednom položaju supstituiran metoksidnom skupinom, dok je piridinski dio supstituiran jednom metoksidnom i dvije metilne skupine.²³

Benzimidazoli su spojevi važni zbog svoje komercijalne i farmaceutske primjene budući pokazuju farmakološku aktivnost. Osnova benzimidazola su šesteročlani benzenski i peteročlani imidazolni prsten na kojemu je prisutna N–H skupina koja je prikladna za odcjepljivanje protona pa tako nastaju soli, a u ovom konkretnom slučaju soli omeprazola.²³ U Ramanovim spektrima vrpce koje karakteriziraju upravo N–H skupinu na omeprazolu opažene su na 1514 cm^{-1} u infracrvenom spektru, odnosno na 1510 cm^{-1} u Ramanovom spektru. Benzimidazol kao dio molekule omeprazola detaljnije je opisan u poglavlju 4.2.2.

Sulfoksidna skupina je pak osnova sulfoksidnog mosta, a ona je ujedno i stereokemijski centar molekule pa omeprazol postoji kao *R* i *S* izomer (slika 5) pri čemu oba pokazuju aktivnost, ali se *S* izomer metabolizira sporije i reproducibilnije što rezultira produženim djelovanjem *S*-omeprazola (njegova je koncentracija kroz duže vrijeme održana u krvi). Omeprazol je racemat – smjesa oba enantiomera u omjeru 1 : 1 i uglavnom se kao takav ugrađuje u komercijalne proizvode (tablete i prije svega pelete (kapsule)).⁶

Slika 5. *R* i *S* enantiomeri omeprazola.

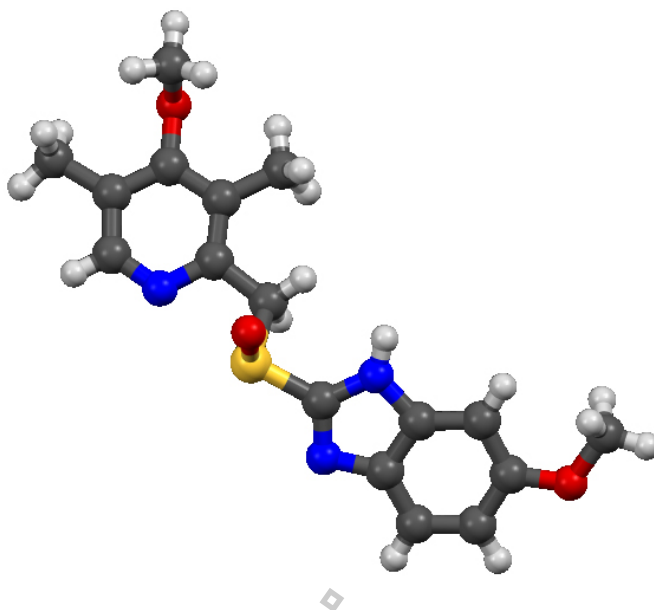
S-omeprazol, s obzirom na svoje karakteristike, također je pogodan za korištenje u različitim oblicima lijekova. Čistoća čistoga *S*-omeprazola iznosi i do 99 %. Zanimljivo je spomenuti i to, da je tijekom istraživanja i uspoređivanja rezultata otkriveno da *R*-izomer omeprazola bolje djeluje na štakore, *S*-izomer omeprazola na ljude, dok je na psima zabilježen jednako vrijedan učinak.³⁶

Piridin je kemijski spoj strukturno povezan sa benzenom, ali je jedan C atom iz šesteročlanog prstena zamijenjen dušikovim atomom. Farmakološki je aktivan, a u farmaceutskoj industriji često se koristi kao prekursor zbog svoje aktivnosti. Piridinski dio omeprazola čini piridin supstituiran s dvije metilne i jednom metoksidnom skupinom.^{37,38}

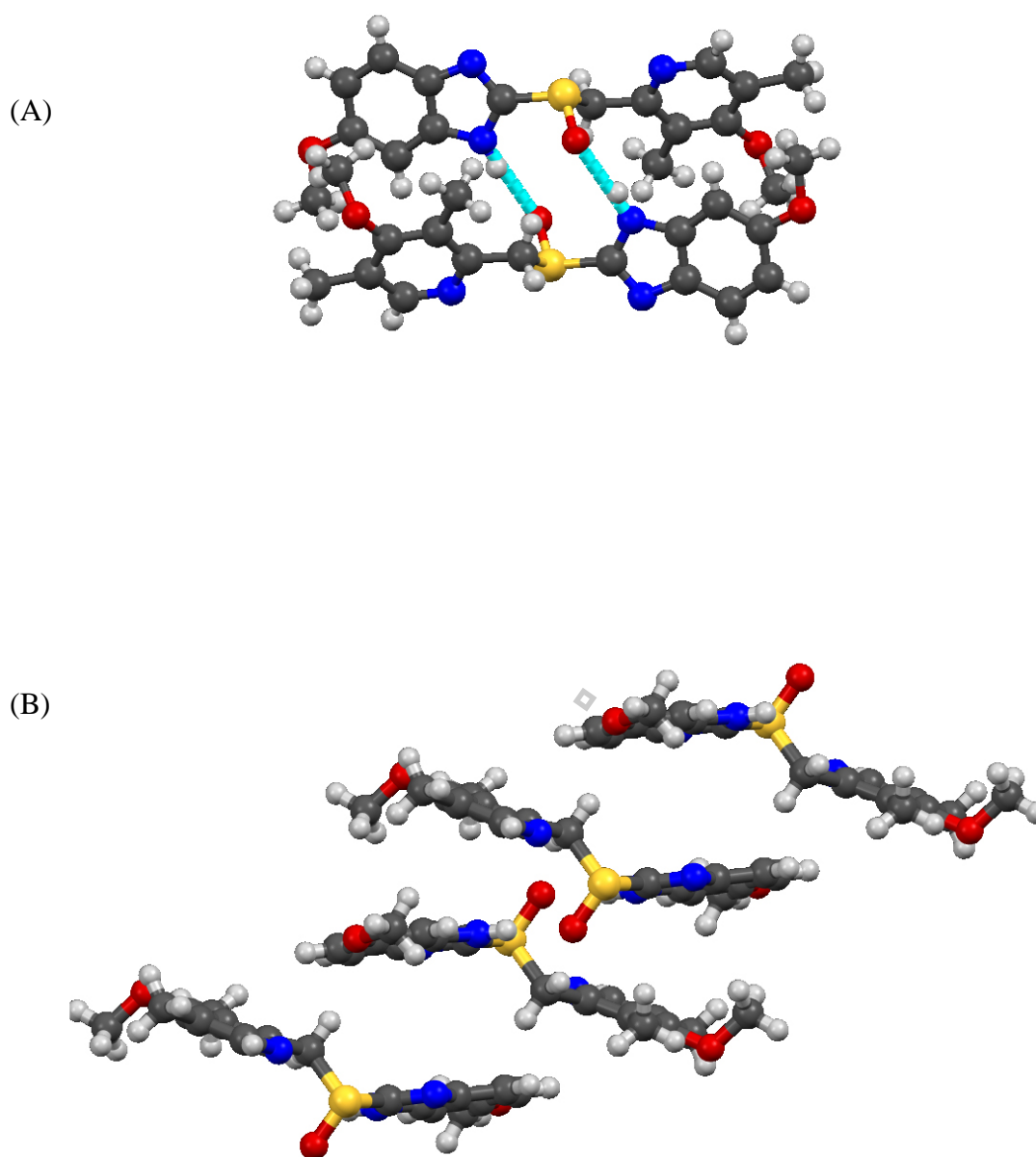
2.3. Kristalna struktura omeprazola

Godine 1989., riješena je i objavljena kristalna struktura omeprazola.³⁸ U tom radu, Ohishi je sa suradnicima zaključio, da omeprazol kristalizira u triklinskom sustavu. Piridin i benzimidazol su povezani preko metilsulfoksidne grupe (*trans*-konformacija) u gotovo potpuno koplanarnoj orijentaciji (slika 6). Nadalje, dvije centrosimetrično povezane molekule tvore ciklički dimer intermolekulskim N–H···O vodikovim vezama, a ti dimeri se drže skupa

van der Waalsovimi kontaktima između susjednih aromatskih prstena u kristalnoj strukturi (slika 7).



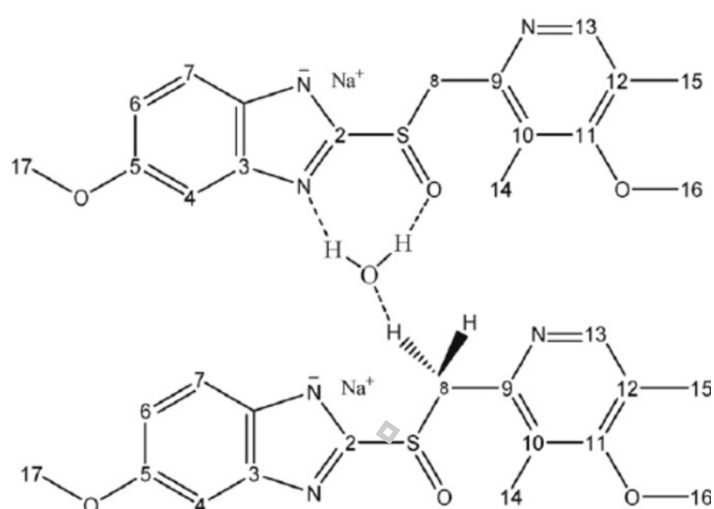
Slika 6. Struktura molekule omeprazola, gledana okomito na piridinski prsten.



Slika 7. (A) ciklička dimerna struktura formirana preko N–H···O međumolekulskih vodikovih veza reprezentirana točkastim linijama. (B) preklapajući način među susjednim aromatskim prstenovima.

2.4. Natrijeva sol omeprazola

Spoj 5-metoksi-2-[(*RS*)-[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1*H*-benzimidazol natrij (u daljnjem tekstu natrijeva sol omeprazola ili OMP-Na, slika 8) je najbolje istražena sol omeprazola ponajprije u svrhu ispitivanja moguće poboljšane topljivosti, bioraspoloživosti i stabilnosti s obzirom da je poznato kako omeprazol raspada pod utjecajem svjetlosti i temperature.^{39–43} Ta sol je bijeli higroskopi prah topljiv u vodi i etanolu.^{44,45,46} U komercijalnoj je upotrebi i daje se intravenozno.



Slika 8. Predložena strukturna formula natrijeve soli omeprazol monohidrata.⁵

U literaturnim navodima (prije svega patentima) stoji, da je poznato šest formi natrijeve soli (A, B, C, D, E, F) te kristalni solvat.^{47,48,49} Najčešće i najbolje definirane su forme A i B. Forma A je smjesa kristalnih formi i amorfnog materijala. Jedna od kristalnih formi iz te smjese (forma A) je hidrat s jednom ili dvije molekule vode, od kojih je jedna snažno vezana u kristalnu strukturu, dok se druga lagano odstranjuje sušenjem. Tako osušena tvar sadrži jednu snažno vezanu molekulu vode, vrlo je higroskopna te brzo absorbira vodu pod standardnim uvjetima. Forma B je kristalna forma koja u usporedbi sa nestabilnom formom A ima bolja svojstva – prije svega termodinamički je stabilnija i pravi je monohidrat. Uz to je i nehigroskopna što je čini pogodnom za industrijsku primjenu.⁴⁷ Najdetaljnije istraživanje (fizikalnu karakterizaciju) natrijeve soli omeprazola i usporedbu sa polaznim spojem (omeprazol) objavio je F. S. Murakami sa suradnicima.⁵ U radu je istražena karakterizacija omeprazola (OMP) u čvrstom stanju, natrijeve soli omeprazola (OMP-Na) te dehidratizirane

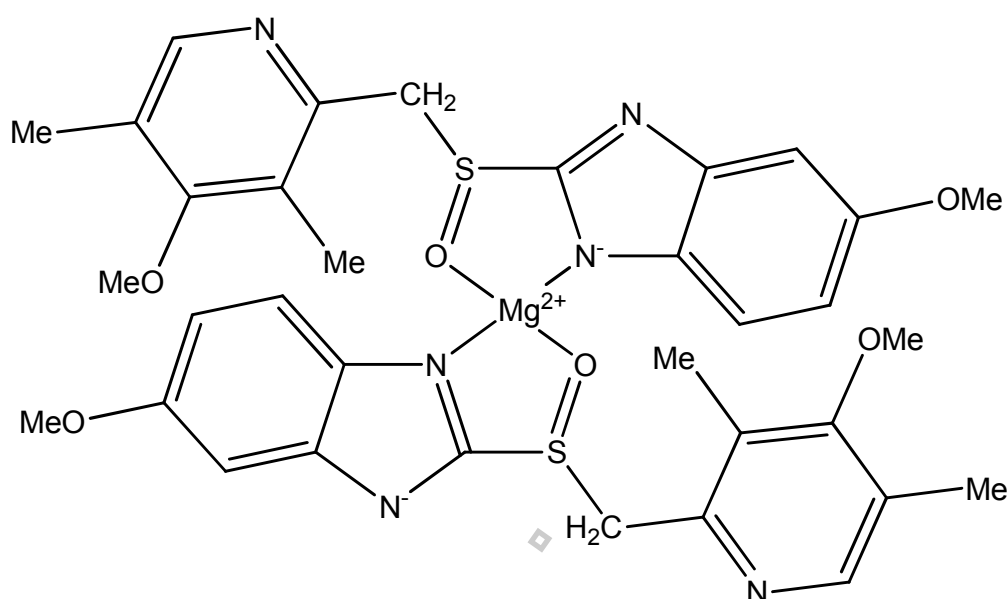
solu omeprazola (DOMP-Na) koristeći tehnike termičke analize (TGA/DTG i DSC), infracrvenu difuznu refleksiju (DRIFT), skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM) te rentgensku strukturnu analizu na praškastom uzorku (XRPD), kojima je uočeno da natrijeva sol omeprazola egzistira kao monohidrat te da se termički različito ponaša od bazične forme omeprazola. ^1H NMR spektroskopskom analizom u istom radu objašnjeno je da zbog kristalne vode u natrijevoj soli nastaju jake međumolekulske sile koje daju izrazito čvrstu strukturu kristalnoj rešetki. Dehidratacijom se struktura poruši i nastaje amorf. Nadalje ispitana je i stabilnost omeprazola, OMP-Na i DOMP-Na koristeći neizotermalnu kinetičku analizu-Ozawinu metodu.^{50,51} Uočeno je da je omeprazol u obliku soli stabilniji spoj od bazične forme. U konačnici predložena je i kristalna struktura hidrata natrijeve soli omeprazola, temeljena na riješenoj kristalnoj strukturi omeprazola.^{38,52} Iz predložene strukture (slika 8) je vidljivo da je jedna molekula vode vezana je vodikovim vezama preko dušika na imidazolnom prstenu ((C=N)···H-O) i sulfoksidnom grupom (S=O···H) jedne molekule natrijeve soli omeprazola, te C-H···O interakcijom (povremeno se opisuje kao slaba vodikova veza) pripisanu atomu C8 (C-H···O) druge molekule natrijeve soli omeprazola. Ta interakcija prema opisanom istraživanju stabilizira sol. Sukladno saznanjima u predstojećem istraživanju karakterizacijom Ramanovih i infracrvenih spektara takva se interakcija čini manje vjerojatnom. Asignacija karakterističnih vrpca trebala bi ponuditi vjerojatnije rješenje interakcija. Osnovna je pretpostavka da je vjerojatnije, da je veza ostvarena s kationom (u ovom konkretnom slučaju govori se o ionu natrija).

Vrlo zanimljivo istraživanje stabilnosti *R* i *S* izomera natrijeve soli omeprazola u usporedbi s osnovnim oblikom *R* i *S* izomera omeprazola objavio je 2006. godine N. Marković sa suradnicima.⁵³ Koristeći DSC metodu zaključio je da su oba izomera natrijeve soli omeprazola termički stabilnija (taljenje *S* izomera na 227 °C i *R* izomera na 229 °C) od neutralne forme omeprazola koji se tali na 159 °C.^{3,54,55}

S tim u vezi važno je spomenuti i istraživanje objavljeno u sklopu patenta US 4,738,974,⁵⁹ a u kojem je između ostalog uspoređivana stabilnost omeprazola nasuprot natrijevoj soli. Oba spoja pohranjena su na šest mjeseci na uvjete +37 °C i 80 % relativne vlage. Po isteku zadanog vremenskog perioda izmjerena je razina raspadnog produkta prisutnog u svakom pojedinom spoju, a izraženo u postocima je iznosila 6 % za omeprazol i samo 0,4 % za natrijevu sol. Iz tih rezultata također se povlače zaključci o boljoj stabilnosti natrijeve soli omeprazola nasuprot osnovnom obliku omeprazola.

2.5. Magnezijeva sol omeprazola

Spoj 5-metoksi-2-[(*RS*)-[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1*H*-benzimidazol magnezij (u daljnjem tekstu magnezijeva sol omeprazola ili OMP-Mg, slika 9) je jedina sol koja se za sada komercijalno primjenjuje u čvrstom oralnom obliku, a nalazimo ju u tabletama i kapsulama.



Slika 9. Strukturna formula diomeprazol magnezija.

U literaturi je slabo istražena pa tako nalazimo tek nekoliko патената u kojima je opisana priprava te djelomična fizikalna karakterizacija kristalne forme i amorfa.^{56,57,58} Pripravljena magnezijeva sol omeprazola kristalizira kao magnezijev omeprazolat dihidrat sa dvije kristalno vezane vode. Magnezijevu sol omeprazola odlikuju krhki kristali zbog kojih je proizvodnja industrijskih razmjera donekle nepovoljna,^{59,60} ali je sama sol vrlo stabilna pa je s te strane njeno korištenje komercijalno opravdano i isplativo.

2.6. Kalijeva, kalcijeva i litijeva sol omeprazola

Gotovo u potpunosti neistražene su kalijeva, litijeva te kalcijeva sol omeprazola u smislu fizikalno-kemijske karakterizacije (tehnike, forme, stabilnost, usporedba sa omeprazolom itd.). U literaturi nalazimo tek informaciju o pripravi i točki tališta za kalijevu sol, a litijeva sol je pored toga okarakterizirana i NMR tehnikom.⁶¹ Kalcijeva sol je u usporedbi sa kalijevom i litijevom nešto bolje okarakterizirana samo sa stanovišta uporabljenih tehnika jer nalazimo uz informacije o pripravi, točki tališta te NMR-u još i XPRD te termičke metode (DSC i TGA).^{1,61}

2.7. Fizikalne osnove molekulskih vibracija

Molekule se sastoje od atoma koji imaju određenu masu i povezani su elastičnim vezama. Zbog toga mogu izvoditi periodička gibanja i imaju vibracijske stupnjeve slobode. Sva gibanja atoma u molekuli, gledano relativno među sobom su superpozicije takozvanih normalnih vibracija, u kojima svi atomi vibriraju u istoj fazi i normalnom frekvencijom, a različitim amplitudama. Njihove su amplitude opisane normalnim koordinatama. Višeatomne molekule s N atoma posjeduju $3N-6$ normalnih vibracija (linearne imaju $3N-5$), koje definiraju njihove vibracijske spektre. Ti spektri ovise o masama atoma, geometrijskom rasporedu i snazi kemijskih veza. Energija molekule se sastoji djelomično od translacijske, rotacijske, vibracijske, a djelomično i od elektronske energije. Ako prime energiju, molekule se pobuđuju u vibracijsko gibanje. Vibracijska energija je kvantizirana i može poprimiti samo točno određene vrijednosti koje se opisuju kvantnim brojevima.

Opis molekuskog gibanja nije moguće opisati samo klasičnom mehanikom, već se proširuje kvantnom mehanikom. Zato se uvode odgovarajuće matematičke veličine koje se nazivaju kvantnomehanički operatori, a koji djeluju na funkcije stanja proučavanog modela. Operator koji odgovara ukupnoj energiji sustava (zbroj kinetičke i potencijalne energije) naziva se hamiltonijan, odnosno Hamiltonov operator, \hat{H} ,

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V}. \quad (1)$$

Vremenski neovisna (stacionarna), energijska stanja nekog kvantno mehaničkog sustava dobivaju se kao rješenja jednadžbe vlastitih vrijednosti tog operatora,

$$\hat{H}\Psi = E\Psi. \quad (2)$$

To je upravo sažeti oblik Schrödingerove jednadžbe pripisane sistemu u kojoj je Ψ vlastita funkcija, a E pripadajuća vlastita vrijednost energije sustava. Za jednodimenzijski i jednočestični sustav Schrödingerova jednadžba potom glasi

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + V(x)\Psi(x) = E\Psi(x). \quad (3)$$

Funkcija koja opisuje realnu vjerojatnost nalaženja preko cijelog prostora opisana je sa Ψ zadovoljava uvjet normiranja

$$\int \Psi^* \Psi d\tau = 1. \quad (4)$$



Za diskretna energijska stanja jednodimezijskog harmoničkog oscilatora dobiva se rezultat:

$$E_n = hc\omega \left(v + \frac{1}{2} \right), v = 0, 1, 2, 3 \dots \quad (5)$$

v je vibracijski kvantni broj, koji poprima sve pozitivne vrijednosti uključujući i nulu (za osnovno stanje sustava). Uvijek su dopušteni samo određeni prijelazi, odnosno $\Delta v = \pm 1$. To su tzv. *izborna pravila* koja se daju izvesti iz vremenski ovisne Schrödingerove jednadžbe koja opisuje međudjelovanje oscilatora i elektromagnetskog zračenja.

S druge strane, rotacijska energija E_r se klasično mehanički prikazuje kao

$$E_r = \frac{1}{2} I\omega^2 \quad (6)$$

gdje je I moment inercije, a ω kutna brzina, no i u ovom slučaju proširujemo opis sa kvantnom mehanikom pa vrijede sljedeća rješenja Schrödingerove jednanžbe

$$E_r = \frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J+1) \text{ uz } J = 0, 1, 2 \dots \quad (7)$$

gdje je J rotacijski kvantni broj.

S obzirom, da za promjenu rotacijskog kvantnog broja vrijedi izborno pravilo u infracrvenoj spektroskopiji $\Delta J = \pm 1$ ili 0, razliku među rotacijskim termovima (ΔE_r) slijedeći jednadžbu $\Delta E = h\nu = hc\bar{\nu}$ možemo opisati kao

$$\Delta F = 2B(J+1) \quad (8)$$

gdje je B rotacijska konstanta $B = \frac{h}{8\pi^2 cI}$ izražena u valnim brojevima cm^{-1} .



2.8. Sekularna determinanta

Frekvencije i normalni modovi vibriranja mogu biti predstavljeni/izračunani i matematički. Za te račune potrebno je imati saznanja o interatomskim silama, dužinama veza i kuteva molekule.

Želi li se izraziti odstupanja od ravnotežnog položaja za višeatomnu molekulu od N atoma sustav se opisuje skupovima koordinata X_1, Y_1, Z_1 za atom 1, X_2, Y_2, Z_2 za atom 2, X_N, Y_N, Z_N za atom N , ili općenitije $q_1, q_2, q_3, \dots, q_{3N}$. Koordinate q_i gdje je $i = 1, 2, 3, \dots, 3N$ se mogu koristiti kako bi se izrazila potencijalna (V) i kinetička energija (T). Prikladni izrazi za potencijalnu i kinetičku energiju su stoga

$$2V = \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} f_{ij} q_i q_j \text{ i } 2T = \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} m_{ij} \dot{q}_i \dot{q}_j \quad (9)$$

gdje je \dot{q} zapravo dq/dt , a q_i i q_j su i -ta i j -ta koordinata koje nisu nužno jednake za opći slučaj ($i = j$ ili $i \neq j$). f_{ij} su konstante sile, a m_{ij} su funkcije atomskih masa.

Newtonove jednadžbe kretanja mogu biti zapisane u Lagrangeovom obliku,

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial T}{\partial \dot{q}_i} \right) + \frac{\partial V}{\partial q_i} = 0 \quad (10)$$

$$\sum_{j=1}^{3N} m_{ij} \ddot{q}_j + \sum_{j=1}^{3N} f_{ij} q_j = 0 \quad (11)$$

$$\frac{\partial V}{\partial q_i} = \sum_{j=1}^{3N} f_{ij} q_j \quad \frac{\partial T}{\partial \dot{q}_i} = \sum_{j=1}^{3N} m_{ij} \dot{q}_j \quad \frac{d}{dt} \left(\frac{\partial T}{\partial \dot{q}_i} \right) = \sum_{j=1}^{3N} m_{ij} \ddot{q}_j \quad (12)$$

Generalno rješenje za $3N$ jednadžbe je potom

$$q_j = A_j \sin(\sqrt{\lambda}t + \alpha), \quad (13)$$

gdje je $\sqrt{\lambda} = 2\pi\nu$, a ta je jednadžba karakteristična za jednostavno harmoničko gibanje.

U konačnici se sekularne jednadžbe opisuju preko jednadžbe (11) kao

$$\begin{aligned} (f_{11} - m_{11}\lambda)A_1 + (f_{12} - m_{12}\lambda)A_2 + \dots + (f_{1,3N} - m_{1,3N}\lambda)A_{3N} &= 0 \\ (f_{21} - m_{21}\lambda)A_1 + (f_{22} - m_{22}\lambda)A_2 + \dots + (f_{2,3N} - m_{2,3N}\lambda)A_{3N} &= 0 \\ \dots & \dots \dots \dots \\ (f_{3N,1} - m_{3N,1}\lambda)A_1 + (f_{3N,2} - m_{3N,2}\lambda)A_2 + \dots + (f_{3N,3N} - m_{3N,3N}\lambda)A_{3N} &= 0 \end{aligned} \quad (14)$$

Ovaj skup linearnih homogenih jednadžbi ima rješenja različita od nule za vrijednosti A samo za određene vrijednosti λ . One mogu biti pronađene koristeći olakotnu okolnost da determinanta vrijednosti A mora biti jednaka nuli.

2.9. Infracrvena i Ramanova spektroskopija

Elektromagnetsko zračenje sastoji od izmjenjivog električnog i magnetskog polja. Prema kvantnoj teoriji, zračenje se iz izvora emitira u fotonima (diskretnim jedinicama) pri čemu su energija fotona i frekvencija korelirane izrazom,

$$\Delta E = h\nu \quad (15)$$

pri čemu je h Planckova konstanta, a ν frekvencija fotona.

Fotoni određene energije mogu biti apsorbirani (ili emitirani) od strane molekule što rezultira predajom energije. Kod apsorpcijske spektroskopije to rezultira pobuđivanjem molekule iz osnovnog u pobuđeno stanje, pri čemu se govori o promjeni rotacijske (E_{rot}), vibracijske (E_{vib}) ili elektronske energije (E_{el}) pri čemu je promjena dana izrazom,

$$\Delta E = h\nu = hc\bar{\nu} \quad (16)$$

gdje oznaka $\bar{\nu}$ predstavlja valni broj fotona.

Prilikom apsorpcije fotona, promjena energije je pozitivna. Prema Born-Oppenheimerovoj aproksimaciji, energija molekule se može rastaviti u zbroj elektronske, vibracijske i rotacijske energije

$$E_T = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (17)$$

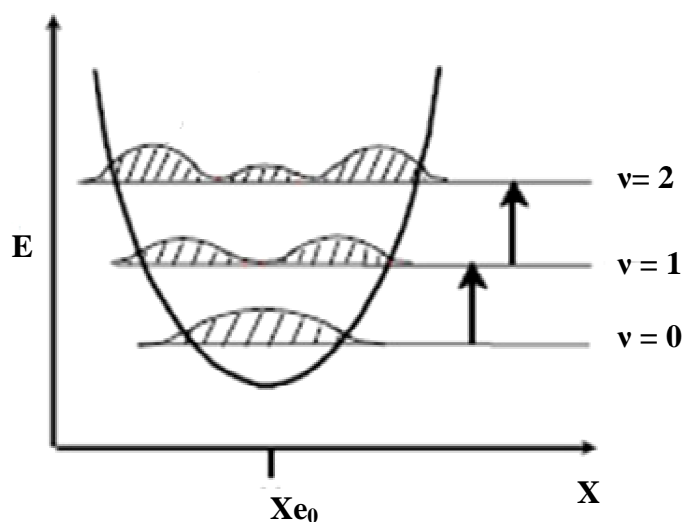
Ramanova i infracrvena spektroskopija kod tvari u čvrstom i tekućem stanju detektiraju promjenu u E_{vib} , dok će kod tvari u plinovitom stanju detektirati promjene u vibracijskoj i rotacijskoj energiji ($E_{vib} + E_{rot}$).

Vibracijska spektroskopija uvelike se oslanja na kvantno mehaničku teoriju harmoničnog oscilatora, čija je potencijalna energija molekule sastavljena od dva atoma dana izrazom

$$V(x) = \left(\frac{1}{2}\right)kx^2 \quad (18)$$

Krivulja potencijalne energije takvog sustava je funkcija udaljenosti x između masa i predstavlja parabolu (slika 10). Minimum parabola ima za vrijednost x_e , što predstavlja ravnotežnu udaljenost dva atoma. Konstanta sile k je mjera zakrivljenosti potencijalne jame u blizini x_e . Molekule raspolažu samo s kvantiziranim energetska stanjima, stoga je vibracijska

energija diskretna veličina. Pri određenim uvjetima, molekule mogu prelaziti iz jednog energetskeg stanja u drugo, što se upravo mjeri spektroskopskim metodama.



Slika 10. Potencijalna energija u odnosu na intramolekularnu udaljenost, X , za diatomski harmonički oscilator.

Kada se govori o infracrvenoj spektroskopiji, najčešće se to odnosi na područje valnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} , pri čemu je odnos između intenziteta propuštenog infracrvenog zračenja i koncentracije analita dan Lambert-Beerovim zakonom.

Dvije najvažnije komponente za opisivanje procesa apsorpcije infracrvenog zračenja su frekvencija zračenja i dipolni moment molekule. Uvjet da bi došlo do apsorpcije enregije upadnog zračenja jest promjena u dipolnom momentu molekule.

Dipolni moment, $\vec{\mu}$, (slika 11) je funkcija magnitude atomskih naboja, e_i i njihovih položaja \vec{r}_i ,

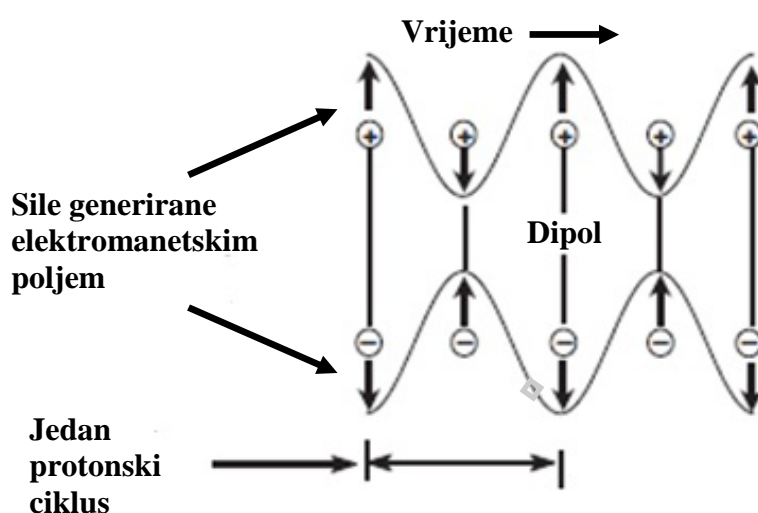
$$\vec{\mu} = \sum_i e_i \vec{r}_i. \quad (19)$$

Interakcija infracrvenog zračenja s vibrirajućom molekulom je moguća samo ako električni vektor zračenja polja oscilira istom frekvencijom kao i molekulski dipolni moment. Vibracija je aktivna u infracrvenom području samo ako se molekulski dipolni moment mijenja u

ovisnosti o normalnoj vibraciji koja se definira kao kombinacija promjena u položajima atoma u molekuli,

$$\left(\frac{\partial \mu}{\partial q}\right)_0 \neq 0 \quad (20)$$

gdje je μ molekulski dipolni moment, a q je normalna koordinata koja opisuje gibanje atoma tijekom normalne vibracije izvan njihovih ravnotežnih položaja.



Slika 11. Oscilirajuće elektromagnetsko polje stvara oscilirajuće, suprotno usmjerene sile na pozitivne i negativne naboje molekularnog dipola. Dipolni razmak oscilira istom frekvencijom kao i upadni foton.

Ramanova spektroskopija temelji se na sasvim drugim principima. Fenomen raspršenja svjetlosti može se opisati kao zračenje koje nastaje ured prijelaza među vibracijskim stanjima dipola induciranog vanjskim elektromagnetskim poljem. Svjetlom raspršeni fotoni sadrže uglavnom dominantno Rayleighovo i vrlo malu količinu Ramanove raspršene svjetlosti. Kada se vanjsko električno polje \vec{E} , primijeni na molekulu, elektroni i jezgre reagiraju kretanjem u suprotnim smjerovima sukladno Columbovom zakonu. Primijenjeno vanjsko električno polje stoga inducira dipolni moment $\vec{\mu}$ u molekuli. Inducirani dipolni moment ovisi o fleksibilnosti

elektrona i jezgre pojedine molekule, a opisan je polarizabilnošću α . Sve dok primijenjeno vanjsko električno polje nije prejako, inducirani dipolni moment je linearno proporcionalan s primijenjenim električnim poljem. Ovisno o simetriji molekule, ako se na nju primjeni vanjsko električno polje i generirani inducirani dipolni moment ima isti smjer kao i vanjsko električno polje govorimo o izotropnim molekulama. Za taj slučaj vrijede sljedeće jednadžbe:

$$\mu_x = \alpha E_x \quad \mu_y = \alpha E_y \quad \mu_z = \alpha E_z \quad (21)$$

Vektor električnog polja je u gornjem slučaju rastavljen u komponente Kartezijevih koordinata. U tom slučaju je polarizabilnost α jednaka u svim smjerovima.

U drugom slučaju moguće je da inducirani dipolni moment nije paralelan sa upadnim vanjskim električnim poljem, odnosno da je polarizabilnost α različita u x , y i z smjerovima. U tom slučaju komponenta vanjskog električnog polja E_x inducira dipol u x smjeru, ali može imati i komponente u y te z smjeru. Tako vrijedi i za ostale komponente:

$$\begin{aligned} \mu_x &= \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \\ \mu_y &= \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \\ \mu_z &= \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \end{aligned} \quad (22)$$

Takav sistem koeficijenata koji opisuje linearnu vezu između vektora ($\vec{\mu}$ i \vec{E}) označava se kao tenzor pa je tako i polarizabilnost tenzor, što se matematičkim rječnikom objašnjava kao geometrijski objekt koji opisuje linearnu poveznicu između geometrijskih vektora, skalara i drugih tenzora

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E} . \quad (23)$$

Iz prethodno navedenoga slijedi, da je polarizabilnost mjera kojom se lakoćom elektronski oblak oko molekule može deformirati.

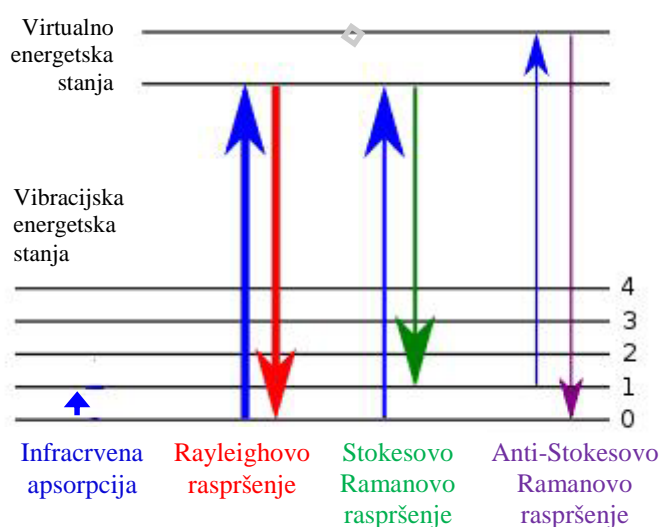
No, bitna je činjenica da molekulama polarizabilnost nije konstanta jer neke vibracije i rotacije utječu na nju pa se α mijenja. U dvoatomnoj molekuli se tijekom vibracije oblik iste mijenja (stiskanje i produživanje). Taj elektronski oblak nije isti u ekstremima te dolazi do

promjene u polarizabilnosti. Za mala premještanja polarizabilnost se može proširiti prema izrazu

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial q} q + \dots \quad (24)$$

gdje je sa α_0 označena ravnotežna polarizabilnost, q je normalna koordinata, a $\delta\alpha/\delta q$ je brzina promjene polarizabilnosti u odnosu na q izmjeren pri ravnotežnoj konfiguraciji.

Većina tih raspršenih fotona ima u potpunosti istu valnu duljinu kao i ulazni fotoni i ta se pojava naziva Rayleighovo raspršenje, no jedan mali broj (obično 1 od 10^7) raspršenog zračenja ima valnu duljinu pomaknutu. Ti fotoni veće ili manje enregije nazivaju se Ramanovo raspršenje. Većina Ramanovo raspršenih fotona ima energiju pomaknutu prema većim valnim dužinama (Stokesov pomak), a manji dio energiju pomaknutu prema manjim valnim dužinama (anti-Stokesov pomak) jer samo molekule koje su vibracijski pobuđene prije zračenja mogu sudjeovati u anti-Stokesovom pomaku – slika 12.



Slika 12. Dijagrami energetskih nivoa nivoa Rayleighovog, Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja.

S druge strane infracrveno zračenje je apsorbirano od strane molekule i pretvoreno u energiju molekulske vibracije. U infracrvenoj spektroskopiji, molekula je izložena infracrvenom

zračenju te kada se zračena energija podudara sa specifičnim molekulskim vibracijama – dolazi do apsorpcije.

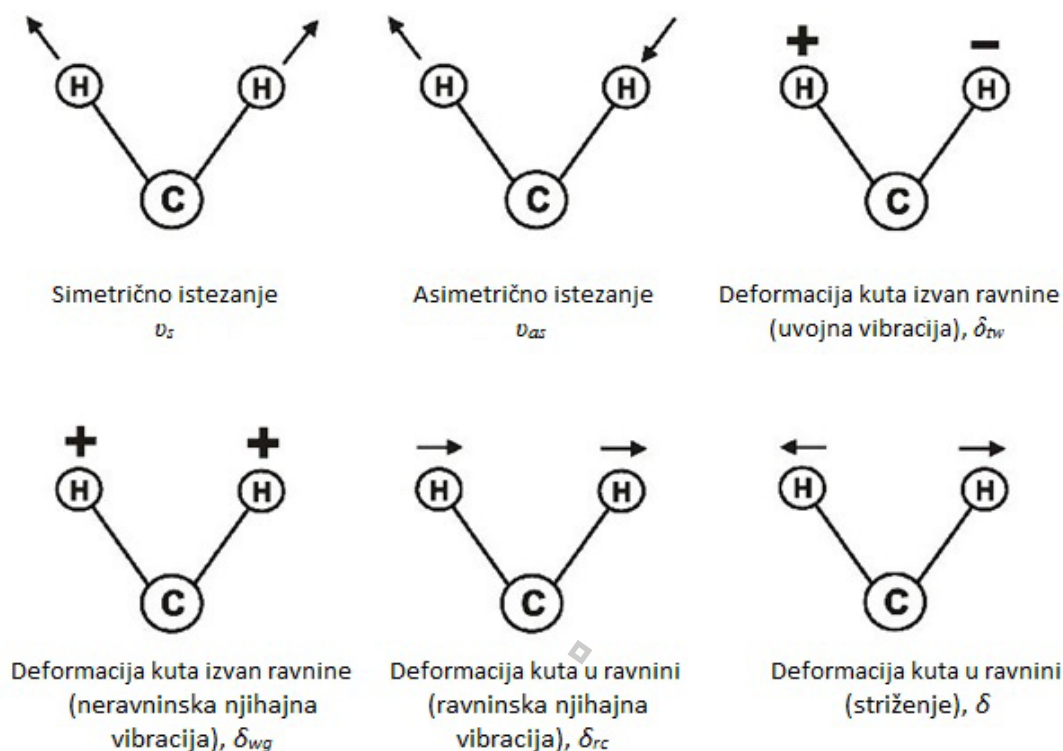
2.10. Vibracije višeatomnih molekula

Apsorpcija infracrvenog zračenja događa se stoga što postoje stanja molekule takva da su razlike njihovih energija u području energija infracrvenog izvora. Ta molekulska stanja opisana su valnom funkcijom koja je rješenje vibracijskog hamiltonijana molekule, a u njemu su obuhvaćena istežanja kovalentnih veza i savijanja kuteva u molekuli. Kao što je već spomenuto, višeatomne molekule imaju određen broj vibracijskih stupnjeva slobode koji je definiran kao $3N-6$ za nelinearne, odnosno s $3N-5$ za linearne molekule, pri čemu N označava broj atoma u molekuli. Molekula s N atoma ima $3N$ stupnjeva slobode, od kojih 6 odgovaraju translacijama i rotacijama molekule. Iz rješenja broja vibracija neke molekule, koji se mogu pobuditi, a koji se izračunao na gore navedeni način, dobiva se broj *normalnih vibracijskih modova*. U svakom normalnom modu vibracije, svi atomi u molekuli vibriraju istom frekvencijom i svi atomi prolaze kroz svoje ravnotežne položaje simultano. Relativne vibracijske amplitude pojedinih atoma mogu biti različite u veličini i smjeru, ali se centar gravitacije ne miče i molekula ne rotira. Ako su sile koje drže molekulu na okupu linearne funkcije izmještanja jezgri iz ravnotežnih konfiguracija, tada će molekulske vibracije biti harmonične. S obzirom na ta saznanja moguće je pronaći broj i opisati načine vibriranja pojedinih molekula i/ili fragmenata odnosno skupina na molekulama. Na slici 13 opisani su mogući načini vibriranja, a podjeljeni su na nekoliko skupina. Osnovna podjela je na istežne vibracije i deformacije kuta.

Promjena dužine veze odnosno istežanje (*engl. "stretching"*) može biti simetrično ν_s i asimetrično ν_{as} , a deformacija (promjena) kuta (*engl. "bending"*) veze uključuje striženje δ (*engl. "scissoring"*) i torzijske vibracije. Potonje su klaćenje, odnosno neravninska njihajna vibracija δ_{wg} (*engl. wagging*), zibanje, odnosno ravninska njihajna vibracija δ_{rc} (*engl. rocking*) te uvojna vibracija δ_{tw} (*engl. twisting*).⁶²

Pri opisu normalnih modova vibracije bitno je spomenuti i pojam *stupnja degeneracije*. Naime, sadrži li neka molekula primjerice dvije deformacijske vibracije koje se opisuju dvjema prostornim koordinatama, a sa pogleda načina vibriranja opaža se striženje i klaćenje,

kojima za troatomnu linearnu molekulu smjer gibanja izlazi pod kutem od 90° iz ravnine papira, odnosno u ravnini papira, jasno je da te frekvencije imaju istu vrijednosti. Vibracije iste frekvencije su prema tome *degenerirane*, a za prethodno opisani primjer proizlazi pojam *dvostruko degenerirane vibracije*.

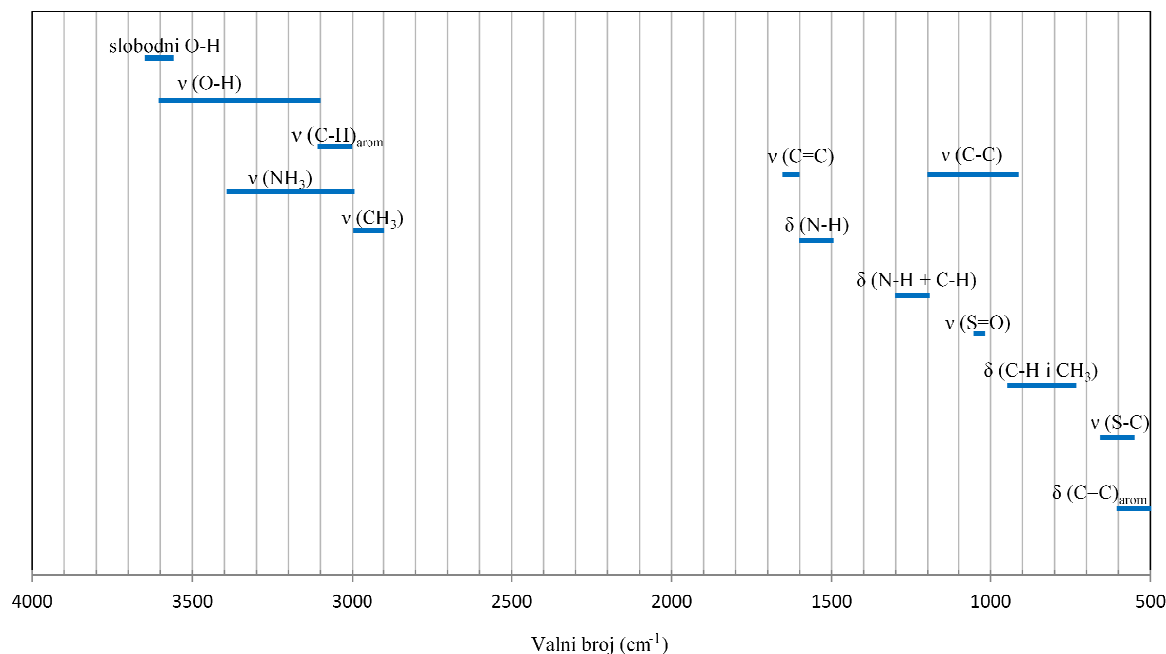


Slika 13. Istezne i deformacijske vibracije višeatomne molekule.

2.11. Grupne vibracije

Kao što je prethodno opisano svaka molekula ovisno o broju atoma ima određen broj normalnih modova vibracija koje se ovisno o aktivnosti (promjena dipola/polarizabilnosti) manifestiraju preko specifičnih vrpca u spektrima. Asignacija vrpca predstavlja pripisivanje određenog normalnog moda vibracije pojedinom opaženom vibracijskom prijelazu. Empirijski je uočena pojava vrpca u vibracijskim spektrima molekula s podudarnim kemijskim grupama atoma (npr. C=O, $-\text{CH}_3$ itd). Zbog toga se govori o *grupnim vibracijama*. Postoje stoga osnovne podjele na područja grupnih vibracija primjerice u infracrvenom/Ramanovom spektru – slika 14. Prepoznaju se specifična područja za jednostruke, dvostruke i trostruke CC

veze, zatim područja specifična za C–X istezanja koja su pomaknuta prema nižim valnim brojevima itd.



Slika 14. Prikaz pojedinih apsorpcijskih frekvencija u infracrvenom području za omeprazol.

2.12. Simetrija

Molekulska simetrija pomaže u shvaćanju molekulske strukture, kemijskih te fizičkih svojstava. U vibracijskoj spektroskopiji je posebno važna jer kod višeatomnih molekula postoje simetrijska svojstva koja određuju aktivnost u Ramanovom i infracrvenom spektru. Gledajući simetrijske elemente molekule bitne su one operacije koje molekulsku strukturu prevode samu u sebe – skup svih operacija pridruženih jednoj molekuli čini grupu. U vibracijskoj spektroskopiji se govori o takozvanim grupama točke jer najmanje jedna točka u molekuli ostaje nepokretna (centar mase). Simetrija neke molekule opisuje se preko simetrijskih elemenata i operacija opisanih u tablici 1:

Tablica 1. Simetrijske operacije i elementi simetrije.

Simetrijska operacija	Simetrijski element
Refleksija u ravnini	Refleksija (σ)
Zakret oko osi za $360^\circ/n$	Rotacija (C_n)
Zakret oko osi za $360^\circ/n$, pa refleksija u ravnini okomitom na os	Rotacijsko-refleksijska os (S_n)
Centar inverzije	Centar inverzije (i)
Bez promjene	Identitet (E)

Jedan od primjera grupe točke je i C_{3v} kojoj pripada primjerice molekula amonijaka kada ne bi postojala inverzija (NH_3). Vibracijske forme koje se opažaju u ovom slučaju, zapisuju se u tablici karaktera (tablica 2) koja redom sadrži ireducibilne reprezentacije (retci), dok su stupci rezervirani za klase simetrije. Rezultat simetrijske operacije na koordinate mogu biti opet iste koordinate pomnožene s karakterom transformacije (u najjednostavnijim slučajevima npr. +1 ili -1), ili se grupe koordinata transformiraju u njihove linearne kombinacije. Uz translacije i rotacije opisan je i tenzor polarizabilnosti α (rastavljen na komponente). Osim toga translacija ($T_{x,y,z}$) se transformira kao i Kartezijeve koordinate (x, y, z) odnosno dipolni moment ($\mu_{x,y,z}$). Tim saznanjima omogućeno je prepoznati infracrvenu odnosno Ramanovu aktivnost, a s tim u vezi i koji je vibracijski prijelaz dopušten u infracrvenom (komponenta dipolnog momenta), a koji u Ramanovom spektru.

Tablica 2. Tablica karaktera za C_{3v} točkinu grupu.

	E	2C₃ (z)	3σ_v	translacije, rotacije	
A₁	1	1	1	T _z	$\alpha_{xx} + \alpha_{yy}, \alpha_{zz}$
A₂	1	1	-1	R _z	
E	2	-1	0	(T _x , T _y) (R _x , R _y)	$(\alpha_{xx} - \alpha_{yy}, \alpha_{xy}) (\alpha_{yz}, \alpha_{xz})$

Izborna pravila za C_{3v} su:

infracrveno – A_2 , E, $A_1 \times A_2$, $(A_2)^n$ (n neparno)

Raman – A_1 , E, A_2^n (n parno), $E \times E$

Dodatno je važno spomenuti i specifično pravilo vezano uz infracrvenu/Ramanovu aktivnost, a koja se tiče molekula koje posjeduju centar inverzije, kao što je na primjer molekula acetilena. U takvim molekulama refleksija bilo koje točke kroz centar ima identičnu točku na drugoj strani. Za takve molekule vrijedi takozvano dodatno *pravilo uzajamne isključivosti*, koje kaže da za molekule s centrom inverzije one vibracije koje su aktivne u Ramanovom spektru ne mogu istovremeno biti aktivne u infracrvenom spektru i obratno, a to znači da se spektri međusobno isključuju.

2.13. Tehnike snimanja Ramanovih i infracrvenih spektara

Od konstrukcije prvih Ramanovih i infracrvenih spektrometara čovjekova saznanja i sama tehnologija je bitno unapređivala, te su se tijekom godina razvile različite tehnike u Ramanovoj i infracrvenoj spektroskopiji, koje danas omogućuju snimanje različitih tipova uzoraka te pružaju informacije koje u počecima nije bilo moguće prikupiti. Važnije tehnike opisane su u narednim podpoglavljima (2.13.1. do 2.13.4. – Ramanove tehnike i 2.13.5. do 2.13.8. – infracrvene tehnike) izuzev mikrospektroskopskih tehnika, koje su se razvile zadnjih dvadesetak, a detaljno su opisane u poglavlju 2.15.

2.13.1. Ramanova spektroskopija

U današnje vrijeme većina laboratorija koristi interferometarske ili disperzivne Ramanove spektrometre. Prvi tip koristi za pobuđivanje jedan laser, obično valne duljine 1064 nm i sistem na bazi interferometra koji transformira intenzitet signala iz prostorne u frekvencijsku domenu, tj koristi program na bazi Fourierove transformacije za kreiranje spektra. Drugi pak spektrometar koristi difrakcijsku rešetku kako bi se raspršila svjetlost odbijena od uzorka i zatim detektirala na višekanalnom detektoru kao što je npr. CCD (engl. *charge coupled device*). Disperzivni Ramanov spektrometar ima mogućnost koristiti višestruke lasere valnih

duljina iz vidljivog dijela spektra (npr. 532 nm, 633 nm, 785 nm). Svaki od ova dva tipa instrumenata ima svoje prednosti i nedostatke, pa se prema zahtjevima i potrebama istraživanja odlučuje za pojedini tip instrumenta. Tako je primjerice glavna prednost FT-Ramanovog spektrometra ta, što smanjuje fluorescenciju uzorka zbog veće valne duljine koja se koristi za pobuđivanje (1064 nm). Disperzivni Ramanov spektrometar pak osim što omogućuje korištenje višestrukih valnih duljina odlikuje se i pojačanom osjetljivošću, kontroli dubine prodiranja u uzorak te prostornu razlučljivost oko 1 μm .

Prikladno je spomenuti, da se eksperimentalno u slučaju instrumenata koji koriste CCD detektor, umjesto mjerenja snage izravno intenzitet raspršenog zračenja, izražava u jedinicama cts (engl. *counts*), a to je broj detektiranih fotona određene frekvencije ili valnog broja, koji padne na detektor u zadanoj jedinici vremena (najčešće u 1 sekundi).

2.13.2. Koherentna anti-Stokesova Ramanova spektroskopija

Koherentna anti-Stokesova Ramanova spektroskopija (engl. *Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy – CARS*) je metoda vibracijske spektroskopije, koja se koristi primarno u kemiji i fizici te srodnim poljima. Glavna eksperimentalna prednost metode CARS leži u stvaranju snažnog signala, dok je istovremeno metoda čak i do devet redova veličine manje osjetljiva na fluorescenciju nego u slučaju spontanog raspršenja. CARS koristi višestruke fotone za molekulske vibracije i stvara koherentni signal te je zbog toga signal višestruko snažniji. Tri laserske frekvencije interagiraju rezonantno sa specifičnom molekulskom vibracijom. To su frekvencija pumpe ω_p , Stokesova frekvencija ω_s te frekvencija probe ω_{pr} . CARS signali se stvaraju prikračim valnim duljinama od ekscitiranih (anti-Stokes) stvarajući koherentni optički signal ($\omega_{pr} + \omega_p - \omega_s$).

2.13.3. Rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS)

Rezonancija se javlja u Ramanovoj spektroskopiji kada je energija fotona pobuđujuće laserske zrake otprilike jednaka energiji elektronskog prijelaza između osnovnog i nekog pobuđenog elektronskog stanja. Moguće je identificirati dva široka tipa rezonantnog efekta – predrezonantni Ramanov efekt (pre-RRE) i rigorozni Ramanov efekt (RRE). Tipično se pre-RRE opaža kada frekvencija pobuđenog zračenja upada unutar krila više ili niže frekvencije, ali ne i unutar promatrane vibracijske strukture elektronske apsorpcijske vrpce koja je

uključena u proces Ramanovog raspršenja. U slučaju kada frekvencija pobuđenog zračenja pada unutar promatrane vibracijske strukture, opaža se RRE. Intenziteti Ramanovih vrpca povezanih sa totalno simetričnim vibracijskim modovima i koji su snažno povezani sa elektronskim pobuđenim stanjem, mogu biti pojačani do faktora 10^6 . Zbog tog pojačanja je RRS primamljiv kemičarima, biokemičarima, biologima te fizičarima. Tehnika se koristila do sada za najrazličitija istraživanja od primjerice jodove pare, preko monokristala GaAs, hemskih proteina u otopini itd.

2.13.4. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *Surface enhanced Raman scattering – SERS*) je tehnika koja premošćuje poznati nedostatak Ramanovog raspršenja, a to je prirodna slabost raspršenja. Ti faktori pojačanja mogu biti i do $10^{10} - 10^{11}$, što je dovoljno za detekciju spektra čak i pojedine molekule. SERS je primjenjiv u brojnim granama prirodnih znanosti (primjerice za određivanje materijala u tragovima, biotehnologiji (citometrija), prehrambenoj industriji i dr.). Pojačanje se odvija na površini metalnih nanostrukture, a molekule se apsorbiraju na površinu koja je podložna pojačanju. Uglavno se koriste metali kao srebro i zlato, no u novije vrijeme koriste se i drugi metali poput bakra, platine i aluminijsa. Važna prednost SERS tehnike leži također i u minimizaciji fluorescencije u neposrednoj blizini metalne površine kod prijenosa energije s molekule na metal. Pošto je točan mehanizam pojačanja još uvijek nepoznanica, razlikujemo dvije teorije koje objašnjavaju dotični fenomen. To su: elektromagnetski mehanizam i mehanizam prijenosa naboja. Prva teorija se oslanja na pretpostavku da adsorbirana molekula osjeća jače polje nego u slučaju da je jako udaljena od površine, dok je u drugoj polarizabilnost α perturbirana interakcijama adsorbata sa površinom.

2.13.5. Transmisijska infracrvena spektroskopija

Transmisijska infracrvena spektroskopija slovi za osnovnu tehniku snimanja u infracrvenoj spektroskopiji. Moguće je snimati krute, tekuće te uzorke u plinovitom stanju. Osnovni princip ove tehnike je snimanje na u području valnih brojeva $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Na frekvencijama na kojima dolazi do apsorpcije zračenja javljaju se apsorpcijski maksimumi,

koji odgovaraju pojedinim enregijama veza. Različite vrpce u spektru odgovaraju različitim vibracijama u molekuli, a mogu biti valentne (simetrične i asimetrične) i deformacijske (promjene kuta kemijske veze). Kruti se uzorci pripremaju prešanjem u KBr pastile – mala količina analizirane tvari se pomiješa sa kalijevim bormidom i preša u pastile.

2.13.6. Difuzna reflektancija

Difuzna reflektancija (engl. *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy* – DRIFT) je tehnika infracrvene spektroskopije koja se koristi na praškastim uzorcima bez prethodne pripreve. DRIFT ćelija reflektira zračenje na praškasti uzorak i prikuplja energiju reflektiranu natrag preko širokog kuta. Difuzno raspršeno svjetlo može biti prikupljeno izravno sa materijala u čašici za uzorak, ili prikupljeno sa materijala koristeći abrazivni jastučić za uzorkovanje. Rezultantni spektar je prikazan u refleksiji, a kako bi se mogau uspoređivati sa apsorpcijskim spektrima mora se upotrijebiti Kubelka–Munk transformacija.

2.13.7. Atenuirana ukupna refleksija

Atenuirana ukupna refleksija (engl. *Attenuated total reflection* – ATR) je spektroskopska tehnika koja omogućuje da se uzorci (praškasti ili tekući) analiziraju izravno bez prethodne pripreve. Mjere se promjene koje se javljaju u potpuno unutrašnje reflektiranoj infracrvenoj zruci kada zraka dođe u kontakt s uzorkom. Infracrvena zraka je usmjerena na optički gusti kristal visokog indeksa loma pod određenim kutem. Ta unutarnja reflektancija stvara kratkotrajan val koji se širi iza površine kristala u uzorak koji je u izravnom kontaktu sa kristalom. Taj val prodire tek nekoliko mikrona iza površine kristala u uzorak stoga je dobar kontakt kristala sa površinom uzorka od izrazitog značaja. U regijama infracrvenog spektra gdje uzorak apsorbira energiju val će biti smanjenog intenziteta ili promijenjen. Smanjena enrgija sa svakog vala vraća se nazad u infracrvenu zraku, koja izlazi na drugom kraju kristala i prosljeđuje se u detektor na infracrvenom spektrometru.

2.13.8. Zrcalna refleksija

Zrcalna refleksija (engl. *Specular reflection*) je nedestruktivna spektroskopska tehnika koja je definirana kao svjetlost, koja je reflektirana sa glatke površine (npr. zrcalo) pod konačnim kutom te se potom snima spektar. Glatka površina označava, da su kutevi loma i upadni kutevi jednaki, pa reflektirana zraka zadržava polarizacijske karakteristike upadne zrake.

2.14. Područja primjene spektroskopije

Spektroskopija je skup metoda, koja se bazira na interakciji elektromagnetskog zračenja s materijom, te je široko primijenjiva u nizu područja ljudskog djelovanja zbog svoje brzine, osjetljivosti i informacija koje pruža snimljeni spektar. Od svojih začetaka mnogo je napredovala pa danas postoji i područje spektroskopije imena mikrospektroskopija koja omogućuje analize uzoraka mikronske veličine. Područja na kojima je spektroskopija, odnosno mikrospektroskopija jedna od temeljnih metoda analize su:

- farmacija – analiza sastava različitih vrsta čvrstih farmaceutskih oblika (provjera vlastitih proizvoda – distribucija i veličina čestica, identifikacija pojedinih komponenata u tabletama, polimorfija, proučavanje konkurentskih komercijalnih proizvoda, potvrđivanje krivotvorenih lijekova)^{63–70}
- forenzika – identifikacija opojnih tvari u tragovima i provjeravanje čistoće istih⁷¹
- arheologija, restauracija, kultura – otkrivanje kemijskog sastava boje na slikama⁶³
- biologija i medicina – proučavanje i analiza tumorom zahvaćenog tkiva,⁷² praćenje djelovanja lijeka na ciljanu skupinu stanica odnosno otpuštanja u organizmu te proučavanje proteina⁶⁶
- autoindustrija – analiza autolakova⁷³
- kemija materijala – proučavanje ugljikovih nanocijevi⁷⁴
- geologija i mineralogija – analiza sastava geoloških oblika (stijene, kristali, minerali)⁷⁵

Upravo na primjeru uporabe mikrospektroskopskih tehnika u farmaceutskoj industriji iskazuje se njena neizostavna vrijednost. Kruti farmaceutski pripravci, bile to tablete, pelete ili prašci osim aktivne tvari (aktivne kemikalije koje se koriste u proizvodnji lijekova) sadrže i različite pomoćne tvari kao što su boje, punila, veziva itd.⁶⁵ Od neizmjerne je važnosti da su te

komponente zajedno homogene, stabilne, određene topljivosti i čistoće budući da ih se unosi u ljudski organizam. Stoga je provjera i kontrola tih svojstava izrazito bitna, a pomoć u provjeri omogućava mikrospektroskopija.

2.15. Mikrospektroskopija

Ramanova i infracrvena mikrospektroskopija imaju važnu ulogu u razvoju novih tehnologija materijala, analizi mikro površina te razumijevanju različitih bioloških procesa. Prednosti korištenja takvih tehnika u analizi, odražavaju se u tome što je potrebna vrlo mala količina uzorka za analizu (dovoljna je i samo jedna čestica), bez, odnosno s vrlo malo pripreve, vrijeme analize je kratko (mjeri se već u milisekundama), a metode su nedestruktivne. Osim toga vibracijska se spektroskopija kao uspješna metoda već dugi niz godina koristi u analitičkoj kemiji farmaceutske industrije većinom za mapiranje krutih uzoraka tableta, peleta (malih kuglica prosječnog promjera oko 1000 μm), farmaceutskih prašaka i suspenzija, određivanje polimorfije i morfologije, te za termička istraživanja.^{67,68,76}

2.15.1. Mapiranje

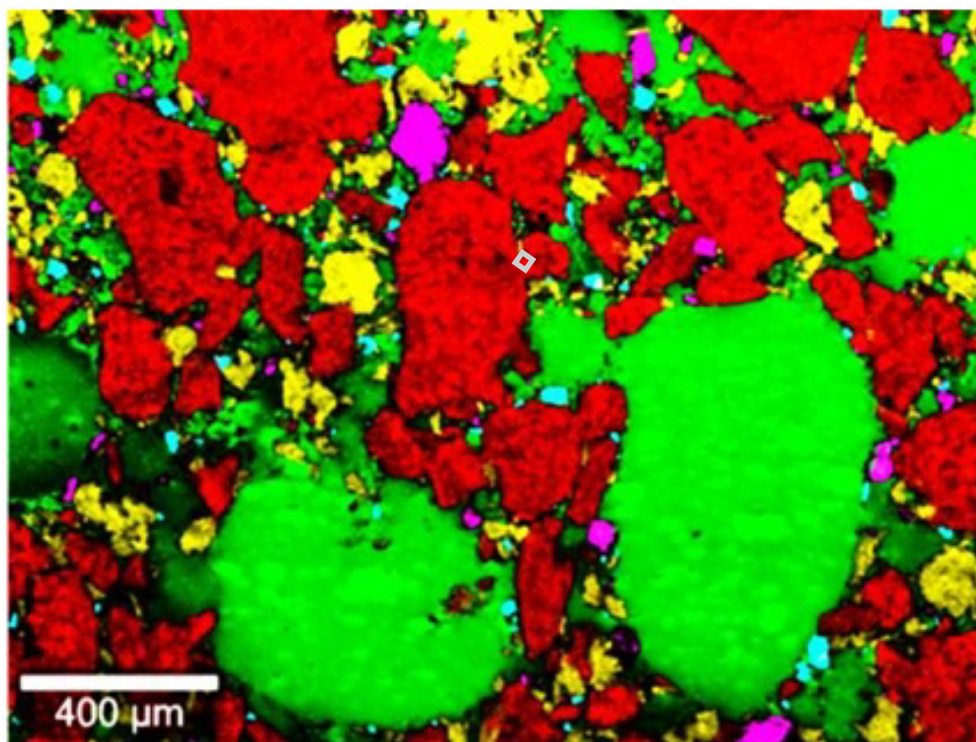
Mapiranje je osnovna funkcija Ramanovog mikroskopa,⁶⁵ a sastoji se od snimanja mnoštva spektara odnosno mreže spektara, gdje svaka točka označava mjesto gdje će biti snimljen Ramanov spektar na površini od interesa. Budući je promjer laserske zrake 1 do 2 μm , a najmanji korak, odnosno pomak mikroskopa najčešće 1 μm , nije teško zaključiti da se ovim postupkom dobiva detaljna kvalitativna, a u određenom pogledu i kvantitativna "slika" analizirane površine.

Pošto svaka komponenta u formulaciji (proces u kojem se različite kemijske tvari, uključujući i aktivnu tvar (lijek) miješaju zajedno kako bi se proizveo konačan farmaceutski (medicinski) proizvod) ima svoj karakterističan spektar, identifikaciju komponenti na analiziranom (mapiranom) području moguće je obaviti iskustvom, knjižnicama spektara ili pak asignacijom vrpci (engl. *peak*). Nakon identifikacije slijedi utvrđivanje raspodjele komponenata.⁷⁷

Raspodjela odnosno homogenost tvari u tableti je izrazito važna zbog pravilnog doziranja lijeka. Nehomogena tableta može sadržavati bitno manje aktivne tvari od propisane doze i

samim time pacijent uzimanjem takve tablete neće postići željeni učinak. Osim toga mnogi farmaceutski pripravci (tablete) se ne uzimaju cijele odjednom, već ih je ovisno o potrebama pacijenta potrebno prepoloviti i uzeti u dvije doze.

Integriranjem površine ispod karakteristične vrpce dobit će se uvid u raspodjelu pojedine komponente u analiziranom uzorku – princip topografske karte.^{78,79} Moguć je i skupni prikaz analiziranih komponenata, kojim se lakše vizualizira/shvaća stanje u analiziranom uzorku. (slika 15 – skupna slika pet vidljivih komponenti iz formulacije na mapiranom području veličine 2000 μm \times 1500 μm , korak 1 μm). U tom konkretnom primjeru prikazan je pokus mapiranja na prerezu tablete komercijalnog uzorka. Iz slike dobivamo informacije o sastavu (identifikacija), raspodjeli i veličini čestica pojedinih komponenata.



Slika 15. Grafički prikaz raspodjele aktivne tvari (zelena boja) u formulaciji (laktoza monohidrat – crvena boja, mikrokristalinična celuloza – žuta boja, škrob – ružičasta boja, magnezijev stearat – svijetloplava boja).

2.15.2. Polimorfija i morfologija

Upotreba odgovarajućeg polimorfnog/amorfnog oblika aktivne tvari nužna je zbog činjenice što različite kristalne forme imaju različitu topljivost i stabilnost.^{80,81,82} Ovi faktori izuzetno su bitni jer je od presudne važnosti postići pravovremeno otpuštanje aktivne tvari u organizmu pacijenta i tako dobiti najbolji učinak u liječenju. Stabilnije kristalne forme u testnim uvjetima povišene vlage i temperature teže prelaze u druge polimorfne oblike te su time shodno i poželjnije za upotrebu.

Osim prethodno navedenih faktora, bitno je i gledište s pravne strane jer proizvođači različitim patentima štite odnosno brane upotrebu određenih polimorfni formi pa upotreba takvih štice formi može dovesti do sudskih tužbi koje u krajnjem slučaju mogu uzrokovati povlačenje lijeka s tržišta što znači veliki financijski gubitak. Jedan od primjera je i tužba kompanije Pfizer protiv TEVE iz godine 2006., zbog kršenja patenta za antibiotik Zithromax, odnosno uporabe patentom zaštićene forme azitromicin seskvihidrata.⁸³

Morfologija, odnosno veličina (iz slike 15 je moguće zaključiti da je veličina čestica aktivne tvari od 100 µm do 300 µm) te oblik čestica jednako je važan čimbenik stabilnosti jer također utječe na topljivost aktivne tvari. Manje čestice imaju veću topljivost zbog veće aktivne površine koja je izložena otapalu.⁸⁴ Oblik čestica bitan je pak s tehnološke strane jer o njemu ovisi način tabletiranja. Na primjer, poznato je da se na čestice koje su štapićastog oblika ne može primijeniti direktno tabletiranje (aktivna tvar i pomoćne tvari homogeniziraju se u mješaču zajedno i potom se na preši za tablete prešaju u propisane doze)⁸⁵ zbog slabih protočnih svojstava prilikom procesa tabletiranja, tako da se u tom slučaju mora pribjeći drugim oblicima tabletiranja kao što su suha ili vlažna granulacija, pretabletiranje i dr.

2.15.3. Analiza na termopostolju

Kontrolirano zagrijavanje/hlađenje (temperaturno područje od -196 °C do 600 °C) praškastih uzoraka i istovremeno snimanje Ramanovih spektara istih, moguće je izvesti analizom na termopostolju.^{86,87} Praćenje prijelaza jednog kristalnog stanja u drugo povišenjem, odnosno sniženjem temperature, taljenjem i u konačnici raspadom uzorka značajno je u razumijevanju termičke stabilnosti,⁸⁸ a mogućnost usporedbe rezultata s termičkim metodama (TGA, DSC) daje dodatnu sigurnost i potvrdu ispravnosti rezultata. Dodatnu korist ove metode uočavamo pri identifikaciji metastabilnih formi koje drugim tehnikama na sobnoj temperaturi nije moguće okarakterizirati. Jedno takvo reprezentativno istraživanje proveli su Szlagiewicz i

suradnici,⁸⁹ karakterizirajući *in situ* promjene polimorfnih formi paracetamola i lufernurona. Paracetamol je dobro opisana molekula poznatih formi (I, II i III) koje su u ovom istraživanju osim klasičnih tehnika dodatno okarakterizirane sa morfološkog stanovišta kombinirajući tehnike analize na termopostolju sa Ramanovom mikroskopijom. Uočena je jasna poveznica između morfologije (optička mikroskopija) i promjene faza (Ramanovi spektri) precizno definiranim termičkim ciklusima. S druge strane polimorfizam molekule lufernurona je po prvi puta detaljno istražen i opisan u ovom radu. Spektroskopski su opisane stabilne i metastabilne forme lufernurona (imenovane od A do G) koristeći jednako kao i u slučaju paracetamola precizno definirane termičke cikluse kombinacijom tehnika analize na termopostolju sa Ramanovom mikroskopijom. Osim farmaceutskih uzoraka česta je primjena ove tehnike i u geološkim istraživanjima za opisivanje svojstava različitih prirodnih minerala.⁹⁰⁻⁹⁷

2.15.4. Dinamička sorpcija vlage

Kontrolirano vlaženje/sušenje uzorka (0 – 90 % RH) izvodi se DVS (*engl. Dynamic vapour sorption*) analizom.^{98,99} Moguće je i simultano snimanje Ramanovih spektara tijekom cijelog procesa ako je na instrument integrirana i Ramanova sonda (najčešće 785 nm).¹⁰⁰ Tom metodom prati se higroskopnost i stabilnost analiziranog praška, kapsula (pelete) ili tableta u ovisnosti o promjeni mase. Analizom snimljenih Ramanovih spektara moguće je uočiti nastajanje odnosno nestajanje hidratnih ili amorfnih formi te prelaska faza. Upravo je razumijevanje higroskopnosti uzorka uz termičku stabilnost drugi temeljni faktor u procesu stvaranja novog lijeka u farmaceutskoj industriji, gdje je uporaba metode dinamičke sorpcije vlage i najraširenija.¹⁰¹⁻¹⁰⁷

Primjerice, istraživanje na *S*-bupivancin hidrokloridu (lokalni anestetik amidnog tipa), koje se bavilo *solid-state* karakterizacijom njegova četiri polimorfa (A°, B, C i D) te jednog monohidrata, osim spektroskopskih (infracrvena i Raman), Rentgen (XRPD) te osnovnih termičkih tehnika (DSC, TGA), koristilo je za karakterizaciju između ostalog i metodu dinamičke sorpcije vlage. Upotreba te metode omogućila je bolje razumijevanje ponašanja (stabilnosti) pojedinih formi u ovisnosti o postotku vlage kojem je uzorak bio izložen. Forme A° i D pokazale su jednako ponašanje te su prelazile u hidratnu formu tek pri 90 % vlazi (vrlo stabilne forme), te u dehidratizirani oblik pri 0 % vlage. Početak ciklusa sa formom C uključivao je prvo prelazak u formu A° te potom u hidrat. Temeljem prije svega upotrebe

metode dinamičke sorpcije vlage, zaključili su da bupivancin hidroklorid pokazuje kompleksno polimorfno ponašanje, te da unatoč tome što se taj spoj primjenju je kao vodena otopina, svojstva okarakterizirana *solid-state* istraživanjem ne smiju biti zanemarena. To se poglavito odnosi na kemijsku stabilnost osnovnog spoja (u praškastom obliku), odnosno *in-bulk* svojstvima (fizikalna svojstva praška u proizvodnji).¹⁰¹



§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprava uzoraka

3.1.1. Polazni spojevi

Natrijev hidroksid, p.a. Sigma-Aldrich

Kalijev hidroksid, p.a., Sigma-Aldrich

Litijev hidroksid, p.a., Sigma-Aldrich

Metilen-klorid, p.a., Merck

Etanol, p.a., Sigma-Aldrich

Etil-acetat, p.a., Sigma-Aldrich

Dietil-eter p.a., Sigma-Aldrich

Bezvodni kalcijev klorid, p.a., Sigma-Aldrich

Bezvodni magnezijev klorid, p.a., Sigma-Aldrich

Kao osnovni polazni spoj za pripravu soli korišten je omeprazol (Shouguang Fukang Pharmaceutical). Za pripravu kalcijeve soli omeprazola (OMP-Ca) i magnezijeve soli omeprazola (OMP-Mg), kao polazni spoj korištena je prethodno sintetizirana natrijeva sol omeprazola (OMP-Na). U svrhu dodatnih istraživanja korišten je i benzimidazol (Sigma-Aldrich) 98%.

Sve navedene tvari korištene su bez dodatnog pročišćavanja osim OMP-Na koji je dodatno pročišćen ispiranjem etil-acetatom na Büchnerovom lijevku po kristalizaciji.

3.1.2. Priprava soli omeprazola

Soli omeprazola sintetizirane su koristeći postupke priprave iz više literaturnih izvora (uglavnom patentnih prijava).^{61,108,109,110} Soli su sintetizirane sljedećim redoslijedom: OMP-Na, OMP-K i OMP-Li, a kao polazni spoj korišten je omeprazol. Potom su sintetizirane još i OMP-Ca te OMP-Mg za čiju sintezu je korištena ranije sintetizirana natrijeva sol omeprazola.

Sinteza alkalijskih soli omeprazola (Na, K i Li) tekla je sličnim postupkom. Natrijeva sol omeprazola sintetizirana je reakcijom omeprazola (10 g) koji je dodan u vodenu otopinu

natrijevog hidroksida (1,16 g u 25 mL) u tikvicu okruglog dna. Nakon snažnog petominutnog miješanja na magnetnoj miješalici dodan je metilen-klorid (50 mL) te je miješanje nastavljeno sljedećih 15 minuta. Po završetku miješanja, faze su razdvojene u lijevku za odjeljivanje, a vodeni dio je još jednom ispran s dodatnom količinom metilen-klorida (50 mL) te filtriran i uparen do suhe tvari u tikvici okruglog dna na rotavaporu uz smanjen tlak i temperaturu vodene kupelji od 35 °C. U tikvicu je potom dodano 70 mL etil-acetata te je smjesa miješana u vodenoj kupelji na magnetskoj miješalici pod refluksom (77 °C) daljnjih 30 minuta. Poslije hlađenja smjesa je stajala preko noći pri sobnoj temperaturi te je potom profiltrirana i isprana s dodatnih 20 mL etil-acetata. Kristalna tvar bijele boje koja je ostala na filter-papiru sušena je u sušioniku na 40 °C pod vakuumom 24 sata. Masa takvog produkta iznosila je 9,07 g, što odgovara iskorištenju od 85 %. Potom je snimljen difraktogram praha i uspoređen s literaturnim podacima te je potvrđen nastanak natrijeve soli omeprazola.

Kalijeva sol omeprazola sintetizirana je reakcijom omeprazola (10 g) koji je dodan u vodenu otopinu KOH (1,69 g u 60 mL) u tikvicu okruglog dna. Nakon snažnog petominutnog miješanja na magnetnoj miješalici dodan je metilen-klorid (50 mL) te je miješanje nastavljeno sljedećih 15 minuta. Po završetku miješanja, faze su razdvojene u lijevku za odjeljivanje, a vodeni dio je još jednom ispran s dodatnom količinom metilen-klorida (50 mL) te filtriran i uparen do suhe tvari u tikvici okruglog dna uz smanjen tlak i temperaturu vodene kupelji od 35 °C. U tikvicu je potom dodano 70 mL etil-acetata te je smjesa miješana u vodenoj kupelji na magnetskoj miješalici s povratnim hladilom (77 °C) daljnjih 30 minuta. Poslije hlađenja smjesa je stajala preko noći pri sobnoj temperaturi te je potom profiltrirana i isprana sa dodatnih 20 mL etil-acetata. Kristalna tvar bijele boje koja je ostala na filter-papiru sušena je u sušioniku na 40 °C pod vakuumom 24 sata. Masa takvog produkta iznosila je 9,13 g, što odgovara iskorištenju od 87 %. Potom je snimljen NMR spektar te je potvrđen nastanak soli. Od literaturnih podataka prethodno je poznata jedino talište.

Litijeva sol omeprazola sintetizirana je reakcijom omeprazola (3 g) koji je dodan u vodenu otopinu LiOH (0,207 g u 40 mL) u tikvicu okruglog dna. Nakon snažnog petominutnog miješanja na magnetnoj miješalici dodan je metilen-klorid (25 mL) te je miješanje nastavljeno sljedećih 15 minuta. Po završetku miješanja, faze su razdvojene u lijevku za odjeljivanje, a vodeni dio je još jednom ispran s dodatnom količinom metilen-klorida (25 mL) te filtriran i uparen do suhe tvari u tikvici okruglog dna na rotavaporu uz smanjen tlak i temperaturu vodene kupelji od 35 °C. U tikvicu je potom dodano 40 mL etil-acetata te je smjesa miješana

u vodenoj kupelji na magnetskoj miješalici pod refluksom (77 °C) daljnjih 30 minuta. Poslije hlađenja smjesa je stajala preko noći pri sobnoj temperaturi te je potom profiltrirana i isprana s dodatnih 20 mL etil-acetata. Kristalna tvar bijele boje koja je ostala na filter-papiru sušena je u sušioniku na 40 °C pod vakuumom 24 sata. Masa takvog produkta iznosila je 2,29 g, što odgovara iskorištenju od 74 %. Potom je snimljen NMR spektar i uspoređen s literaturnim podacima te je potvrđen nastanak litijeve soli omeprazola.

Zemnoalkalijske soli omeprazola (Mg i Ca) pripravljene su koristeći kao polazni spoj natrijevu sol omeprazola sintetiziranu ranije opisanim postupkom (stranice 39 i 40). Bezvodni kalcijev klorid (1,16 g) otopljen je u destiliranoj vodi (20 mL) i potom dodan uz dokapavanje u vodenu otopinu natrijeve soli omeprazola (3 g u 20 mL) u tikvicu s okruglim dnom, i snažno miješanje na magnetnoj miješalici. Miješanje je nastavljeno daljnjih 60 minuta pri sobnoj temperaturi te je potom talog profiltriran i ispran s dodatnom količinom destilirane vode. Kristalna tvar bijele boje koja je ostala na filter-papiru sušena je u sušioniku na 40 °C pod vakuumom 24 sata. Masa takvog produkta iznosila je 2,16 g, što odgovara iskorištenju od 68 %. Potom je snimljen difraktogram praha i uspoređen s literaturnim podacima te je potvrđen nastanak soli kalcijev omeprazolat dihidrat.^{61,110}

Magnezijeva sol omeprazola je sintetizirana tako što je bezvodni magnezijev klorid heksahidrat (2,12 g) otopljen u destiliranoj vodi (20 mL) i potom dodan uz dokapavanje u vodenu otopinu natrijeve soli omeprazola (3 g u 20 mL) u tikvicu s okruglim dnom, i snažno miješanje na magnetnoj miješalici. Miješanje je nastavljeno daljnjih 60 minuta pri sobnoj temperaturi te je potom talog profiltriran i ispran sa dodatnom količinom destilirane vode. Kristalna tvar bijele boje koja je ostala na filter papiru sušena je u sušioniku na 40 °C pod vakuumom 24 sata. Potom je snimljen difraktogram praha i uspoređen s literaturnim podacima te je potvrđen nastanak soli magnezijev omeprazolat dihidrat. Masa takvog produkta iznosila je 2,27 g, što odgovara iskorištenju od 74 %.^{109,110}

3.2. Nuklearna magnetska rezonancija

NMR spektri čvrstih uzoraka snimljeni su pomoću spektrometra NMR System 600 MHz, proizvođača Agilent technologies, s upotrebom sonde "NM Double resonance HX MAS" (širina rotora 3,2 mm). Larmorove frekvencije ugljika i protona bile su 150,78 MHz i 599,57 MHz. Kemijski pomaci protona i ugljika određeni su prema sekundarnim referentnim signalima vanjskog standarda admantana, za proton $\delta = 1,85$ ppm, a za ugljik $\delta = 38,3$ ppm. Frekvencija vrtnje uzoraka u mjerenjima ^1H NMR spektara bila je 20 kHz, dok je pri mjerenjima ^{13}C NMR spektara iznosila 16 kHz.

Protonski spektri su bili snimani pomoću pulsnoeg slijeda, uz dužinu odgode 5 s među pojedinim eksperimentima u 16 ponavljanja.

Ugljikovi spektri su bili snimani uporabom standardnog pulsnoeg slijeda CP-MAS s raspredanjem protona tijekom prikupljanja podataka, uz dužinu odgode 5 s među pojedinim eksperimentima, od 350 do 760 ponavljanja.

NMR spektri tekućih uzoraka snimljeni su na spektrometru DD2 300 MHz NMR, proizvođača Agilent technologies, upotrebom sonde promjera 5 mm opremljene s gradijentima. Spektri su snimani pri temperaturi 25 °C. Kemijski pomaci protona su određeni u odnosu na tetrametilsilan, TMS.

Spektralno područje od 5,0 kHz, uz dužinu odgode od 10 s među pojedinim eksperimentima i 64 ponavljanja.

3.3. Difrakcija rentgenskog zračenja na praškastim uzorcima

Mjerenja difrakcijskih intenziteta istraživanih uzoraka izvedena su na rentgenskom difraktometru za praškaste (ili polikristalne) uzorke PHILIPS X'Pert PRO, Panalytical opremljenom s detektorom X'celerator. Kao izvor zračenja korištena je rentgenska cijev s bakrenom anodom $K_{\alpha} = 1,54$ Å. Uređajem se upravljalo programskim paketom Data Collector 4.0a. Obrada prikupljenih podataka izvedena je programskim paketom Highscore plus 3.0e.

Snimanja svih uzoraka provedena su u području 2θ od 3° do 32,5°, vrijeme integracije iznosilo je 100 s, a korak je bio 0,033°.

Difraktogrami su uspoređivani s literaturnim podacima koristeći programski paket za digitalizaciju pod imenom WINDIG 2.5.

3.4. Vibracijska spektroskopija

Spektroskopska mjerenja istraživanih uzoraka izvedena su pomoću nekoliko spektroskopskih tehnika. Uporabljene su Ramanova spektroskopija, Ramanova mikrospektroskopija, infracrvena spektroskopija te infracrvena mikrospektroskopija. Ramanova tehnika je korištena kao dodatna metoda u praćenju termičkih istraživanja i DVS analizi.

3.4.1. Ramanova spektroskopija

Ramanovi spektri omeprazola i pripadajućih soli snimljeni su pomoću Ramanovog spektrometra (Ram II modul) Vertex 80, proizvođača BRUKER, opremljenog laserom koji emitira zračenje pri 1064 nm te Ln-Ge diodnim detektorom. Spektri su snimani pri snazi lasera 300 mW, u spektralnom području $3600\text{--}32\text{ cm}^{-1}$ uz razlučivanje od 4 cm^{-1} . Spektar je rezultat uprosječivanja 128 snimaka i primjene Blackman-Harris apodizacijske funkcije. Uređaj za rad koristi programski paket OPUS 6.5 koji je korišten i za obradu snimljenih Ramanovih spektara analiziranih praškastih uzoraka omeprazola i njegovih soli.

3.4.2. Ramanova mikroskopija

Brzo testiranje i temperaturno ovisna (engl. *hot-stage*) analiza provedeni su na Ramanovom mikroskopu Senterra, proizvođača BRUKER, opremljenog internim laserima valnih duljina 785 nm i 532 nm te CCD detektorom. Za snimanje pojedinačnih Ramanovih spektara na Ramanovom mikroskopu korišten je laser pri 785 nm, snage 100 mW, objektiv dugog dometa povećanja $20\times$ te širinu pukotine $50\times 1000\text{ }\mu\text{m}$. Spektri su snimani u području $1800\text{--}440\text{ cm}^{-1}$, uz razlučivanje $3\text{--}5\text{ cm}^{-1}$, pri čemu je vrijeme integracije bilo 10 s, s 2 uprosječivanja (koadicije). Uređaj za rad koristi paket OPUS 6.5 koji je korišten i za obradu snimljenih Ramanovih spektara analiziranih praškastih uzoraka omeprazola i njegovih soli.

Mapiranja uzoraka prereza pelete i binarnih smjesa OMP/OMP-Na obavljena su koristeći Ramanov mikroskop Alpha500, proizvođača WITec, opremljen s vanjskim laserima valnih duljina 785 nm i 532 nm te CCD detektorom. Pri mapiranju uzoraka spektri su snimani s

objektivom dugog dometa povećanja 20×, nakon pobude laserom pri 785 nm, snage 86 mW, u području 1800–60 cm⁻¹ i razlučivanje 3–5 cm⁻¹. Vrijeme integracije je bilo 0,11 s, s 1 uprosječivanjem (koadicijom). Veličine mapiranih područja za pokuse opisane u poglavlju 4.6., iznosile su redom 800×800 μm uz korak od 2 μm za prerez pelete, a 250×250 μm i 500×250 μm uz korak od 5 odnosno 10 μm za analizu binarnih smjesa. Uređaj za rad koristi paket WITec Control 1.58, a za obradu pojedinačnih Ramanovih spektara odnosno kemijskih slika koristi se programski paket WITec Project 2.10.

3.4.3. *Fourier transformiran infracrvena spektroskopija*

Mjerenja infracrvenih spektara uzoraka omeprazola i pripadajućih soli, pripremljenih u obliku KBr pastila, izvedena su pomoću infracrvenog spektrometra, Vertex 70, proizvođača BRUKER, opremljenim s DLaTGS detektorom. Snimljeni spektri rezultat su uprosječivanja 32 snimke u spektralnom području 7000–400 cm⁻¹ uz razlučivanje od 4 cm⁻¹. Uređaj za rad koristi programski paket OPUS 6.5.

3.4.4. *Fourier transformirana infracrvena mikroskopija*

Brza testiranja paralelno s Ramanovom mikroskopijom vršena su pomoću komplementarne tehnike infracrvene mikroskopije, koristeći infracrveni mikroskop Hyperion 3000, proizvođača BRUKER, koji je povezan s infracrvenim spektrometrom Vertex 70. Mikroskop je opremljen s živa kadmij telurid (MCT) detektorom i serijskim detektorima u žarišnoj ravnini (FPA). Za brzo snimanje pojedinačnih spektara na infracrvenom mikroskopu korišten je ATR objektiv s povećanjem od 20× te MCT detektor. Svaki spektar, i pozadine i uzorka, prosjek je 100 snimaka u području 7000–400 cm⁻¹ i razlučivanje 3–5 cm⁻¹. Uređaj za rad koristi programski paket OPUS 6.5.

3.5. Termička istraživanja

3.5.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Pokusi diferencijalne pretražne kalorimetrije vršeni su diferencijalno-pretražnim kalorimetrom MettlerToledo DSC1, u struji dušika (protok 40 mL min⁻¹). Uzorci su analizirani u aluminijskim posudicama s probušenim poklopcem (također od aluminija) zapremnine 40 μL. Uzorci omeperazola i njegovih soli zagrijavani su u temperaturnom rasponu od 20 °C do 200 °C, uz brzinu zagrijavanja od 10 °C min⁻¹. Za prikupljanje podataka i njihovu obradu rabljen je programski paket Stare Software 11.00.

3.5.2. Termogravimetrijska analiza

Pokusi termogravimetrijske analize izvedeni su instrumentom MettlerToledo TGA/DSC1. Uzorci su analizirani u aluminijskim posudicama s probušenim poklopcem (također od aluminija) zapremnine 100 μL. Uzorci omeprazola i njegovih soli zagrijavani su u temperaturnom rasponu od sobne temperature do 180 °C, uz brzinu zagrijavanja od 10 °C min⁻¹. Za prikupljanje podataka i njihovu obradu rabljen je programski paket Stare Software 11.00.

3.5.3. Temperaturno ovisna analiza

Za praćenje promjena u uzorku tijekom zagrijavanja korištena je kombinacija tehnika temperaturno ovisne analize i Ramanove mikroskopije; grijano postolje bilo je montirano na Ramanov mikroskop Senterra. Osmišljeni su eksperimenti u kojima su osnovni uvjeti snimanja na sistemu Linkam FTIR600, koji obuhvaća grijano postolje (temperaturni raspon od -196 °C do 600 °C), pumpu za hlađenje tekućim dušikom (LNP – *engl. Liquid nitrogen pump*) do maksimalne temperature od -196 °C i uređaj za kontrolu temperature TP94 (određivanje brzine, koraka i konačne temperature) proizvođača Linksys, bili zagrijavanje uzorka od 25 °C do 200 °C, brzinom od 10 °C min⁻¹, bez vremena potrebnog za uravnoteženje na određenoj temperaturi prije snimanja spektra. Ramanovi spektri snimani su pri sljedećim uvjetima: laser pri 785 nm, snaga lasera 100 mW, područje 1800–440 cm⁻¹, razlučivanje 3–5 cm⁻¹, objektiv kratkog dometa povećanja 20× te širina pukotine

50×1000 μm. Vrijeme integracije je bilo 2 s, sa jednim uprosječivanjem (koadicijom). Za prikupljanje podataka i kasniju obradu korišten je programski paket OPUS 6.5, odnosno njegov podprogram Protein dynamics.

3.5.4. Mjerenja dinamične sorpcije vlage

Mjerenja sorpcije vlage istraživanih uzoraka izvedena su na instrumentu Projekt Messtechnik SPS 1μ, opremljenim sa mikro vagom tvrtke MettlerToledo, a za *online* praćenje mogućih promjena praškastih uzoraka korištena je sonda PhAT Probe KaiserOptics, montirana na sistem Kaiser PhAT Raman Spectrometer RXN1. Spektri su snimani nakon pobude laserom pri 785 nm, snage 260 mW, u spektralnom području 1850–150 cm⁻¹, uz razlučivanje od 4 cm⁻¹. Vrijeme integracije je bilo 10 s, sa 2 uprosječivanja (koadicije). Jedan ciklus vaganja trajao je 15 minuta nakon čega je slijedila faza uravnoteživanja ovisno o postotku vlage. Uzorak se uravnoteživao na određenom stupnju vlažnosti sve dok promjena mase nije bila veća od 0,002 % u 30 min. Ciklusi su osmišljeni na način da su prvo uzorci pod kontroliranim uvjetima osušeni s 40 % do 0 % vlage, potom su opterećeni vlagom u pravilnim vremenskim periodima i uravnoteženjem od 10 % do 90 %, te su potom opet posušeni pod istim uvjetima na 0 % vlage. Za prikupljanje spektroskopskih podataka i kasniju obradu korišten je programski paket MatLab, odnosno njegovi podprogrami Hologram v4.1 i HoloPro v3.1 za snimanje te HoloReact v7.1. za obradu prikupljenih podataka. Za rad i obradu podataka gravimetrijskih mjerenja uporabljen je programski paket SPS 3.0.18 te Microsoft Excell 2007, koji radi u sustavu Windows XP.

3.6. Teoretski račun VASP

Izračun vibracijskog spektra omeprazola temeljen je na teoriji gustoće funkcionala i implementiran u *Vienna ab initio simulation package* –VASP.^{111,112} VASP izvodi iterativno rješenje Kohn-Shamovih jednadžbi u bazi ravninskih valova pri čemu je interakcija valentnih elektrona sa ionskim jezgrama opisana sa formalizmom *projector-augmented wave* (PAW).¹¹³ *Cut-off* vrijednost energije namještena je na 500 eV. Elektronska razmjena i korelacija su opisane gradijentom – ispravljenih PBE funkcionala, koje su predložili Perdew i suradnici.¹¹⁴ Ciklus samodosljednosti je završen kada su se ukupne energije u sljedećem

koraku promijenile za manje od 10^{-6} eV po ćeliji. Integracije Brillouinovih zona su izvedene na Monkhorst-Packovim mrežama.¹¹⁵

Parametri jedinične ćelije omeprazola korišteni su iz *Crystallography Open Database* (COD id 7101903).¹¹⁶ Odgovarajuća triklinska kristalna ćelija ($P\bar{1}$), ($a=9,701$ Å; $b=10,259$ Å; $c=10,694$ Å; $\alpha=91,720^\circ$ $\beta=112,117^\circ$ $\gamma=115,642^\circ$) sadrži dvije molekularne jedinice. Početnim pozicijama atoma minimizirana je energija uporabom algoritma konjugiranog gradijenta, te su potom minimizirani ostaci izravnom inverzijom u iterativni podprostor (RMM-DIIS),¹¹⁷ dok nije postignut kriterij zaustavljanja za sile, $F_{\max} < 10^{-5}$ eV/Å.

Vibracijska gustoća stanja (vDOS) dobivena je kao distribucija vlastitih vrijednosti dinamičke matrice formirane iz matrice konstante sile uzimajući u obzir periodičke granične uvjete. Elementi matrice konstantne sile, određeni su kao prve derivacije sila induciranih malim ionskim pomacima, izračunati prema Hellmann-Feynmanovom teoremu pomoću metode konačnih razlika.¹¹⁸

Opisivanje vibracijskoga spektra bilo je olakšano projeciranjem ukupnog vDOSa, $g(\omega)$, u parcijalni dvoatomski vDOS, $g_{bond}(\omega)$ – koji je povezan sa isteznom vibracijom dane kemijske veze u molekuli, tako što se odredila prikladna relativna težina, $w_{bond}(\omega)$, odgovarajućeg atomskog para preko cijele molekule za opisani frekvencijski način, $g_{bond}(\omega) = w_{bond}(\omega) g(\omega)$. Dinamička matrica vlastitih vektora sadrži informacije o pojedinim atomskim premještanjima u zadanom vibracijskom načinu, pa računamo $g_{bond}(\omega)$ dijeljenjem sume kvadrata premještanja uzduž jediničnog smjera veze $\vec{e}_{12} = (\vec{r}_{a1} - \vec{r}_{a2}) / |\vec{r}_{a1} - \vec{r}_{a2}|$, između atoma $a1$ i $a2$ kvadratom vlastitog vektora,

$$w_{bond}(\omega) = \frac{|\vec{e}_{12} \cdot \vec{d}_{a1}(\omega)|^2 + |\vec{e}_{12} \cdot \vec{d}_{a2}(\omega)|^2}{\sum_a |\vec{d}_a(\omega)|^2}.$$

Tablica 3. Tehnike i metode opisane za pripravu omeprazola i soli omeprazola.

SPOJ	POSTUPAK PRIPRAVE PATENT	KARAKTERIZACIJA	ISTRAŽIVANI SPOJ
Omeprazol (forme A, B, C)	US 7,553,856 B2 Omeprazole, Al Badr	- XRPD - Kristalna struktura - FTIR - UV - NMR - DSC	Komercijalno dostupan
Natrijeva sol omeprazola (forma A)	US 6,207,188 US 2004/0224987 A1 US 2009/0221646 A1 US 2006/0160783 A1 0 124 495 B1	- XRPD - FTIR - DSC - TGA - NMR - Talište	Pripravljen po patentu 0 124 495 B1
Kalijeve sol omeprazola	0 124 495 B1	- Talište	Pripravljen po patentu 0 124 495 B1
Litijeva sol omeprazola	0 124 495 B1	- NMR - Talište ◇	Pripravljen po patentu 0 124 495 B1
Magnezijeva sol omeprazola	WO 01/87831 A2 0 124 495 B1	- XRPD - FTIR - Talište	Pripravljen po patentu 0 124 495 B1
Kalcijeva sol omeprazola	US 2006/0160783 A1 0 124 495 B1	- XRPD - TGA - DSC - NMR - Talište	Pripravljen po patentu 0 124 495 B1

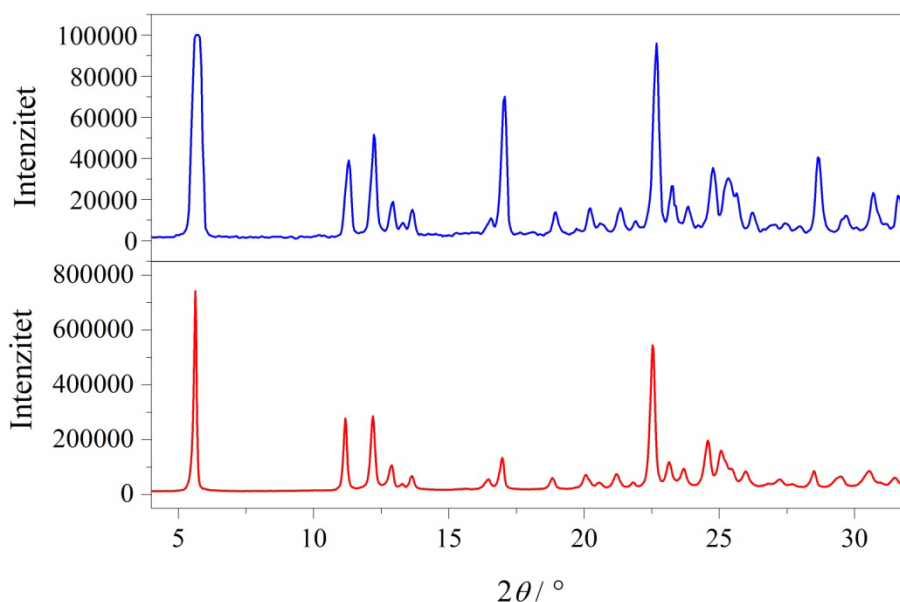
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava soli omeprazola

U ovom poglavlju opisane su metode vibracijske i NMR spektroskopije, metoda difrakcije rentgenskog zračenja na polikristalnim uzorcima te termičke metode koje su zajedno poslužile za identifikaciju i karakterizaciju pripremljenih spojeva te za asignaciju karakterističnih vrpci omeprazola i njegovih soli.

4.1.1. Difrakcija rentgenskog zračenja na praškastim uzorcima

Sve pripravljene soli prvo smo analizirali metodom XRPD jer su literaturni podaci (patenti) za potvrdu pojedinačnih soli bili najpotpuniji. Na taj način smo snimanjem difraktograma uzoraka i usporedbom sa digitaliziranim (program WINDIG 2.5) difraktogramima iz patenata US 7,553,856 B2, US 6,207,188 B1, WO 01/87831 A2 i US 2006/0160783 A1 potvrdili podudaranje sa omeprazolom (OMP – slika 21) te nastanak OMP-Na, OMP-Mg i OMP-Ca.^{1,47,108,109}



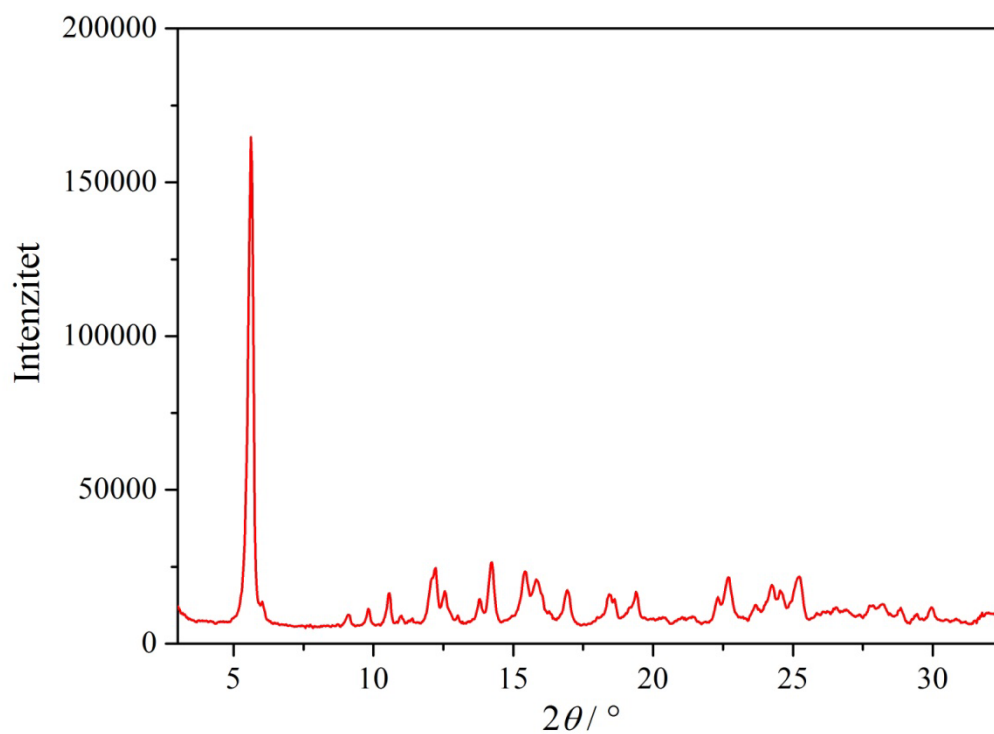
Slika 16. Usporedba difraktograma pripravljene OMP-Na (crvena boja) i digitaliziranog difraktograma iz patenta US 6,207,188 B1 (plava boja).

Na slici 16 prikazana je usporedba pripravljene OMP-Na i digitaliziranog difraktograma OMP-Na (forma A) iz patenta US 7,553,856 B2¹⁰⁸ (svi signali se podudaraju). Difraktogram uzorka pripravljene soli se u potpunosti slaže s digitaliziranim difraktogramom OMP-Na. Širina signala je različita zbog slabe kvalitete digitaliziranog difraktograma OMP-Na. Manje razlike su vidljive samo u intenzitetima pojedinačnih karakterističnih signala. Te razlike mogu proizlaziti iz preferirane orijentacije kristala i/ili zrnatosti uzorka.

Na jednak način uspoređivane su i OMP-Ca (slika 17) te OMP-Mg (slika 18). Pri analizi OMP-Ca opažen je i dodatan niskointenzitetni signal na položaju 2θ 29,4° koji je pripisan nečistoćama u finalnom uzorku soli. S obzirom, da u literaturnim podacima ne postoje difraktogrami OMP-Li (slika 19) i OMP-K (slika 20), njihova XRPD analiza u ovom radu predstavlja prvi literaturni opis i osnova je za daljnja istraživanja.

Popis deset najintenzivnijih signala pripremljenih soli prikazan je redom za OMP-Ca (tablica 4), OMP-Mg (tablica 5), OMP-Li (tablica 6) te OMP-K (tablica 7).



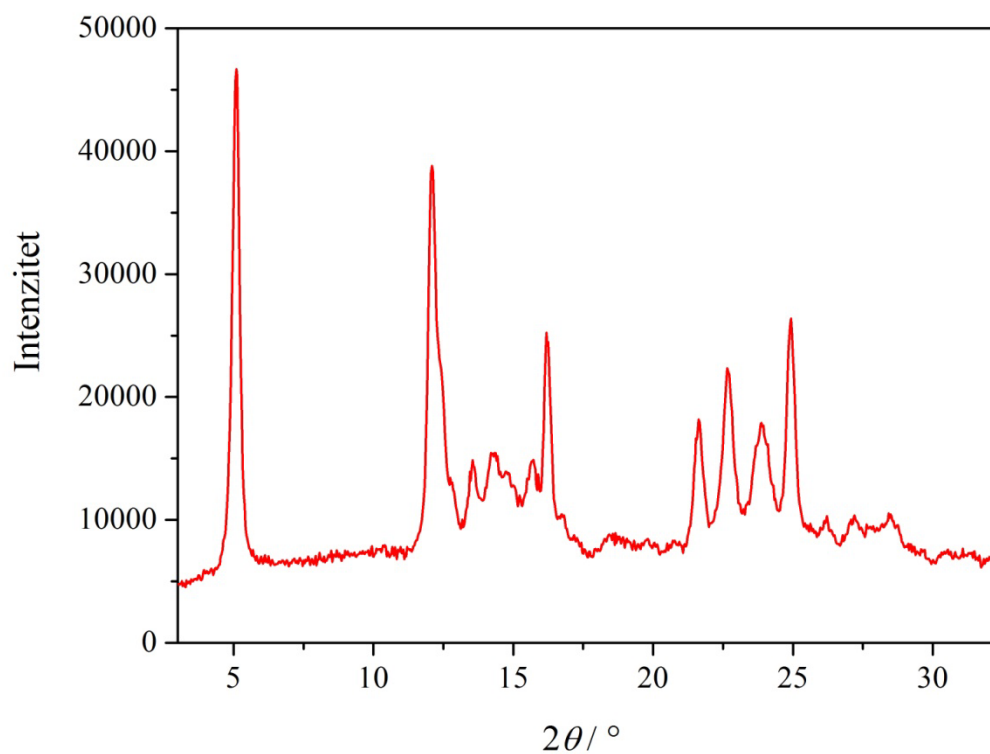


Slika 17. Difraktogram pripravljene soli OMP-Ca.



Tablica 4. Deset najintenzivnijih signala iz difraktograma pripravljene soli OMP-Ca.

$2\theta / ^\circ$	Intenzitet
5,6	100,0
14,2	13,2
12,2	12,0
15,4	11,2
22,7	9,7
15,8	9,4
25,3	9,4
24,3	8,0
12,6	7,2
10,6	7,0

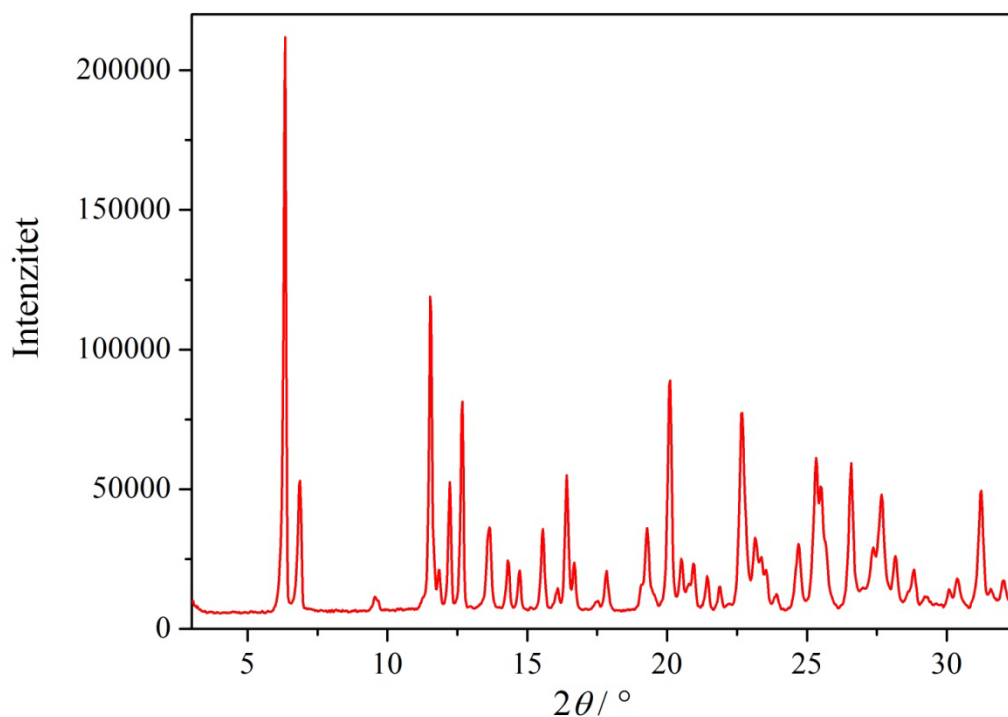


Slika 18. Difraktogram pripravljene soli OMP-Mg.



Tablica 5. Deset najintenzivnijih signala iz difraktograma pripravljene soli OMP-Mg.

$2\theta / ^\circ$	Intenzitet
5,1	100,0
12,2	38,1
16,3	21,3
25,0	17,2
12,5	16,0
22,8	13,9
21,7	10,0
14,4	8,2
24,1	7,6
13,6	7,2

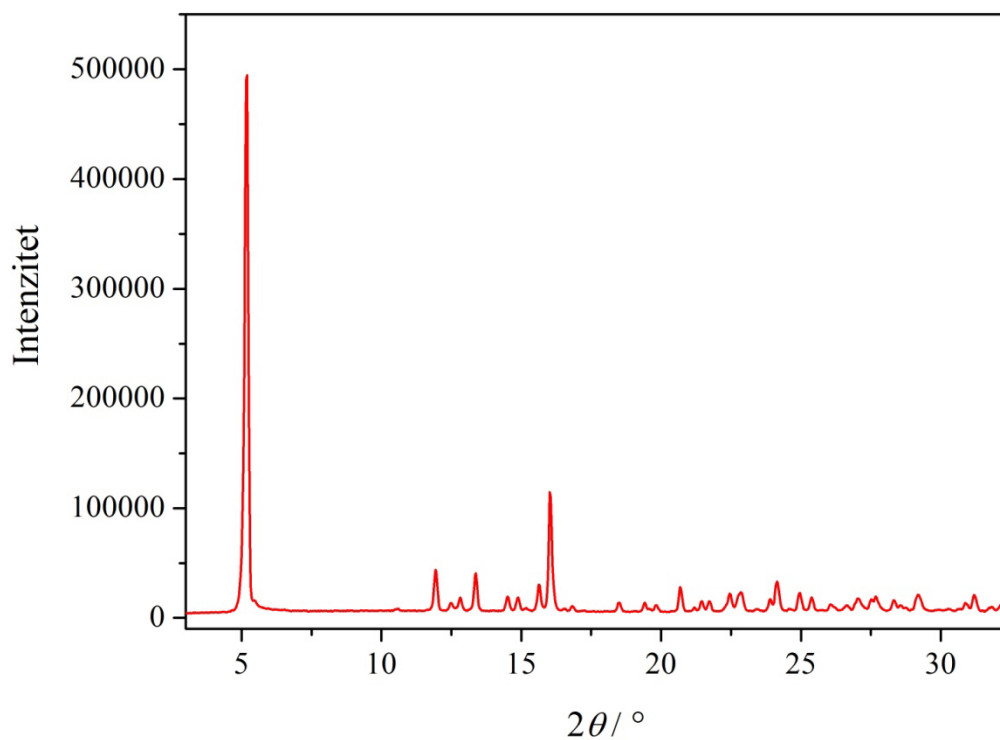


Slika 19. Difraktogram pripravljene soli OMP-Li.



Tablica 6. Deset najintenzivnijih signala iz difraktograma pripravljene soli OMP-Li.

2θ / °	Intenzitet
6,3	100,0
11,5	54,0
20,1	39,5
12,7	36,2
22,7	33,8
25,3	25,3
26,6	24,9
16,4	22,9
6,9	22,4
12,2	21,9

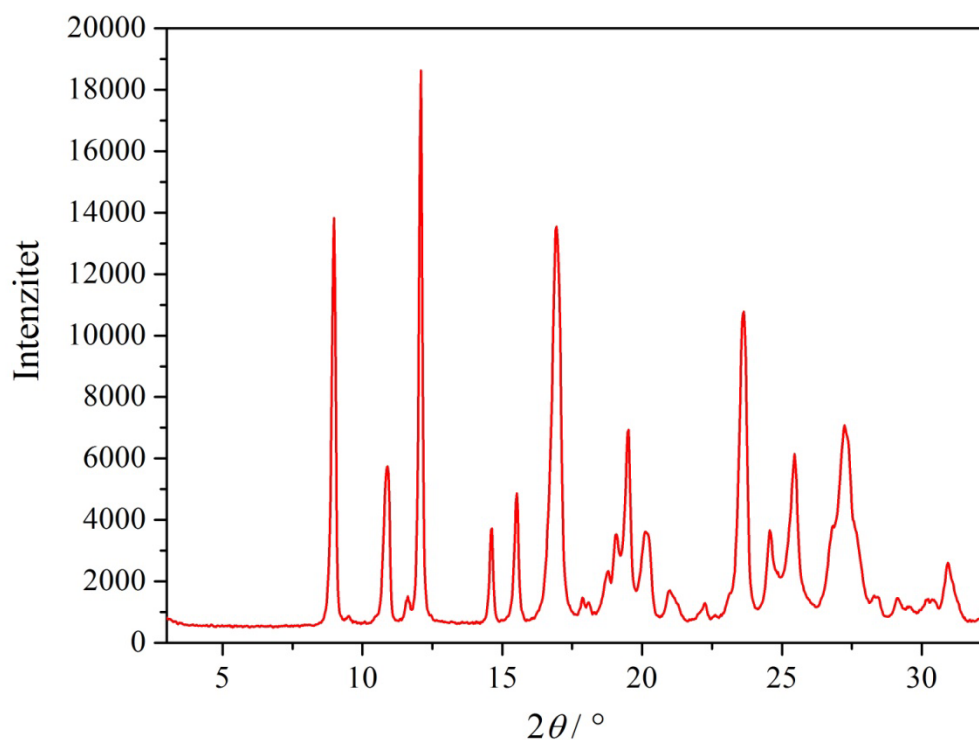


Slika 20. Difraktogram pripravljene soli OMP-K.



Tablica 7. Deset najintenzivnijih signala iz difraktograma pripravljene soli OMP-K.

$2\theta / ^\circ$	Intenzitet
5,2	100,0
16,0	22,4
11,9	7,6
13,4	7,0
24,1	5,5
15,6	5,0
20,7	4,5
22,9	3,4
25,0	3,4
22,5	3,2

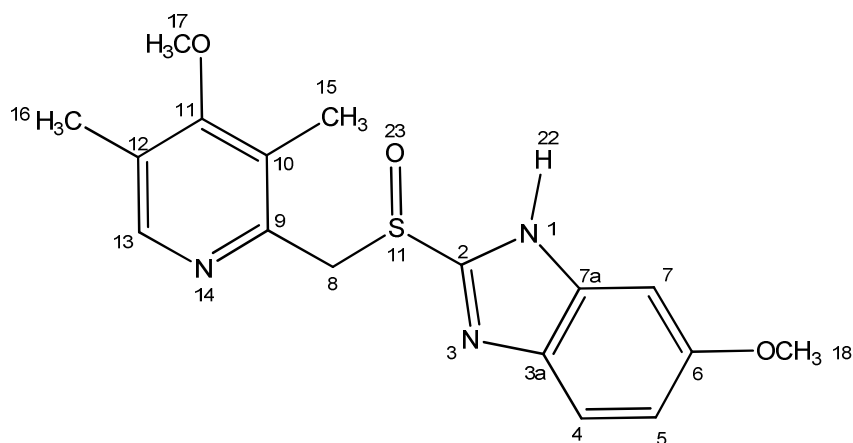


Slika 21. Difraktogram polaznog spoja omeprazola.

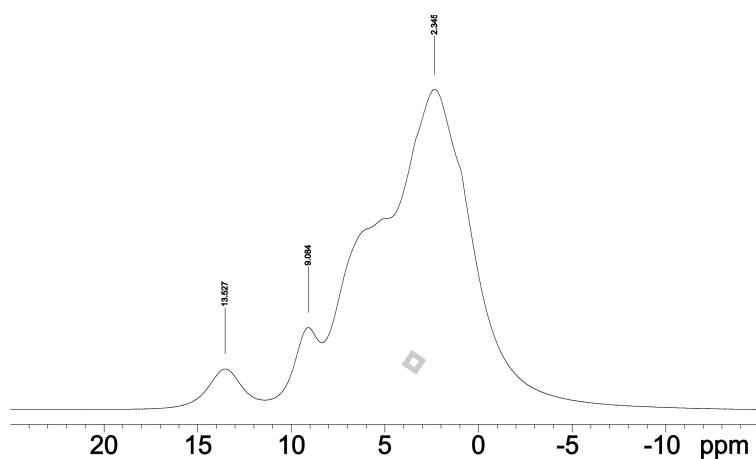
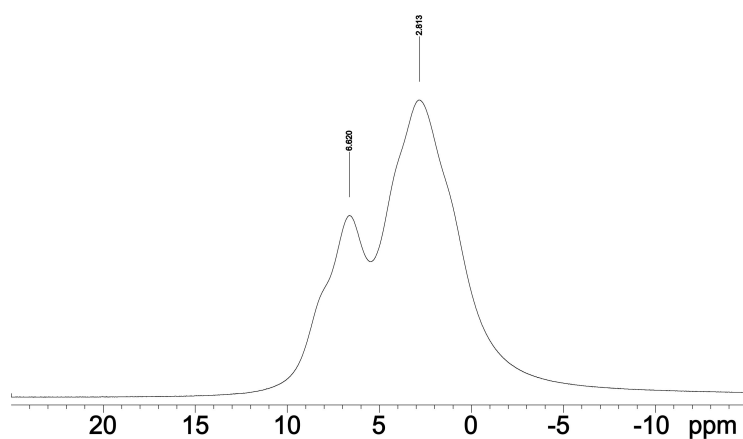


4.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija

Jednako kao i u slučaju analize XRPD metodom snimljeni su NMR spektri OMP i pripremljenih soli. Prvo su snimani ^1H MAS i ^{13}C CP-MAS NMR spektri čvrstih uzoraka. Usporedbom protonskih ^1H MAS NMR spektara čvrstih uzoraka OMP i svih ostalih pripremljenih soli opaženo je da uzorak omeprazola sadrži signal na δ 13,5 ppm, koji pripada protonu u vodikovoj vezi (slika 23). To se odnosi na proton na dušiku N1 (slika 22). U uzorku OMP-Na (slika 24), kao i u svim ostalim uzorcima pripremljenih soli nisu opaženi signali koji bi ukazivali na prisutnost protona u vodikovim vezama (izostanak signala na δ 13,5 ppm). To govori, da je kod tih uzoraka došlo do odvajanja protona na dušiku N1.



Slika 22. Prikaz strukture 6-metoksi-omeprazola.

Slika 23. Prikaz ^1H MAS spektra OMP.Slika 24. Prikaz ^1H MAS spektra OMP-Na.

Usporedbom protonskih ^{13}C CP-MAS NMR spektara čvrstih uzoraka OMP i svih ostalih pripremljenih soli opaženo je da uzorak omeprazola (OMP) sadrži signal na δ 92,0 ppm, koji

pripada ugljikovom atomu C7 (slika 25). Spektar uzorka OMP assigniran je pomoću literaturnih podataka (tablica 8).³⁷ Snimljeni ¹³C CP-MAS NMR spektar OMP uspoređen je i s radom u kojem je praćena zadnja faza sinteze omeprazola *in-line* spektroskopskim tehnikama, te je uočena skladnost rezultata.¹¹⁹ Spektar na slici 25 odgovara tautomernom obliku 6-metoksi-omeprazola.

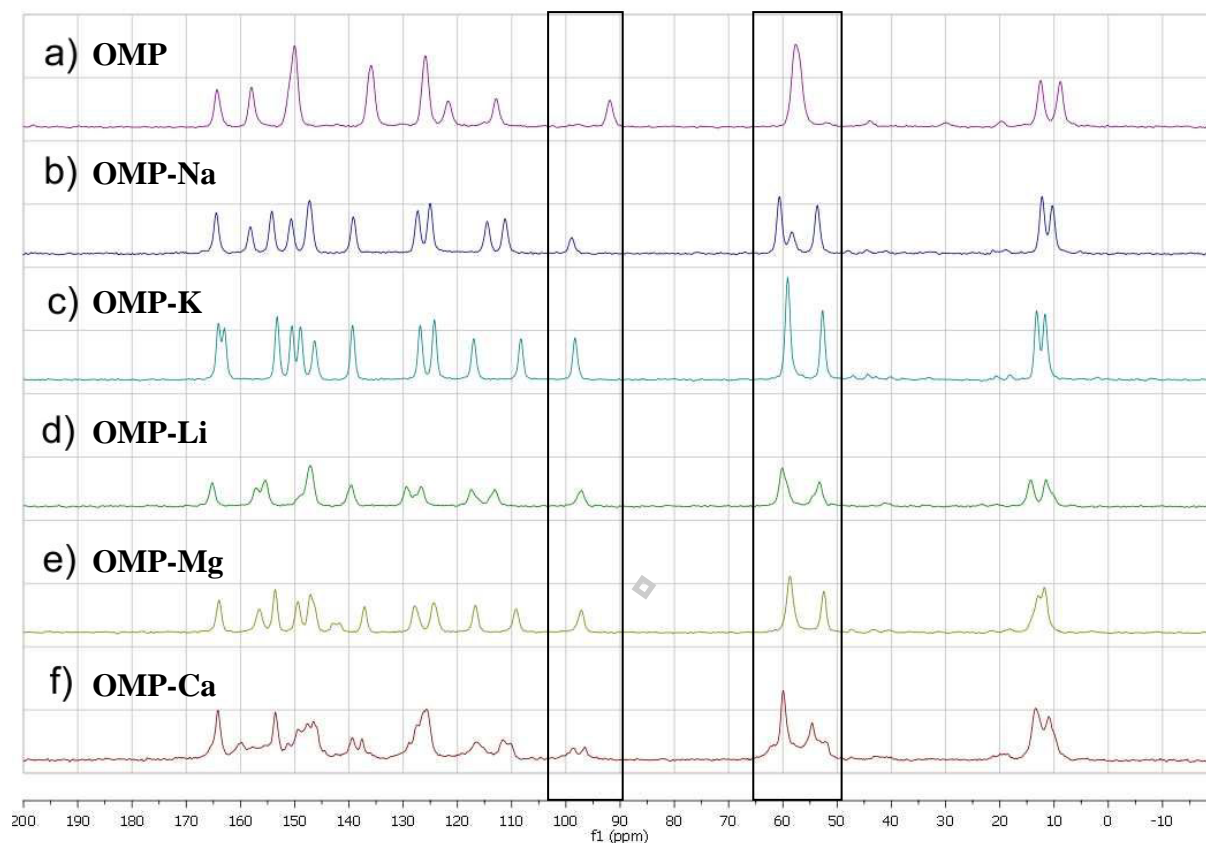
Tablica 8. Vrijednosti ¹³C i ¹⁵N NMR signala omeprazolovih tautomera 6-metoksi (1) i 5-metoksi (2) u THF-d₈, te ¹³C i ¹⁵N CPMAS NMR signala uzorka omeprazola.³⁷

Atom	1	2	CPMAS ^a	CPMAS ^b
C2	155,4	153,5	156,6	156,6
C3a	146,0	140,2	136,9	136,9
C4	101,1	121,6	91,6	120,6
C5	157,4	114,2	156,6	111,8
C6	115,3	158,2	111,8	156,6
C7	113,1	94,0	120,6	91,6
C7a	129,9	136,5	136,9	136,9
C8	61,9	61,6	57,6	57,6
C9	151,5	151,4	150,4	150,4
C10	128,4	128,2	126,0	126,0
C11	164,6	164,6	163,9	163,9
C12	127,1	127,1	126,0	126,0
C13	150,2	150,2	150,4	150,4
C15	11,6	11,5	9,0	9,0
C16	13,5	13,5	12,2	12,2
C17	60,1	60,0	57,6	57,6
C18	55,4	55,5	57,6	57,6
N1	-233,9	-233,0	-228,5	-228,5
N3	/	/	-117,4	-117,4
N14	-74,0	-74,0	-74,0	-74,0

^a označen kao tautomer 1; ^b označen kao tautomer 2.

Pri svim ostalim uzorcima soli taj je signal opažen bliže vrijednosti δ 98 ppm. To govori, da je kod tih uzoraka došlo do određenih promjena u blizini ugljikovog atoma C7. Najvjerojatnije je došlo do odvajanja protona na dušikovom atomu N1 (tablica 9).

U spektru uzorka OMP-Ca (slika 25) opažen je veći broj signala, koji bi mogli ukazivati na prisutnost različitih soli omeprazola u ispitivanom uzorku OMP-Ca.



Slika 25. Usporedba protonskih ^{13}C CP-MAS NMR spektara čvrstih uzoraka OMP i svih pripremljenih soli.

Razlike u području od 45–65 ppm odnosno cijepanje jednog širokog vrha prisutnog u omeprazolovoj molekuli na dva ili više u solima omeprazola, pripisujemo promjeni okoline ugljikovih atoma C8, C17 i C18 prilikom formiranja soli dolaskom kationa u blizinu molekule te time i deformaciju molekule. Slični rezultati, uz prethodno navedene atome uočavaju se i pri atomima 2, 3a, 7a, 10 i 12.¹¹⁹

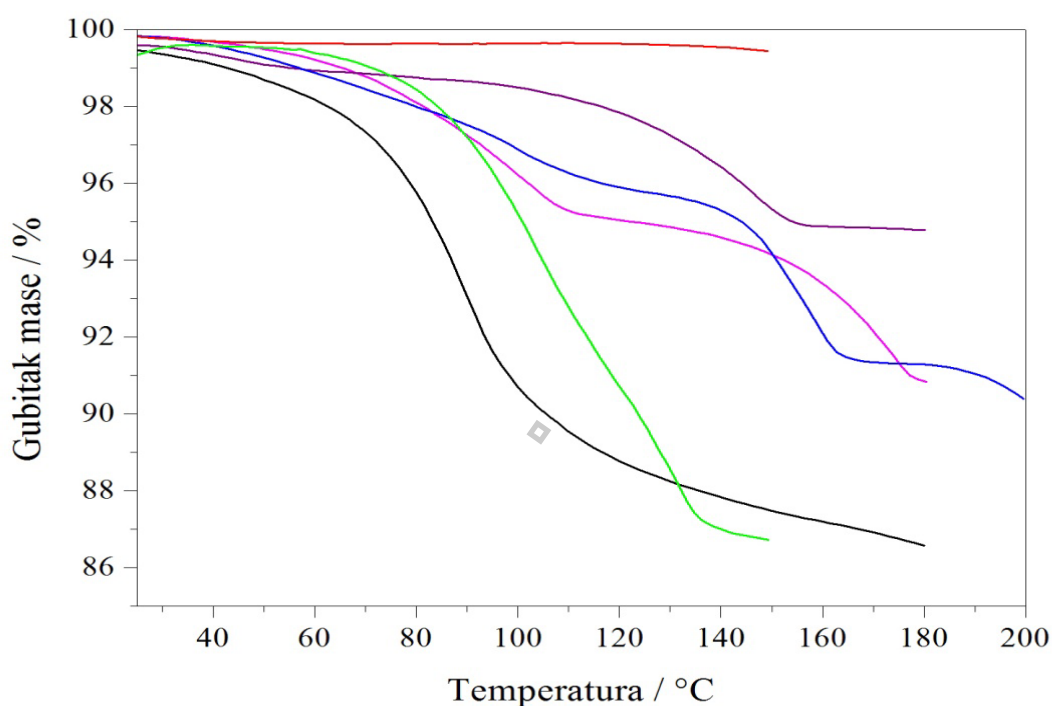
Tablica 9. Vrijednosti ^{13}C NMR signala omeprazola i pripremljenih soli, na specifičnim ugljikovim atomima.

C atom	OMP	OMP-Na	OMP-K	OMP-Li	OMP-Mg	OMP-Ca
C15	8,955	10,433	11,789	11,607	11,9	11,091
C16	12,599	12,336	13,338	14,4	13,004	13,54
C8, C17, C18	57,81	53,751	52,78	53,347	52,547	52,385
	/	58,478	59,217	60,229	58,792	54,713
	/	60,735	/	/	/	60,047
	/	/	/	/	/	61,788
C7	92,019	99,023	98,396	97,161	97,212	96,594
	/	/	/	/	/	98,669
C5	112,94	111,31	108,385	113,213	109,306	110,288
		114,6	117,079	117,525	116,776	111,695
C4	121,846	125,105	124,316	126,816	124,437	116,604
C10, C12	125,996	127,413	126,937	129,488	127,95	125,824
	/	/	/	/	/	127,555
	/	/	/	/	/	128,982
C3a, C7a	135,996	139,295	139,407	139,619	137,2	137,666
						139,437
C9, C13	150,125	147,332	146,421	147,18	141,846	144,558
	/	150,712	149,022	/	147,149	146,593
	/	154,295	150,591	/	149,457	147,777
	/	/	/	/	/	149,467
	/	/	/	/	/	151,289
C2, C6	158,05	158,242	153,323	155,479	153,657	153,627
	/	/	/	157,179	156,592	157,858
C11	164,406	164,507	163,05	165,286	164,011	159,902
	/	/	164,123	/	/	164,224

4.1.3. Termogravimetrijska analiza

Termička mjerenja započeta su uporabom termogravimetrijske analize i diferencijalne pretražne kalorimetrije u svrhu karakterizacije polimorfije. Termogravimetrijska analiza omeprazola ne pripisuje gubitak mase koji bi se mogao pripisati gubitku otapala što nije bio slučaj kod pripremljenih soli (slika 26). Svaka forma pripremljenih soli omeprazola pokazala je gubitke mase u skladu sa izlaskom kristalne i/ili površinsko vezane (adsorbirane) vode. U kalijevoj soli omeprazola uočen je gubitak mase u jednom koraku od 100 °C do 170 °C koji je u skladu sa gubitkom jedne molekule vode. U natrijevoj soli uočen je gubitak mase u dva koraka, od 85 °C do 110 °C i od 120 °C do 160 °C, što je u skladu sa gubitkom dvije molekule vode te u skladu sa literaturnim navodima, u kojima je opisana između ostalih

mogućih formi i nestabilna forma A, koja je u obliku dihidrata – detaljnije opisana u poglavlju 2.4.^{43,44,45,47,48,53} U magnezijevoj soli uočen je gubitak mase također u dva koraka, od 85 °C do 105 °C i od 135 °C do 170 °C što je u skladu sa gubitkom dvije molekule vode, a u literaturi je opisan nastanak diomeprazol magnezij dihidrata.⁶¹ U kalcijevoj soli uočen je kontinuiran gubitak mase, od 40 °C do 150 °C (sukladno gubitku tri molekule vode), dok litijeva sol kontinuirani gubitak mase pokazuje od 70 °C do 150 °C (sukladno gubitku tri molekule vode).

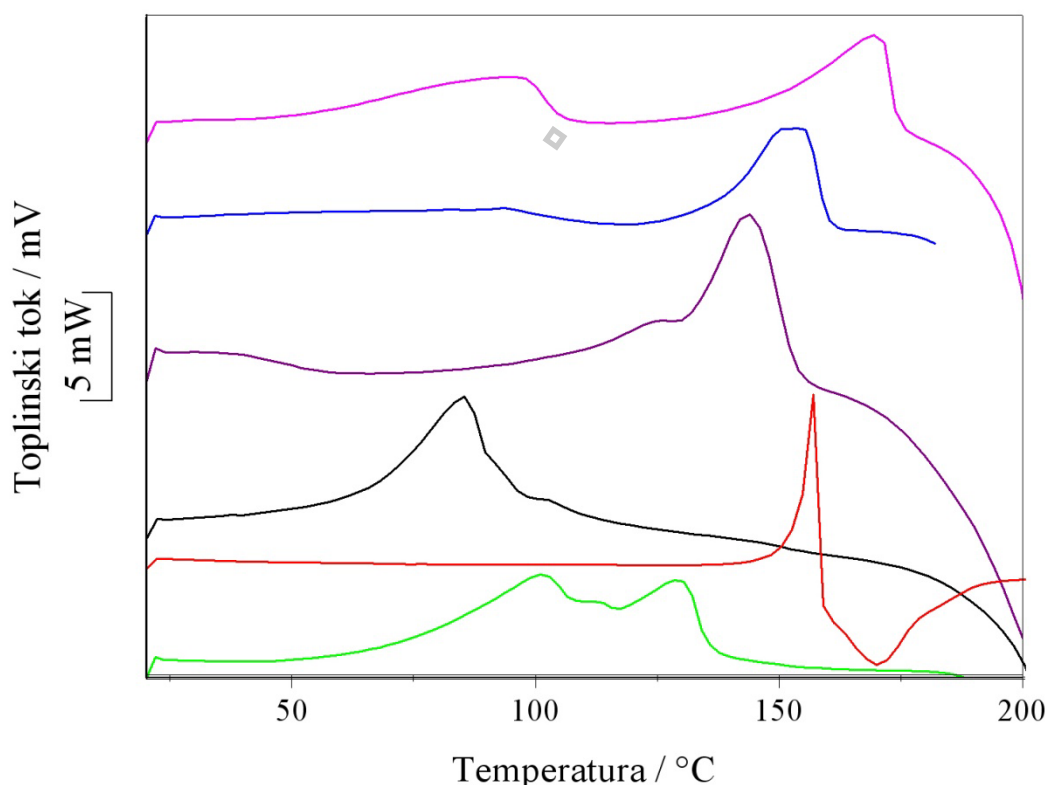


Slika 26. Prikaz termogravimetrijskih krivulja omeprazola (crvena boja) i svih 5 pripremljenih soli (OMP-K ljubičasta boja, OMP-Na plava boja, OMP-Mg ružičasta boja, OMP-Li zelena boja, OMP-Ca crna boja).

Analizom svake pojedine termogravimetrijske krivulje zaključujemo da su sve pripravljene soli omeprazola u hidratnoj formi.

4.1.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

DSC mjerenja omeprazola i pripremljenih soli pokazala su sljedeće karakteristike (slika 27): Omeprazol pokazuje samo jedan fazni prijelaz pri 150 °C nakon koje nastupa raspad, magnezijeva sol omeprazola pokazuje dva fazna prijelaza (pri 100 °C i 170 °C) nakon kojih nastupa raspad. Natrijeva sol omeprazola pokazuje dva fazna prijelaza (pri 100 °C i 150 °C) nakon kojih nastupa raspad, što je usporedivo sa dobivenom termogravimetrijskom krivuljom i literaturnim navodima⁴³ za natrijevu sol forme A. Kalijeva sol sadrži jedan fazni prijelaz pri 145 °C nakon koje nastupa raspad, litijeva sol omeprazola tri fazna prijelaza (pri 100 °C, 110 °C i 125 °C) nakon kojih nastupa raspad, i kalcijeva sol omeprazola tri fazna prijelaza (pri 58 °C, 90 °C i 100 °C) nakon kojih nastupa raspad. Naknadnom analizom rezultata TGA i DSC tehnika pripremljenih soli i usporedbom sa literaturnim podacima pokazat ćemo u kojim hidratnim oblicima postoje pripremljene soli.



Slika 27. Prikaz DSC krivulja omeprazola (crvena boja) i svih 5 pripremljenih soli (OMP-K ljubičasta boja, OMP-Na plava boja, OMP-Mg ružičasta boja, OMP-Li zelena boja, OMP-Ca crna boja).

Na slici 27 prikazana je apsolutna skala koja opisuje razlike u intenzitetu toplinskog toka (označeno područje toplinskog toka u rasponu 5 mW – krivulje su razmaknute zbog preglednosti).

Usporedbom rezultata dobivenih termičkim tehnikama TGA i DSC vidljivo je dobro slaganje temperaturnih područja u kojima se događaju promjene na analiziranim uzorcima. Dobiveni rezultati poslužili su kao dobra osnova za daljnja spektroskopska istraživanja prije svega za DVS i hot-stage analize u kombinaciji sa *in-situ* Ramanovom spektroskopijom kako bi se opisale/objasnile strukturne promjene u pripremljenim spojevima koje nastaju promjenom vlage odnosno temperature, ključnih parametara u farmaceutskoj industriji.

Gledajući TGA/MS i DSC rezultate povlači se zaključak da su soli termički nešto stabilnije. Raspad TGA/MS je detektiran pri višim temperaturama u odnosu na osnovni spoj omeprazol. To potvrđuju i DSC krivulje iz kojih je vidljiv raspad soli pri 20 °C viši temperaturi.



4.2. Vibracijska spektroskopija omeprazola i njegovih soli

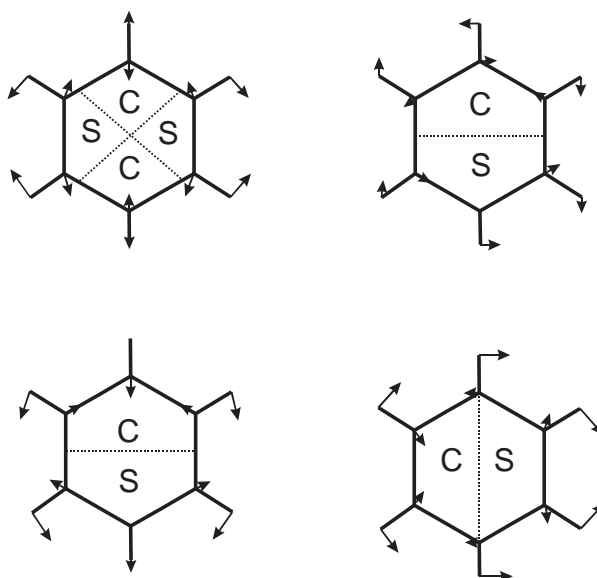
Ramanovi i infracrveni spektri analizirani su pomoću programskog paketa OPUS – pri korekciji bazne linije i izgladivanja spektara te označavanje karakterističnih vrpci.

4.2.1. Asignacija vibracijskih spektara omeprazola

Zbog preglednosti asignacije, molekulu omeprazola razdijelit ćemo na četiri dijela. Prvi dio predstavlja supstituirani piridinski prsten, drugi benzimidazolni dio, a treći predstavlja most koji čini C-SO-C skupina. Četvrti dio predstavljaju metoksi skupine.

4.2.1.1. Karakteristične vibracije supstituiranog piridinskog prstena

U benzenskom su prstenu sve CC veze ekvivalentne i reda su 1,5. Zbog te jednakosti i visoke simetrije vibracije pojedinih CC skupina su snažno povezane. Zato je najbolji način obraditi benzenski prsten kao cjelinu i upotrijebiti približne stojne valove. Colthrup¹²⁰ je upotrijebio za opis vibracija u obruču mehanički model stojnih valova, gdje čvorne točke označavaju atome koji miruju.



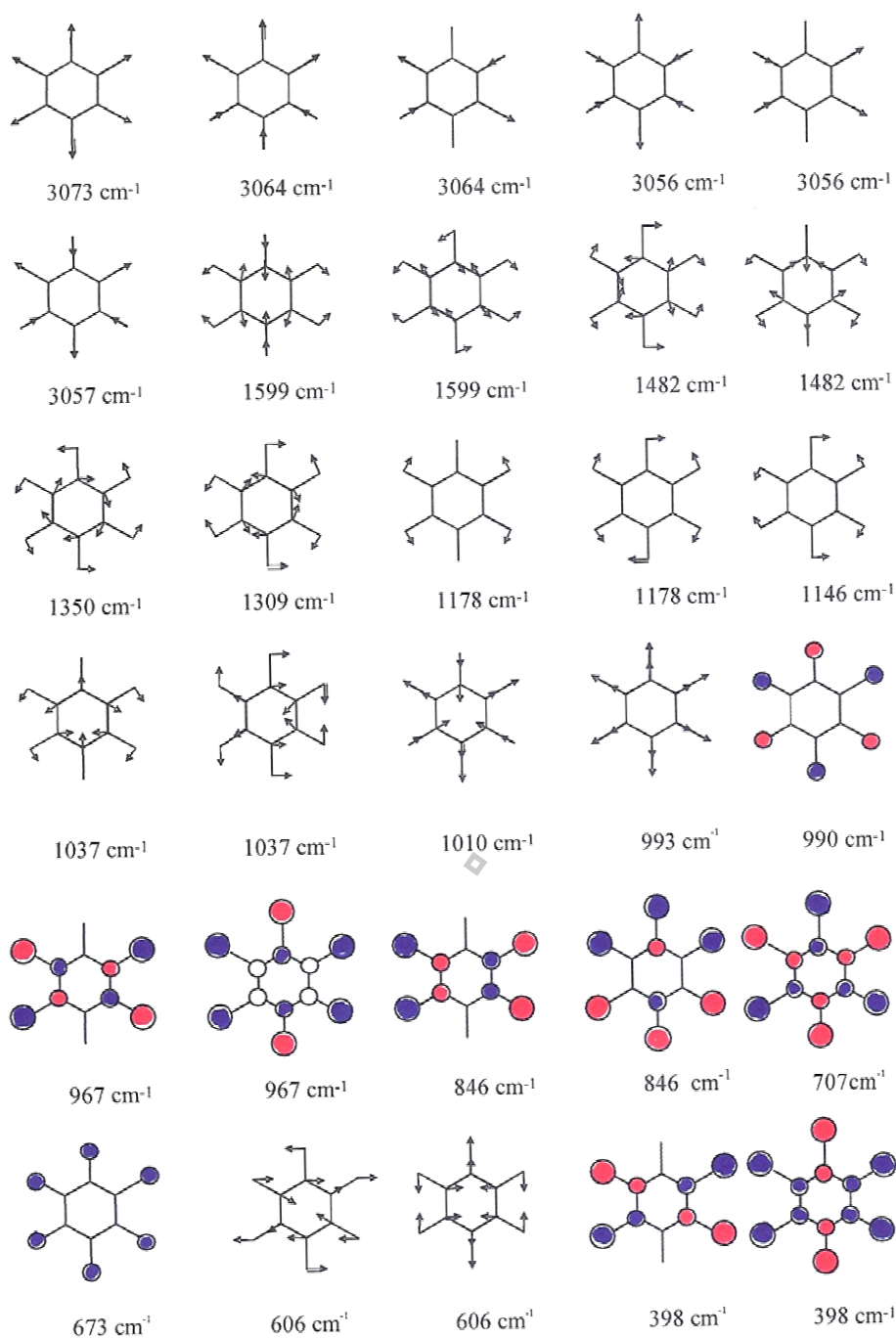
Slika 28. Kvadratna (gore) i polukružna (dolje) istezna vibriranja benzena.

Pri kvadrantnom vibriranju, čvorne crte dijele površinu benzena na četiri kvadranta, gdje četiri CC para vibriraju iz faze. Slično je i u slučaju polukružnog isteznog vibriranja, samo što u tom primjeru imamo samo dvije poluravnine gdje dvije CC skupine vibriraju iz faze.

Svaka vibracija je dvostruko degenerirana. Oznaka S predstavlja rastezanje, a C stezanje veza (slika 28). Kod supstituiranih benzena aproksimiramo načine vibriranja tako da vodikove atome zamijenimo sa mirujućim supstituentima.

Načini vibriranja u piridinskoj molekuli su vrlo slični onima u benzenu. Za monosupstituirani primjer piridina vibracije su opisane u tablici 10. Na slici 29 prikazan je grafički prikaz normalnog vibriranja molekule benzena.





Slika 29. Grafički prikaz normalnog vibriranja molekule benzena. Elektronska struktura izračunata je pomoću DFT metode i uporabom B3LYP funkcionala te 6-31G* baznim skupom.¹²¹ Izvanravninske vibracije su obojane u plavo sa smjerom vibriranja u list papira, a s crvenom bojom van lista papira.

Tablica 10. Karakteristična područja pojedinačnih vibracija za monosupstituirani piridin.¹³²

Asign.	2-supstituiran			3-supstituiran			4-supstituiran		
	cm ⁻¹	IC	R	cm ⁻¹	IC	R	cm ⁻¹	IC	R
CHIV	3100-3000	w	w	3100-3000	w	w	3100-3000	w	w
KIV	1620-1570	s	ms	1595-1570	m	ms	1605-1565	s	ms
KIV	1580-1560	s	m	1585-1560	s	m	1570-1555	m	m
PIV	1480-1450	s	m	1480-1465	s	m	1500-1480	m	m
PIV	1440-1415	s	mw	1430-1410	s	mw	1420-1410	s	mw
CHD	1050-1040	m	ms	-	-	-	-	-	-
RIV	1000-985	m	vs	1030-1010	m	vs	1000-985	m	vs
KN	780-740	s	-	820-770	s		850-790	s	-
IDP	740-720	m	vw	730-690	s	vw	730-720	m	vw
KRD	630-615	w	m	630-615	w	m	670-660	-	m
KIRD	410-395		vw	410-395		vw	400-385	-	vm
KRD*	850-800	vw	ms	805-750	wv	m	805-785	vw	ms

CHIV	CH istezna vibracija	vs	vrlo jak
KIV	Kvadrantna istezna vibracija	s	jak
PIV	Polukružna istezna vibracija	ms	srednje jak do jak
CHD	CH deformacija, δ_{rc} (u ravnini)	m	srednje jak
RIV	Radijalna istezna vibracija	mw	srednje jak do slab
WGD	deformacija; klaćenje, δ_{wg}	w	slab
IDP	Izvanravninska deformacija prstena	vw	vrlo slab
KRD	Kvadrantna ravninska deformacija		
KIRD	Kvadrantna izvanravninska deformacija		
KRD*	Kvadrantna ravninska deformacija		

Infracrveni i Ramanov spektar piridina imaju karakteristične frekvencije CH isteznih vibracija, isteznih i deformacijskih vibracija prstena te CH δ_{wg} vibraciju, koja je osjetljiva na tip i broj supstitucija. Slično kao u benzenu nalazimo CH istezne vibracije u području između 3100 – 3000 cm⁻¹ (tablica 10).

Kvadrantna istezna vibracija prstena javlja se kao srednje intenzivna vrpca u području između 1650 cm⁻¹ i 1555 cm⁻¹ u infracrvenim kao i u Ramanovim spektrima. Polukružna istezna vibracija je također aktivna u infracrvenom i Ramanovom spektru, a nalazi se u području između 1500 cm⁻¹ i 1410 cm⁻¹. U Ramanovom spektru piridina najintenzivnija je vrpca na 1050 – 980 cm⁻¹, u kojoj je sadržano 2, 4, 6 ugljikovo radijalno istezanje. Slično vrijedi i za kvadrantnu ravninsku deformaciju, koji se u Ramanovim spektrima nalazi u

području 850 cm^{-1} i 750 cm^{-1} . Vibracija deformacije CH skupine δ_{wg} ($850 - 740\text{ cm}^{-1}$) korelira sa vrstom supstitucije. Korelacija je prikazana u tablici 11.

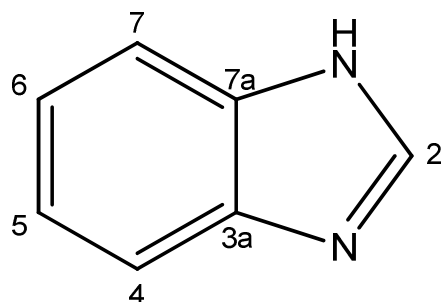
Tablica 11. Odabrane CH δ_{wg} i izvanravninske deformacije prstena molekule piridina te substituiranoga piridina.

molekula	asignacija	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	intezitet	
			IC	Raman
piridin	susjedni 5 CH	760–740	s	-
	izvanravninska deformacija prstena	710–700	s	-
2-monosupstituiran	susjedni 4 CH	780–740	s	-
3-monosupstituiran	susjedni 3CH	820–770	s	-
	izvanravninska deformacija prstena	730–690	m-s	w
4-monosupstituiran	susjedni 2 CH	850–790	s	-

4.2.2. Benzimidazol



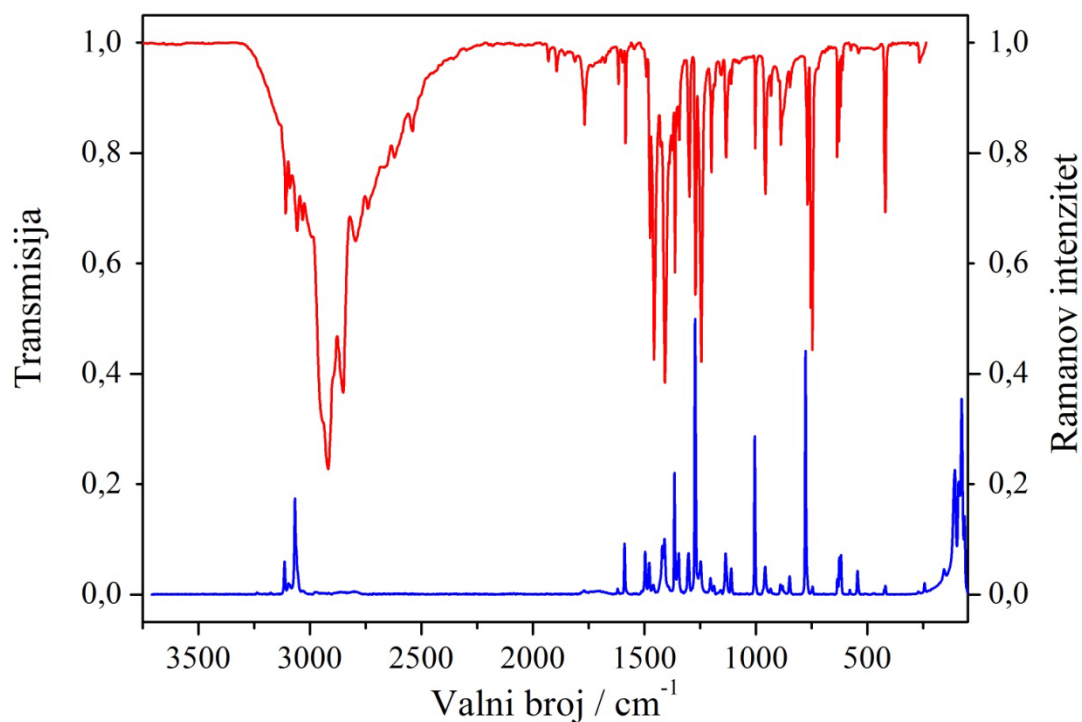
Sljedeći fragment omeprazola, kojeg će se pokušati detaljno asignirati je benzimidazol (BI)–prikazan na slici 30. Benzimidazol i serija supstituiranih benzimidazola spadaju među osnovne komponente važnih farmaceutskih spojeva.^{122–127} Važnost BI se izražava također u brojnim spektroskopskim istraživanjima.^{4,128,129,130,131} Osnovna asignacija infracrvenih i Ramanovih spektara benzimidazola napraviti će se pomoću *ab-initio* računa.¹³¹ Zbog toga što će slično kao i u primjeru piridina vibracije prstenovih skupina BI biti snažno povezane, one će biti objašnjene opisno.



Slika 30. Molekula benzimidazola s označenim C atomima pri interpretaciji NMR spektara (iz poglavlja 4.1.2.).

Osnovne vibracije su izračunate metodom funkcionala gustoće (BLYP/6-31G*). Frekvencije su skalirane sa dva faktora, odnosno 0,995 za ravninske vibracije i 0,963 u slučaju izvanravninskih vibracija. Molekulu BI sastavlja 15 atoma raspoređenih u C_s simetriji, što znači, da se može očekivati 39 normalnih načina vibriranja ($3N-6$). Od toga ih 12 pripada depolariziranim izvanravninskim vibracijama (A''), a 27 polariziranim ravninskim vibracijama (A'). U C_s simetriji su sve vibracije njihanja Raman i infracrveno aktivne.

U tablici 12 prikazane su samo najintenzivnije vibracije pronađene u obje vrste eksperimentalnih spektara. Eksperimentalni (infracrveni i Ramanov) spektri prikazani su na slici 31. Infracrveni spektar je snimljen u nujolu i prikazan kao transmisijski spektar.



Slika 31. Infracrveni (crveno) i Ramanov spektar (plavo) polikristalnoga benzimidazola.

Infracrveni spektar je snimljen u nujolu.

Tablica 12. Izračunate i izmjerene frekvencije vibracija u molekuli BI.

BLYP/6-31G* (cm ⁻¹)	IC (cm ⁻¹)	Raman (cm ⁻¹)	Opis vibracije
Izvanravnijske vibracije			
218	248	244	CH nerav. njih. vibr., sim.
248	266	270	CH nerav. njih. vibr., asim.
406	416	426	NH nerav. njih. vibr.
421	424	423	C4H, C7H, NH nerav. njih. vibr.
570	573	579	C5H, C6H, NH nerav. njih. vibr.
630	636	635	C2H, NH nerav. njih. vibr.
731	747	746	CH nerav. njih. vibr., sim. (benzen)
750	754	778	CH nerav. njih. vibr., asim. (imidazol)
797	848	849	C2H nerav. njih. vibr.
830	863	881	CH nerav. njih. vibr.
890	880	891	C4H, C5H, C7H nerav. njih. vibr.

933	932	934	CH (benzen) nerav. njih. vibr.
Ravninske vibracije			
405	419	419	Deformacija prstena (BI)
537	540	545	Deformacija prstena (sim.)
610	620	618	Deformacija prstena i istezanje veza (asim.)
767	770	778	Deformacija prstena i istezanje veza (sim.)
863	864	881	C2H, C5H, C7H def.
912	957	959	C2H, NH def.
1005	1003	1005	CH def. sim. (benzen)
1061	1134	1134	C2H, NH deformacija
1103	1111	1110	CH deformacija
1151	1155	1159	CH deformacija, asim.
1170	1200	1204	NH, C4H, C5H, C7H deformacija, asim.
1241	1245	1248	NH, C5H, C6H deformacija sim.
1253	1272	1273	NH, C4H, C5H, C7H deformacija, sim.
1299	1298	1303	CH deformacija (BI)
1349	1344	1346	NH, C4H, C5H deformacija, sim.
1390	1409	1410	NH, C4H, C6H, C7H, deform. asim.
1445	1457	1460	NH, CH deform. sim.
1478	1475	1478	CH (benzen), NH deformacija, N3C2 istezanje
1491	1491	1497	CH (benzen), NH deformacija, asim.
1576	1586	1589	C6H, NH deformacija, C–C istezanje (benzen)
1613	1617	1620	CH deformacija i C–C istezanje (BI)
x-H uzdužne istezne vibracije			
3098	3062	3068**	C5H, C6H, C7H, istezanje, asim.
3108	2926*	-	C5H, C7H istezanje
3120	3033	3054**	C5H, C6H, C7H, istezanje
3131	3109	3114**	C4H, C5H, C6H, istezanje
3172	3058	3061**	C2H, istezanje
3532	~ 2900		NH, istezanje

* Preuzeto iz literature¹³¹

** nakon uporabe Fourierove autodekonvolucije

4.2.3. Izvanravninske vibracije

Sistematska usporedba između izvanravninskih vibracija čvrstoga uzorka i pripadajućih izračunatih modova prikazuju zadovoljavajuće slaganje. Ta činjenica ukazuje, da je utjecaj okoline (rešetke) i nekovalentnih interakcija (vodikova veza) u čvrstom stanju relativno mala. Prosječna razlika iznosi 6 cm^{-1} . Tamo gdje je neslaganje veće, razlike možemo pripisati vodikovim vezama. U BI molekuli NH skupina predstavlja snažno proton donorsko mjesto što je uzrok za veliku razliku između izračunate i izmjerene vrijednosti te vibracije. Na taj način nastanak vodikove veze može utjecati na vibracije kojih je sastavni dio također i NH skupina te neposredno kao utjecaj okoline na pojedine vibracije.

Ravninske vibracije (osim isteznih CH i NH vibracija) su prikazane u sredini tablice 12. Slaganje između izmjerenih i izračunatih frekvencija je slično kao u slučaju izvanravninskih vibracija. Odstupanja su najveća tamo gdje se javljaju udjeli NH vibracija koje su u eksperimentu vezane vodikovom vezom.

Zadnji dio tablice 12 predstavljaju istezne NH i CH vibracije. Tu u usporedbi između izračunatih i izmjerenih frekvencija nastupaju najveće razlike. Te razlike su očekivane, jer je proton donorska skupina i njena istezna vibracija (*engl. stretching*) najosjetljivija na tvorbu vodikove veze. Da je u sustavu stvarno prisutna vodikova veza, jasno se razabire iz široke apsorpcije u infracrvenom spektru i koja kulminira oko 2900 cm^{-1} .

4.2.4. Vibracija sulfoksidne skupine

Spojevi koji sadrže S=O skupinu imaju u infracrvenom i Ramanovom spektru snažnu vrpca u području oko 1050 cm^{-1} . U literaturi više puta opisuju kao najznačajnije područje pojavljivanja S=O istezne vibracije između 1030 cm^{-1} i 1065 cm^{-1} .¹³² S=O istezna vrpca je u infracrvenom spektru intenzivnija nego u Ramanovom.

4.2.5. Vibracija metoksi skupine

Asignacija (infracrvenih i Ramanovih) vrpca metoksi skupine sažeta je u tablici 13.

Tablica 13. Asignacija vibracija metoksi skupine.¹³³

$\tilde{\nu}_{IC}$ (tekućina) / cm^{-1}	$\tilde{\nu}_{Raman}$ (tekućina) / cm^{-1}	Asignacija
2980 (ms)		CH ₃ istezanje asim.
2945 (ms)	2944 (8) p	CH ₃ istezanje asim.
2849 (ms)	2850 (2) p	CH ₃ istezanje sim.
1464 (mw)	1464 (0) p	CH ₃ deformacija asim.
1444 (s)	1444 (2) p	CH ₃ deformacija sim.
1289 (vs)	1289 (4) p	R–O–CH ₃ istezanje
1044 (s)	1044 (5) p	CH ₃ zibajuće izvan ravnine
1022 (s)	1022 (1) p	O–CH ₃ istezanje
811 (ms)	811 (8) p	CH ₃ zibajuće u ravnini
455 (mw)	457 (3) p	R–O–C deformacija
237 (sh)	234 (1) dp	R–O–C deformacija

- vs jako snažan
s snažan
ms srednje snažan do snažan
m srednje snažan
mw srednje snažan do slab
w slab
vw vrlo slab
sh rame
p polarizirana vrpca
dp depolarizirana vrpca
(#) relativni intenzitet

U visokofrekventnom dijelu spektra se nalaze tri istezne vibracije CH₃ skupine. Pri 2980 cm^{-1} i 2945 cm^{-1} leže obje asimetrične vibracije, a simetrična istezna vibracija prisutna je pri 2849 cm^{-1} . Deformacijske vibracije iste skupine nalaze se pri 1464 cm^{-1} (simetrično) i 1444 cm^{-1} (asimetrično). Slijedi istezna vibracija cijelog fragmenta (R–O–CH₃, 1289 cm^{-1}) i izvanravninska zibajuća vibracija metilne skupine pri 1044 cm^{-1} . Ravninski dio zibajuće vibracije lociran je na 811 cm^{-1} , a vrpce na 1022 cm^{-1} , 455 cm^{-1} i 237 cm^{-1} pripadaju O–CH₃ isteznim vibracijama i R–O–CH₃ deformacijama. Općenito su sve vibracije infracrveno kao i Ramanovo aktivne, a u biti se razlikuju samo intenziteti pojedinih vibracija (vidi tablicu 13).

4.2.6. Molekula omeprazola

Kao što smo već spomenuli, asignaciju pojedinih fragmenata ćemo upotrijebiti za asignaciju infracrvenog i Ramanovog dijela spektra omeprazola. Frekvencije vrpce u infracrvenom i Ramanovom spektru omeprazola opisane su u tablici 14.

Tablica 14. Frekvencije vrpce u infracrvenom i Ramanovom spektru omeprazola.¹³⁴

$\tilde{\nu}_{IC} / \text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}_{Raman} / \text{cm}^{-1}$	asignacija
~3070 (shift)	3076	CH istezanje (BI, P)
3057	3055	CH istezanje (BI, P)
	3016	CH istezanje (BI, P)
2984	2981	CH ₃ (M) istezanje asimetrično
2972	~2968 (sh)	CH ₃ (M) istezanje asimetrično
2944	2954	CH ₃ (M) istezanje asimetrično
~2930	prekriven	NH istezna vibracija
2904	2915	CH ₃ istezanje asimetrično
2854	2857	CH ₃ (M) istezanje simetrično
2835	2837	CH ₃ istezanje simetrično
1629	1629	KIV (P), CH deformacija, CC istezanje (P, BI)
1587	1588	CH +NH deformacija, CC istezanje (BI)
1568	1569	KIV (P), CH deformacija, CC istezanje (P, BI)
1512	1514	CH+NH deformacija (BI)
1470 (sh)	1477	PIV (P), CH (B), NH deformacija, N3C2 istezanje
1462	1460	CH ₃ deformacija (M), NH+CH deformacija (BI)
1428	1432	PIV (P), CH ₃ deformacija simetrična
1410	1412	NH+CH deformacija (BI), PIV (P)
1356	1356	NH+C4H+C5H deformacija (BI)
1312	1314	CH deformacija, R–O–CH ₃ istezanje
1293		R-O-CH ₃ istezanje
1273	1273	NH+CH deformacija simetrično (BI)
1253	1255	NH+CH deformacija simetrično (BI)
1231	1232	NH+CH deformacija asimetrično (BI)
1206	1203	NH+CH deformacija simetrično (BI)
1188	1190	NH+CH deformacija simetrično (BI)
1160	1160	CH deformacija asimetrično
1113	1113	CH deformacija asimetrično
1077	1076	NH deformacija (BI), CH ₃ (M) izvanravninska deformacija
1014	1009	S=O istezanje vibracija
967	963	CH deformacija (BI)
885	886	CH klaćenje
835	842	CH ₃ zibanje metoksi skupine
822	823	KRD (P)

810	790	CH ₃ zibanje u ravnini
787		CH ₃ zibanje u ravnini
759	762	CH klaćenje (IM)
732	733	CH klaćenje (B)
667	653	NH klaćenje (BI)
631	635	S-C istezanje sulfoksidni most
621	620	KRD (P), deformacija prstena + rastezanje (BI)
582	582	CH+NH klaćenje (BI)
546	546 (sh)	deformacija prstena izvan ravnine
535	538	deformacija prstena izvan ravnine
518	519	deformacija prstena izvan ravnine
502	504	deformacija prstena izvan ravnine
478	479	deformacija prstena izvan ravnine
	444	R-O-CH ₃ deformacija (M)
	429	Deformacija prstena (BI)
	382	KIRD (P)
	327	CH klaćenje asimetrično (BI)
	254	R-O-CH ₃ deformacija (M)
	212	CH klaćenje
	142	fononska vrpca
	124	fononska vrpca
	104	fononska vrpca
	87	fononska vrpca
	72	fononska vrpca
	66	fononska vrpca

Za asignaciju vibracija su upotrijebljene iste oznake kao i u analizi supstituiranog piridina (P, tablica 11) te benzimidazola (BI, tablica 12). Oznaka M predstavlja metoksi skupinu (tablica 13).

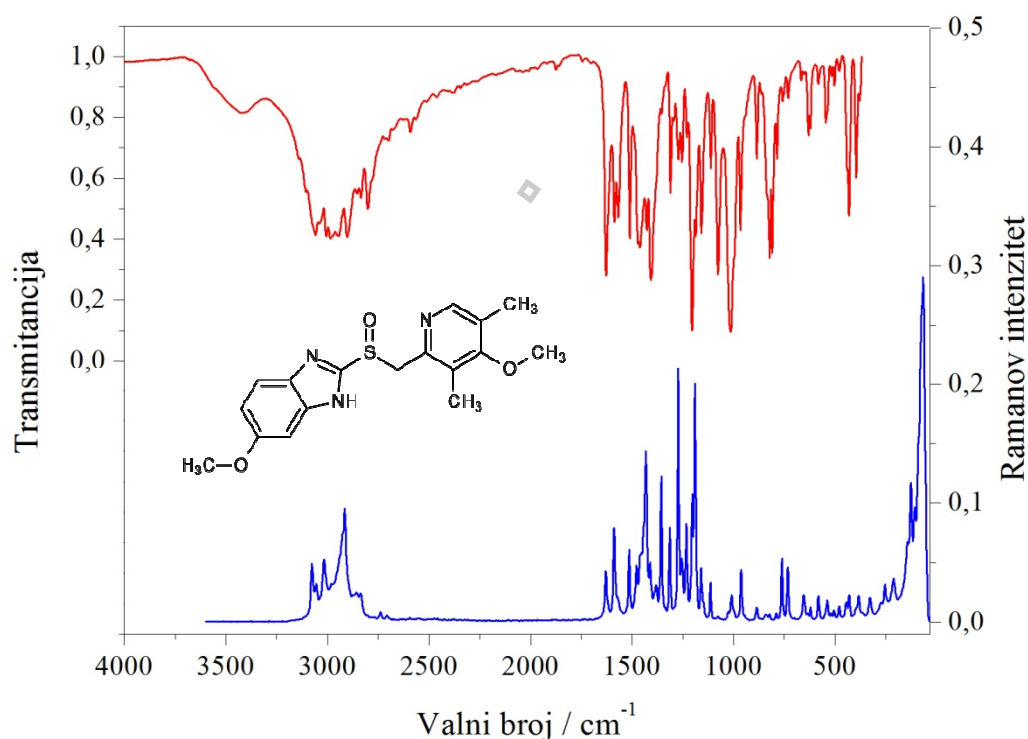
Pošto je analizama potvrđeno, da je izostanak NH istezanja glavni dokaz o nastanku soli omeprazola mnogo pažnje bit će prvenstveno posvećeno upravo toj vibraciji. NH istezanje u infracrvenom spektru omeprazola uobičajeno je vidljivo kao srednje intenzivna vrpca u području $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ no budući je NH skupina s benzimidazolnog dijela molekule snažno proton donorsko mjesto koje sudjeluje u vodikovim vezama s različitim dijelovima molekule te je njena istezna vibracija najosjetljivija na tvorbu vodikove veze. Prisutnost vodikove veze u sustavu jasno se može razabrati iz široke apsorpcije $3500-2900 \text{ cm}^{-1}$.

Asignaciju ključnih vibracija u molekuli omeprazola provjerili smo računom. Upotrijebili smo kvantnomehanički pristup. VASP (*Vienna Ab-initio Simulation Package*) je program za kvantnu molekularnu dinamiku, koji upotrebljava pseudo-potencijale (*Vanderbilt*), ili pak metodu projektora povećanih valova (*Projector augmented wave method*) i bazni skup ravnih

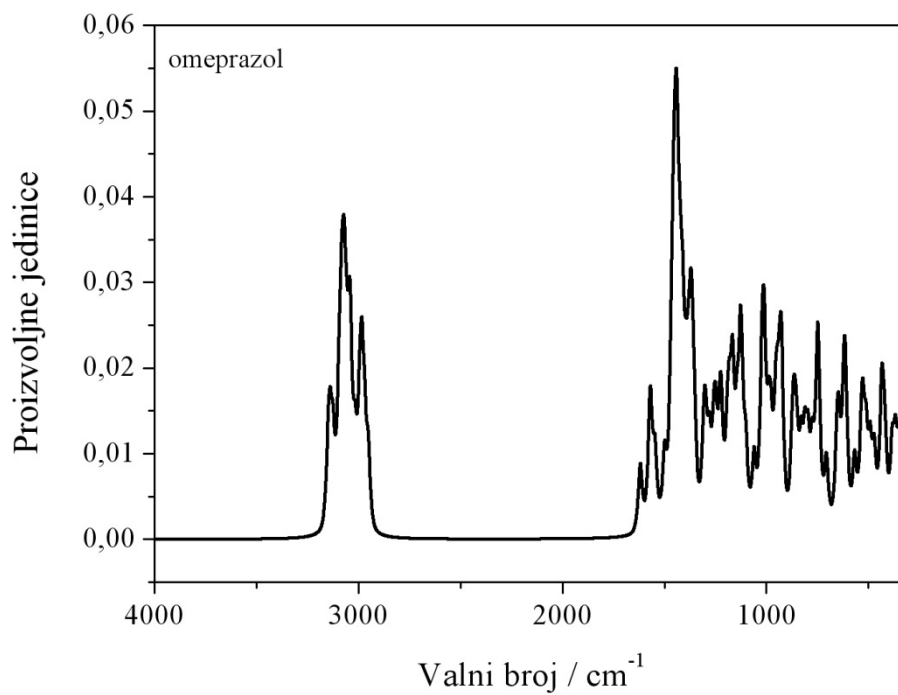
valova (*plane wave basis set*). VASP upotrebljavamo za modeliranje materijala na atomskoj skali. Elektronsku strukturu i kvantno mehaničku molekularnu dinamiku izračuna iz prvih principa tako, da se izračuna aproksimativno rješenje višeatomne Schrödingerove jednačbe s upotrebom teorije funkcionala gustoće i rješavanja Kohm-Shamove jednačbe, ili pak u aproksimaciji Hartree-Fock i rješavanju Roothaanovih jednačbi. Isto tako se može upotrijebiti i miješani pristup DFT i HF.

Osnovna prednost VASP programa je u njegovoj upotrebi ravnih valova za opis jednoelektronskih orbitala, elektronske gustoće naboja i lokalnog potencijala. Za određivanje osnovnog elektronskog stanja VASP upotrebljava iterativnu matričnu dijagonalizaciju.

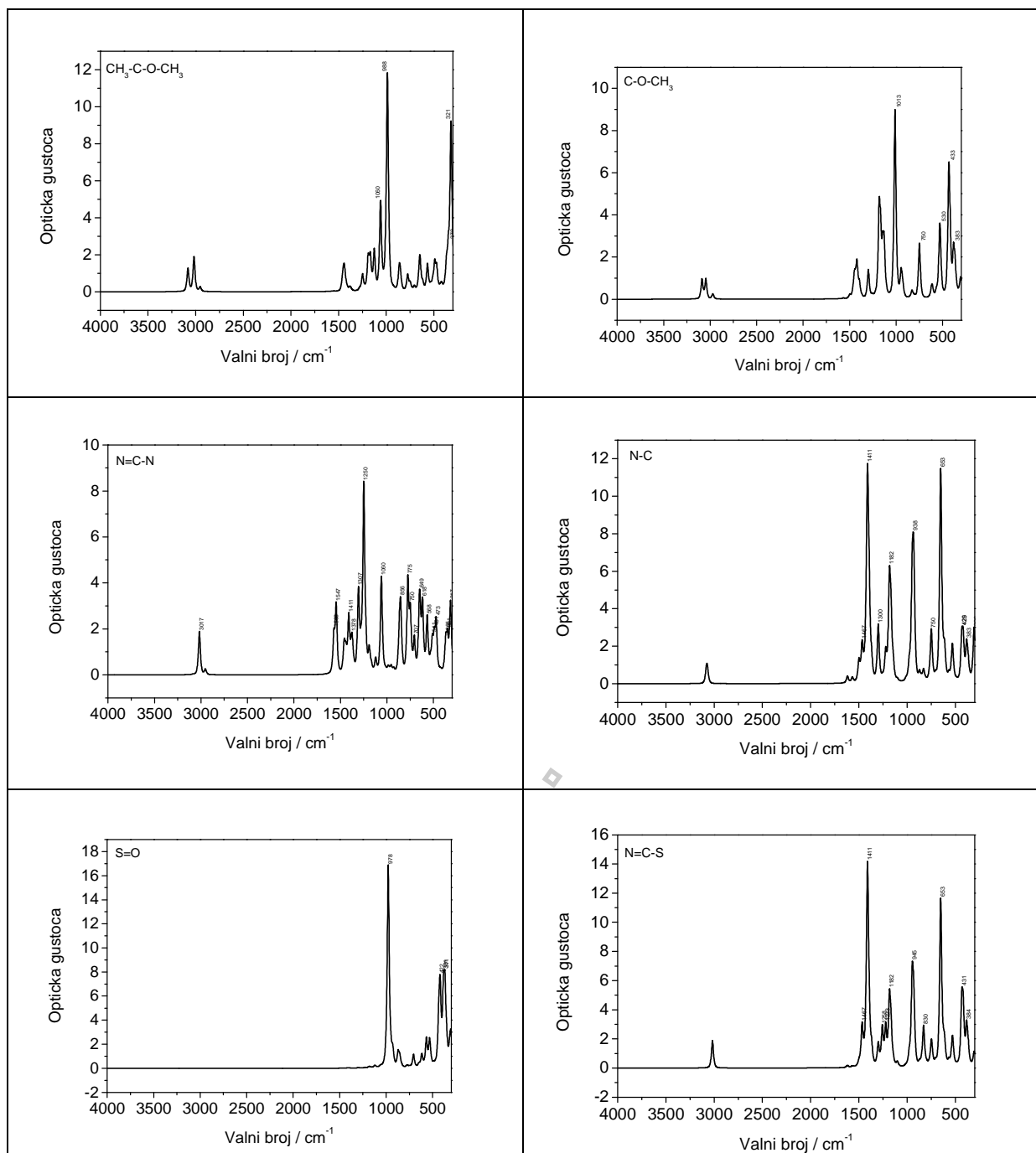
Ramanov i infracrveni spektar omeprazola u čvrstom stanju prikazani su na slici 32, dok je izračunati spektar omeprazola prema optimiziranom računu prikazan na slici 33. Pojedini fragmenti preuzeti iz računa optimiziranog omeprazola prikazani su na slici 34.



Slika 32. Ramanov i infracrveni spektar omeprazola.



Slika 33. Izračunati spektar omeprazola u čvrstom stanju prema podacima iz Dodatka, stranica XX.



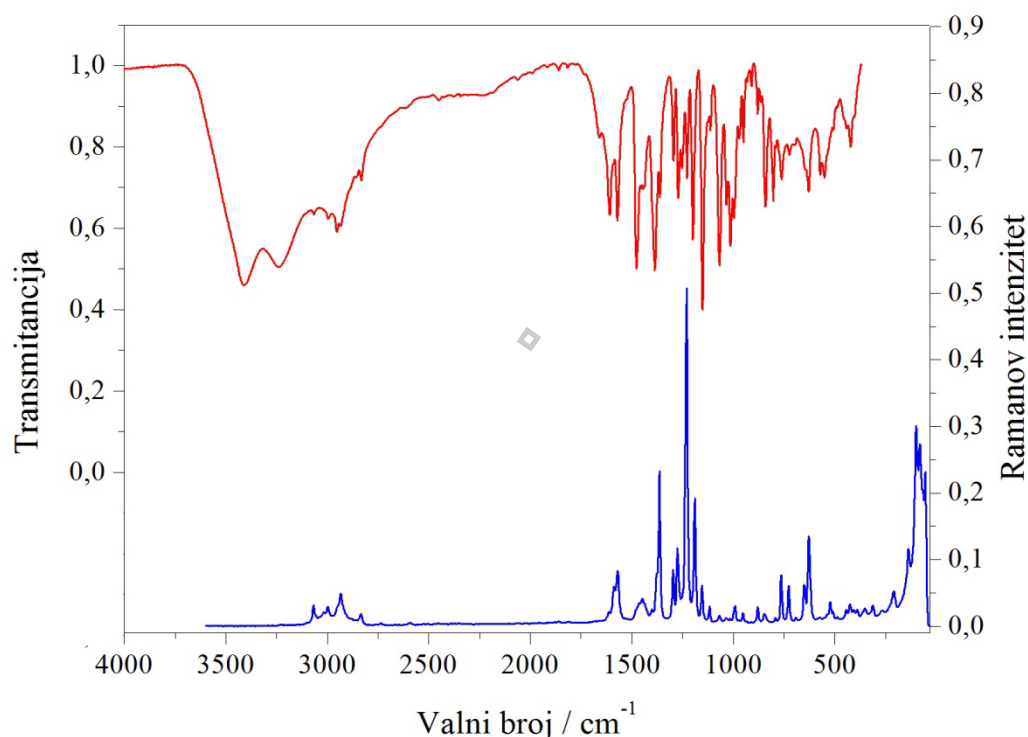
Slika 34. Izračunate vrpce odabranih omeprazolovih funkcionalnih skupina. Vrpce su preuzete iz računa optimizirane molekule omeprazola (Dodatak, stranica XX).

4.2.7. Asignacija karakterističnih vrpca soli omeprazola

Generalnom usporedbom infracrven i Ramanovih spektara svih pet pripremljenih soli (Na, K, Li, Mg, Ca) zaključujemo da su oni strukturno vrlo slični uz pojedine specifičnosti koje će biti pobliže objašnjene u narednim potpoglavljima.

4.2.7.1. Asignacija karakterističnih vrpca litijeve soli omeprazola

Ramanov i infracrveni spektar OMP-Li u čvrstom stanju prikazan je na slici 35.



Slika 35. Ramanov i infracrveni spektar litijeve soli omeprazola.

Postupkom deprotonacije molekule omeprazola i nastankom litijeve soli, u ovom konkretnom slučaju nastaju strukturne promjene kojima je zahvaćen svaki pojedini fragment molekule – benzimidazolni dio, sulfoksidni most, pridinski dio te metoksi skupine.

Promjene se najočitiije ogledaju kroz variranja na benzimidazolnom dijelu, jer se na N1 atomu događa deprotonacija i mijenja se struktura spoja (soli). Tako u prilog nastanka soli najzornije govore upravo izostanci vrpca na 1512 cm^{-1} i 582 cm^{-1} (infracrveno) koje u

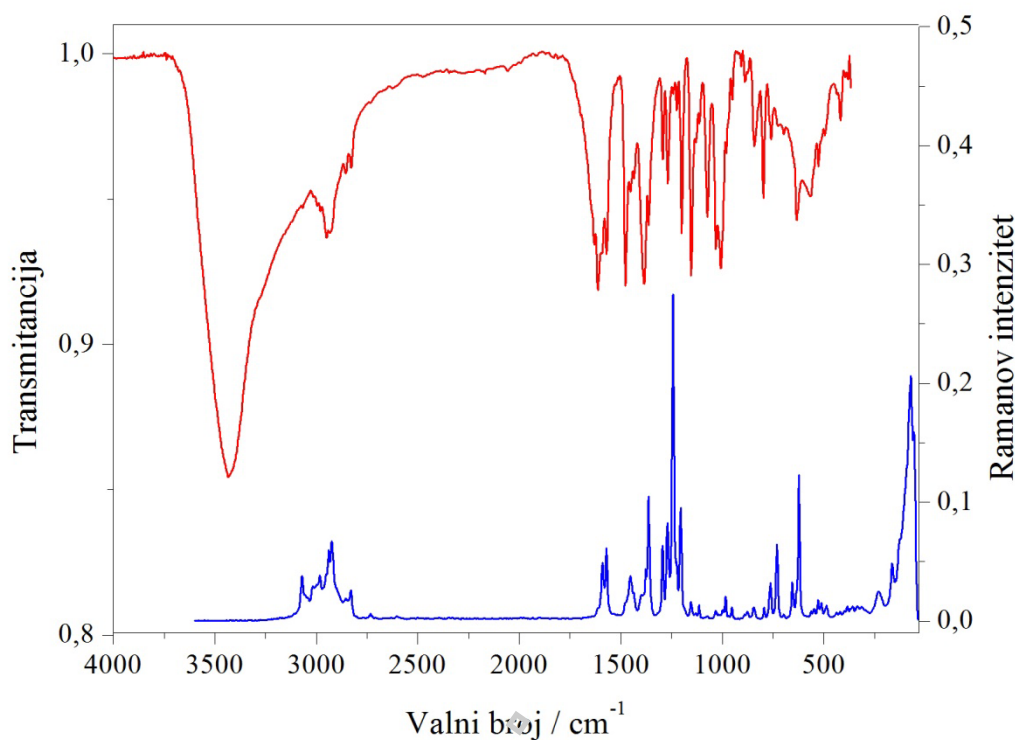
omeprazolu karakteriziraju vibraciju NH skupine. Nestankom spomenute vibracije ostale vrpce u kojima NH skupina sudjeluje također se mijenjaju u spektru soli. To su u omeprazolu prije svega vibracije na 1477 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} i 1356 cm^{-1} (Raman), odnosno 1470 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} i 1356 cm^{-1} (infracrveno) koja uključuju NH def., NH+CH def. (BI) te NH+C4H+C5H def. (BI), a doživljavaju promjene intenziteta i/ili pomake. Osim tih vibracija opažene su i promjene kod ostalih specifičnih vrpca BI fragmenta (C=C i CH istežanje) karakteristične za virhove na 3016 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} i 1588 cm^{-1} (Raman). Nadalje, cijeli niz intenzivnih vrpca središnjeg dijela Ramanovog spektra omeprazola ($1300\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$) promijenjen je budući su tu prisutne NH+CH simetrične i asimetrične deformacije. U spektru dominira vrpca na 1231 cm^{-1} .

Sulfoksidni most je fragment koji je također zahvaćen promjenama zbog blizine mjesta doeprotonacije, ali i zbog nastanka vodikovih veza (hidrati i intermolekularne H-veze) u kojima sudjeluje i sulfoksidna skupina. Te promjene su vidljive na 1009 cm^{-1} (Raman) i 1016 cm^{-1} (infracrveno), te $660\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ (infracrveno/Raman) pomicanjem prema nižim vrijednostima i promjenom intenziteta vrpca. Potonje je područje karakteristično za S–C istežanja sulfoksidnog mosta.^{135,136} Da nastaje hidratni oblik soli potvrđeno je već na samom početku istraživanja pripremljenih spojeva soli termičkim istraživanjima (TGA, DSC), a dodatni dokaz je vidljiv u infracrvenom spektru litijeve soli u području $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ točnije vrhovi široke vrpce na 3412 cm^{-1} i 3237 cm^{-1} koje karakterizira OH istežanje.

U konačnici zaključujemo da je usporedbom infracrvenog i Ramanovog spektra OMP s OMP-Li vidljiva promjena u vrpcama koja karakterizira nastanak hidratne soli OMP-Li.

4.2.7.2. Asignacija karakterističnih vrpca natrijeve soli omeprazola

Ramanov i infracrveni spektar OMP-Na u čvrstom stanju prikazan je na slici 36.



Slika 36. Ramanov i infracrveni spektar natrijeve soli omeprazola.

Usporedbom Ramanovih i infracrvenih spektara omeprazola i natrijeve soli omeprazola uočavamo jasne razlike u spektrima. One se očituju u nestanku određenih vrpca u spektru pripravljene natrijeve soli te pomacima vrpca i izrazitim razlikama u intenzitetu istih, a glavni razlog leži u deprotonaciji amino skupine na imidazolnom prstenu i vezanjem jedne premošćujuće molekule vode (povezana vodikovim vezama i CO \cdots H interakcijom).

Analizom ramanovih i infracrvenih spektara omeprazola i natrijeve soli u području 3600 – 2700 cm $^{-1}$ uočavamo ponajprije vrlo intenzivnu široku vrpca na 3430 cm $^{-1}$ koja je posljedica nastana hidratne soli što je u skladu sa zaključcima koje je objavio Murakami sa suradnicima. Ostale opažene vibracije (infracrveni i Raman spektar) karakteristične su za istežanja –CH vrpca benzimidazolnog dijela molekule (3100 – 3000 cm $^{-1}$) te piridina i metoksi skupina (3000 – 2830 cm $^{-1}$). Također, Murakami i suradnici pripisuju široku vrpca u molekuli omeprazola u području 3440 – 3410 cm $^{-1}$ N–H istežanju, a koji u ovom istraživanju nije uočen. Ta prisutnost/odsutnost dotične vrpce može se objasniti vlažnošću uzorka.^{4,5}

U nižem dijelu spektra (ispod 1650 cm^{-1}) uočen je cijeli niz promjena koji se manifestira u nestanku pojedinih vrpca odnosno promjenom intenziteta pojedinih zbog deprotonacije dušikovog atoma na benzimidazolnom dijelu molekule.

U području $1650 - 1500\text{ cm}^{-1}$ uočavamo jasne pomake omeprazolovih vrpca Ramanovog spektra na 1628 cm^{-1} i 1588 cm^{-1} prema nižim vrijednostima (pomak vrpca na 1590 cm^{-1} i 1573 cm^{-1}) u spektru natrijeve soli, a karakteristične su za istežanje C=C veza na piridinu i benzimidazolu, odnosno S-C=N i C=C-N. Promjenu S-C=N objašnjavamo kao posljedicu deprotonacije N1 atoma na imidazolnom dijelu te nastanku vodikovih veza između sumpora na sulfoksidu i dušika N3 na imidazolnom dijelu natrijeve soli s molekulom vode.

Nadalje vrpca koja je u spektru omeprazola opažena na 1512 cm^{-1} (infracrveno) odnosno 1514 cm^{-1} (Raman) karakteristična je za NH deformaciju, a u spektru soli nije prisutna ponovno objašnjavamo sa deprotonacijom dušikovog atoma i shodno tome nestankom spomenute vibracije.

Najintenzivnije vrpce u Ramanovom spektru omeprazola, uz izrazito dominiranje vrpce na 1242 cm^{-1} , nalazimo u području $1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$ karakterističnom za NH+CH deformacije benzimidazolnog dijela molekule, a zbog već više puta spomenutog razloga – deprotonacije N1 atoma dolazi do cijelog niza promjena u tom području u spektru natrijeve soli.

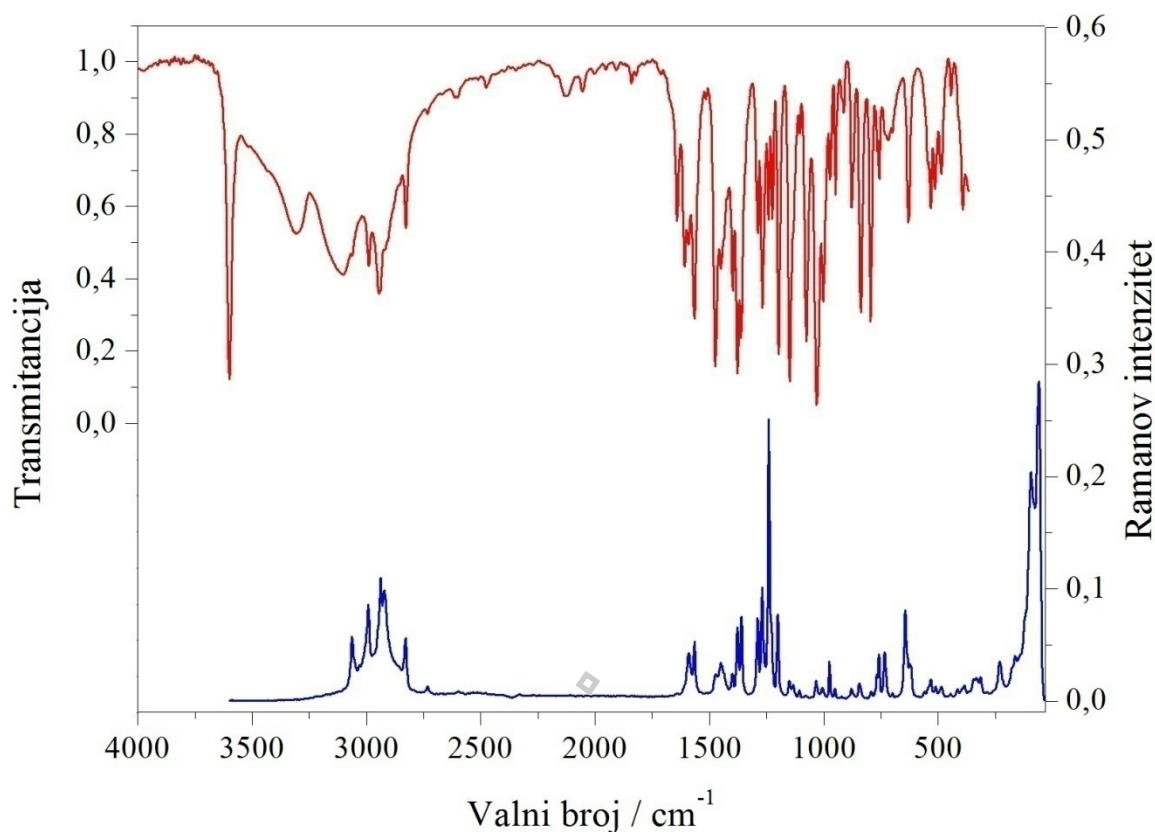
Istežanje sulfoksidne skupine vidljivo kao niskointenzivna vrpca na 1009 cm^{-1} u Ramanovom spektru u molekuli OMP; u spektru natrijeve soli doživljava pomak prema nižim vrijednostima najvjerojatnije zbog nastanka vodikove veze sa molekulom vode. U infracrvenom spektru ta je vrpca mnogo intenzivnija i nalazi se na 1016 cm^{-1} .

Još jedno karakteristično područje vibracija prisutnih u infracrvenim i Ramanovim spektrima opažamo između 660 cm^{-1} i 600 cm^{-1} . To je područje karakteristično za S-C istežanja sulfoksidnog mosta,^{135,136} koji nastankom soli doživljava promjene (vezanje molekule vode vodikovom vezom preko sulfoksidne skupine na jednoj molekuli natrijeve soli omeprazola te s druge strane prisutnost C-O...H interakcije na metilnoj skupini sulfoksidnog mosta druge molekule natrijeve soli omeprazola). U infracrvenom i Ramanovom spektru natrijeve soli uočavamo još i izostanak vrpce na 582 cm^{-1} koja je inače karakteristična za NH deformaciju (klačenje). Ponovno zaključujemo da je izostanak te vibracije posljedica nastanka soli zbog deprotonacije N1 atoma.

U konačnici zaključujemo da je usporedbom infracrvenog i Ramanovog spektra OMP sa OMP-Na vidljiva promjena u vrpcama koja karakterizira nastanak hidratne soli OMP-Na.

4.2.7.3. Asignacija karakterističnih vrpca kalijeve soli omeprazola

Ramanov i infracrveni spektar OMP-K u čvrstom stanju prikazan je na slici 37.



Slika 37. Ramanov i infracrveni spektar kalijeve soli omeprazola.

Kalijeva sol omeprazola je najspecifičnija s obzirom na prisutnost intenzivne i uske vrpce, koja iako je na samom kraju infracrvenog spektra (3600 cm^{-1}) dominira, što je povezano sa fundamentalnim istezanjem za slobodni OH. Molekule vode sudjeluju u formiranju međumolekulskih vodikovih veza, što je vidljivo iz široke vrpce na 3300 cm^{-1} .¹³⁷

Ostale vibracije u području $3100 - 2700\text{ cm}^{-1}$ uključuju CH istezanja specifična za aromate, odnosno benzimidazol, piridin te metoksi skupine ($3000 - 2830\text{ cm}^{-1}$) uz jasne pomake prema nižim vrijednostima u infracrvenim i Ramanovim spektrima soli.

Istezne vibracije karakteristične za aromate opažamo i u području $1650 - 1500\text{ cm}^{-1}$, točnije C=C, S-C=N i C=C-N istezanja piridinu i benzimidazolu. U infracrvenom spektru

omeprazola su to položaji 1627 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} , te 1568 cm^{-1} , a u spektru kalijeve soli nalazimo ih na 1642 cm^{-1} , 1609 cm^{-1} , 1593 cm^{-1} i na 1566 cm^{-1} .

Vibracije specifične baš za NH skupinu u infracrvenom/Raman spektrima vidljive su na $1514/1512\text{ cm}^{-1}$ te na 582 cm^{-1} . Kako nastankom soli dolazi do deprotonacije te skupine, vibracije na prethodno navedenim položajima nisu više prisutne. Zbog istog razloga vibracije sklopljene od NH+CH (BI) jasno se mijenjaju (pomiču prema nižim vrijednostima i drugačijim intenzitetima vrpce) što je najzornije vidljivo u Ramanovim spektrima OMP i OMP-K u području intenzivnih vrpce na $1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$.

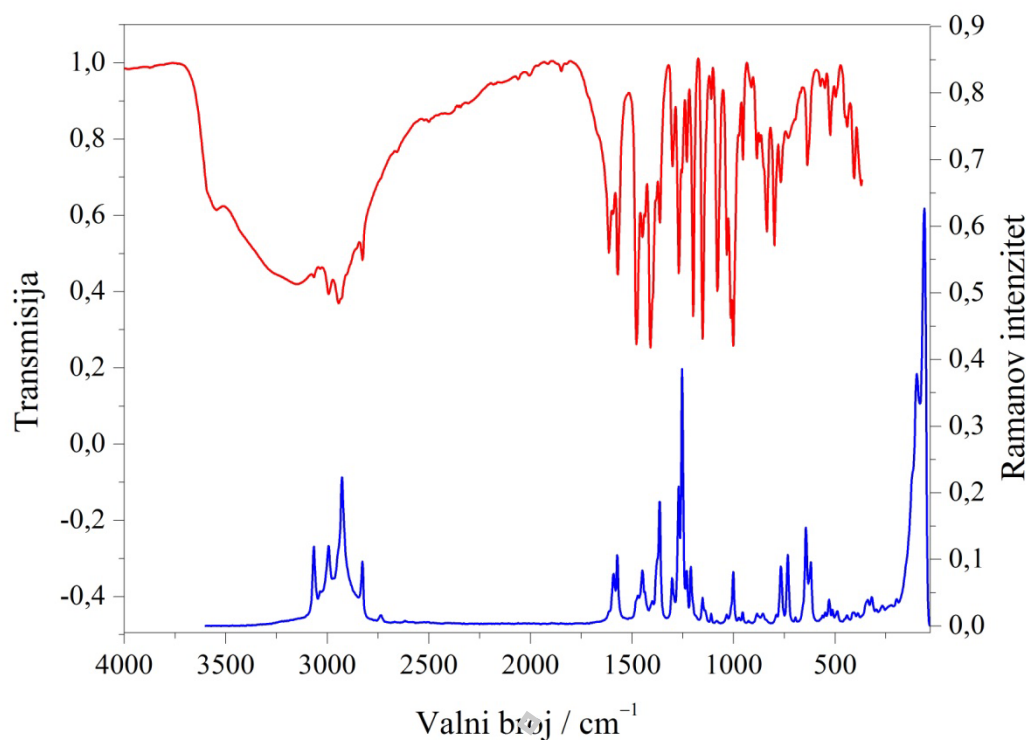
Strukturno gledano, središnji dio molekule omeprazola čini sulfoksidni most $R-SO-CH_2-R$ čije vibracije u spektrima omeprazola i soli opisujemo vrpcoma na $1009/1016\text{ cm}^{-1}$; S=O istežanje; te u području $660 - 600\text{ cm}^{-1}$. U spektru soli su vrpce pomaknute prema nešto nižim vrijednostima jer sulfoksidna skupina najvjerojatnije pridonosi kao proton akceptor vodikovim vezama kod tvorbe kalijeve soli.

U konačnici zaključujemo, da je usporedbom infracrvenog i Ramanovog spektra OMP s OMP-K vidljiva promjena u vrpcoma koja karakterizira nastanak hidratne soli OMP-K.



4.2.7.4. Asignacija karakterističnih vrpca magnezijeve soli omeprazola

Ramanov i infracrveni spektar OMP-Mg u čvrstom stanju prikazan je na slici 38.



Slika 38. Ramanov i infracrveni spektar magnezijeve soli omeprazola.

Budući da magnezijeva sol omeprazola egzistira kao dihidrat uredotočit ćemo se na promjene povezane sa nastankom soli i hidrata. Te promjene primarno pripisujemo deprotonaciji amino skupine na imidazolnom prstenu te nastanku hidratne soli budući da magnezijeva sol egzistira kao diomeprazol dihidrat.

U području $3600 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ uočavamo ponajprije vrlo široku vrpcu u infracrvenom spektru između $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ koja je posljedica nastanka hidratne soli. Osim toga dio od 3200 cm^{-1} do 2700 cm^{-1} sadrži vibracije karakteristične su za istezanja $-CH$ vrpca benzimidazolnog dijela molekule ($3100 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) te piridina i metoksi skupina ($3000 - 2830 \text{ cm}^{-1}$), a koje su uslijed promjena zbog nastanka soli pomaknute prema nižim vrijednostima valnih brojeva. Prisutnost vodikove veze u omeprazolu vidljiva je iz široke apsorpcije $3500 - 2900 \text{ cm}^{-1}$.

U spektralnom području "otiska prsta" ($1800 - 700 \text{ cm}^{-1}$), uočene su višestruke promjene iz kojih zaključujemo o strukturnim promjenama u molekuli soli.

Karakteristična istežanja C=C veza na piridinu i benzimidazolu, odnosno S–C=N i C=C–N karakteriziraju vrpce na 1628 cm^{-1} i 1588 cm^{-1} (Raman), nastankom soli pomiču se prema nižim vrijednostima 1592 cm^{-1} i 1574 cm^{-1} .

Deprotonacijom N1 atoma, ali i nastankom vodikove veze na sulfoksidu objašnjavaju se promjene na S–C=N fragmentu. Jednako tako deprotonacija N1 atoma u spektru soli uzrok je nestanka vrpce na 1512 cm^{-1} (infracrveno) odnosno 1514 cm^{-1} (Raman), budući je u omeprazolu taj položaj specifičan za NH deformaciju. Isti efekti opažen je i u nižem dijelu ramanovog spektra soli izostankom vrpce na 582 cm^{-1} (karakterističan za NH deformaciju – klačenje).

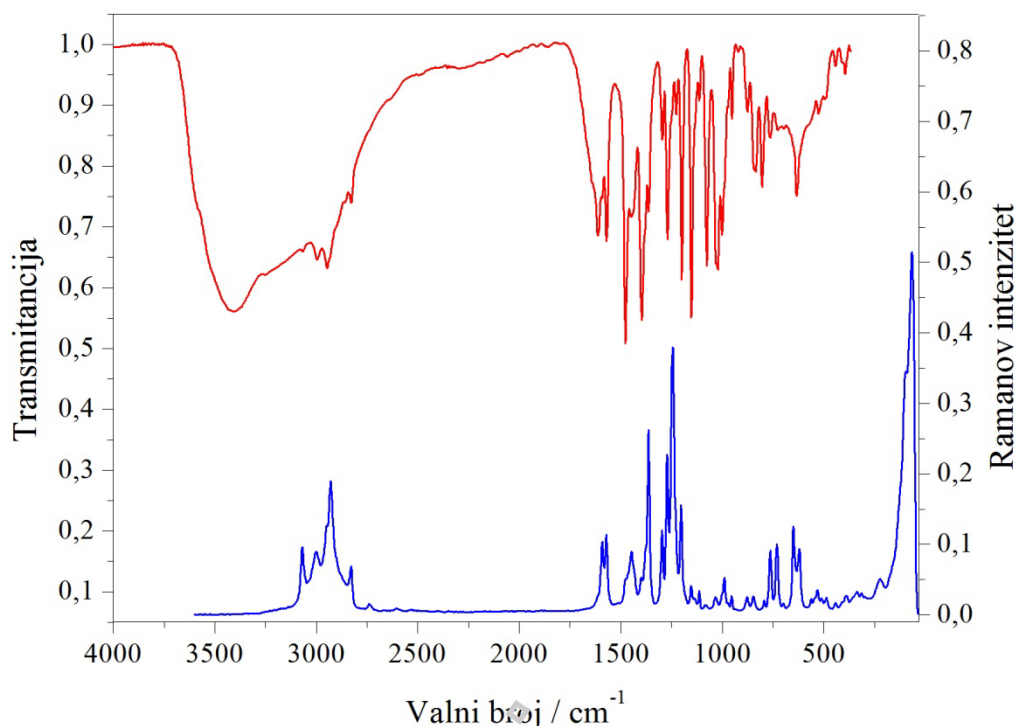
Osim toga deprotonacija je glavni uzročnik promjena u području najintenzivnijih vrpce Ramanovog spektra soli ($1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$; NH+CH deformacije), gdje opažamo promjene koje se manifestiraju kroz pomake prema nižim vrijednostima i promjeni intenziteta vrpce. Najintenzivnija vrpca u Ramanovom spektru soli je na 1253 cm^{-1} .

Pomaknutu vrpcu sulfoksidne skupine u Ramanovom spektru soli opažamo na 1002 cm^{-1} najvjerojatnije zbog sudjelovanja u nastanku vodikove veze. Iako sumpor ima manju elektronegativnost od primjerice kisika ili dušika još je uvijek dovoljno snažan proton akceptor.¹³⁸ Iz istog razloga promjene S-C istežanja sulfoksidnog mosta vidljive u pomacima i promjeni intenziteta vrpce prisutne su u području 660 cm^{-1} i 600 cm^{-1} u infracrvenim i Ramanovim spektrima.

U konačnici zaključujemo da je usporedbom infracrvenog i Ramanovog spektra OMP sa OMP-Mg vidljiva promjena u vrpcama koja karakterizira nastanak hidratne soli OMP-Mg.

4.2.7.5. Asignacija karakterističnih vrpca kalcijeve soli omeprazola

Ramanov i infracrveni spektar OMP-Ca u čvrstom stanju prikazan je na slici 39.



Slika 39. Ramanov i infracrveni spektar kalcijeve soli omeprazola.

Kao i u svim prethodnim primjerima soli, kalcijevu sol karakteriziraju slične promjene u spektru uz pojedine specifičnosti.

OH istezanje vidljivo je kao široka vrpca $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$, kao i promjene u vezama na piridinu, benzimidazolu i metoksi skupinama ($3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$). Promjene na benzimidazolu i piridinu vidljive su i u području $1650 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ specifičnom za aromatske spojeve kroz pomake karakterističnih vrpca.

Bez dvojbe i u ovom primjeru potvrđujemo nastanak soli s obzirom, da i u infracrvenom te Ramanovom spektru izostaju vrpce na $1512/1514 \text{ cm}^{-1}$ te na 582 cm^{-1} , a karakteristične su za NH deformaciju u molekuli omeprazola.

Sulfoksidni most i u ovom primjeru sudjeluje u interakcijama s obzirom na pomake specifičnih vrpca u području $660 - 600 \text{ cm}^{-1}$.

U konačnici zaključujemo da je usporedbom infracrvenog i Ramanovog spektra OMP sa OMP-Ca vidljiva promjena u vrpcama koja karakterizira nastanak hidratne soli OMP-Ca.

Usporedbom Ramanovih spektara omeprazola i pet pripremljenih soli uočene su strukturne sličnosti među solima odnosno jasne promjene položaja i intenziteta vrpce pojedinih veza temeljem kojih možemo zaključiti do kakvih je strukturnih promjena došlo na molekuli prilikom vezanja protona iz skupine alkalijskih odnosno zemnoalkalijskih metala.



4.3. Opis razlika omeprazola i njegovih soli

Usporedbom Ramanovih i infracrvenih spektara omeprazola te njegovih pet pripremljenih soli s obzirom na relativne intenzitete i položaje karakterističnih vrpca dolazi se do zaključaka da je određene spektre moguće bez posebne analize i bez greške pripisati određenoj soli.

Tablice sa asigniranim vrpcama za omeprazol i njegove soli u Ramanovim i infracrvenim spektrima poslužile su kao pomoć pri određivanju specifičnosti pojedinih spektara soli i distinkcije omeprazola od istih (tablica 15 i tablica 16).

Prvenstveno gledajući struktura svih spektara pripremljenih soli je jednaka tako da već samim općenitim pogledom na snimljeni spektar jasno uočava je li analizirana tvar omeprazol ili neka od soli, jer omeprazol sadrži karakteristične vrpce srednjeg do srednje slabijeg intenziteta na 1630 cm^{-1} i 1512 cm^{-1} , kojih u spektrima soli nema na tim položajima. S druge strane svih pet pripremljenih soli karakteriziraju vrpce srednjega intenziteta u području $3006 - 2980\text{ cm}^{-1}$ i na 1364 cm^{-1} . Vrpce najvišeg intenziteta nalaze se u području $1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$ no preklapaju se među sobom tako, da je samo na temelju njih otežana sigurna identifikacija nastanka soli iz omeprazola. Sagledavajući infracrvene spektre dolazi se do jednakog zaključka kao i u slučaju Ramanovih spektara. Omeprazol se jasno selekcionira od spektara soli temeljem vrpca srednjega intenziteta prisutnih na 1510 cm^{-1} i 1311 cm^{-1} , a koje u spektrima soli omeprazola alkalijskih i zemnoalkalijskih metala nema. Soli pak imaju specifičanu vrpcu na 1362 cm^{-1} slabijeg intenziteta, koji ni u kojem pogledu ne može biti pripisan omeprazolu.

Za specifičnu distinkciju svake pojedine soli potrebno je koristiti svojstvo komplementarnosti infracrvene i Ramanove spektroskopije te usporedbu više karakterističnih vrpca za određivanje svake pojedine soli. Tako se obzirom na specifičnu snažnu i usku vrpcu u infracrvenom spektru kalijeve soli na 3600 cm^{-1} (slobodni OH, istezna vibracija) određuje kalijeva sol. U Ramanovom spektru OMP-K prisutna je vrpca snažnog intenziteta na 1241 cm^{-1} koja uz neke vrpce nižeg intenziteta služi za identifikaciju.

OMP-Na pak karakterizira u infracrvenom spektru prvenstveno izrazito intenzivna i za OH istezanje vode u području $3600 - 3100\text{ cm}^{-1}$ vrlo uska vrpca, a u Ramanovom spektru su to primarno, vrpca snažnog intenziteta na 1244 cm^{-1} te vrpca slabijeg srednjeg intenziteta na 623 cm^{-1} .

Za djelomičnu distinkciju OMP-Ca u Ramanovom spektru može ponajprije poslužiti vrpca snažnog intenziteta na 1243 cm^{-1} te vrpca slabijeg intenziteta na 990 cm^{-1} , dok u infracrvenom spektru vrpce na 1395 cm^{-1} i 1023 cm^{-1} selekcioniraju dotičnu sol. Jednako tako OMP-Li najbolje opisuju vrpce vrlo jakog i srednjeg intenziteta u Ramanovom spektru, a koje se nalaze na 2834 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} te 629 cm^{-1} . U infracrvenom spektru to su vrpce srednjeg intenziteta, koje se nalaze na 3408 cm^{-1} , 3233 cm^{-1} , 1387 cm^{-1} i 1067 cm^{-1} .

U infracrvenom spektru OMP-Mg nešto je manje specifičnih vrpce koje bi se dale bez dvojbe pripisati OMP-Mg no uz pomoć karakterističnih spektara eliminacijama zajedničkih vrpce moguće je specificirati OMP-Mg (vrpce: 1408 cm^{-1} , 1302 cm^{-1} te 523 cm^{-1}). Ramanov spektar nudi djelomično prekrivenu vrpce srednjeg intenziteta na 2928 cm^{-1} te vrlo snažnu vrpce na 1254 cm^{-1} . Prisutne su još i dvije visoko specifične vrpce na 1002 cm^{-1} i 646 cm^{-1} no one su slabijeg intenziteta i u smjesi više spojeva slabije vidljive.



Tablica 15: Prikaz i usporedba određenih specifičnih vibracija u infracrvenim spektrima omeprazola i njegovih soli.

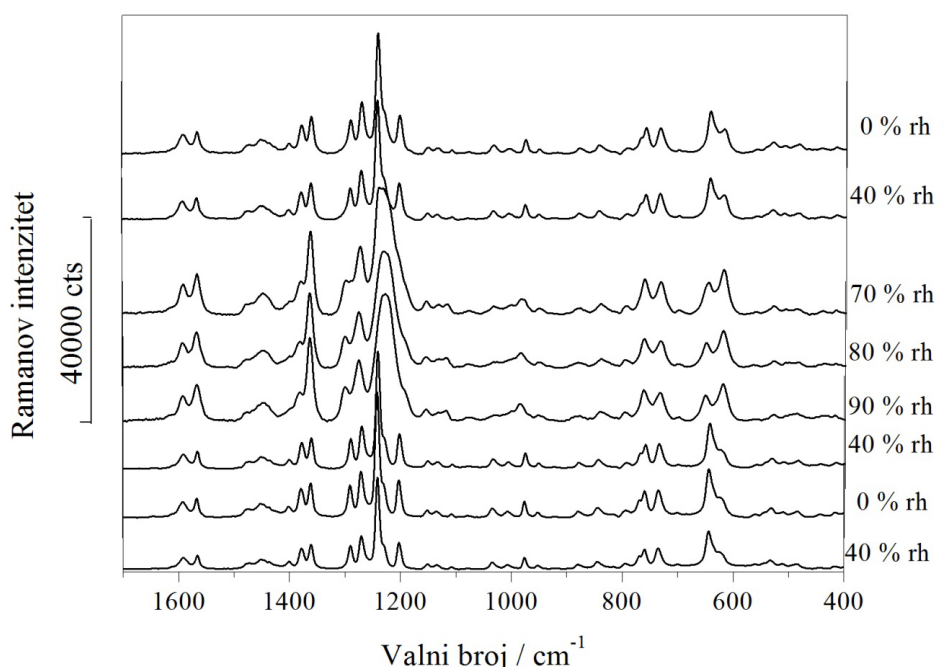
Vibracija	OMP	OMP-Li	OMP-Na	OMP-K	OMP-Mg	OMP-Ca
O-H, istezanje, vodikova veza	/	3416 3241	3434	3316 3109	3543 3156	3406
O-H, istezanje, slobodni	/	/	/	3600	/	/
CH, istezanje (BI, P)	~3070 (pomak)	3063	3063	3062	3063	3063
CH ₃ (M), istezanje	2944	2935	2930	2947	2930	2947
NH, istezanje	~2930	/	/	/	/	/
KIV (P), CH deformacija, CC istezanje (P, BI)	1629	1608	1613	1608	1613	1613
CH +NH deformacija, CC istezanje (BI)	1587	/	/	/	/	/
CC istezanje (BI)	/	1591	1591	1591	1591	1591
KIV (P), CH deformacija, CC istezanje (P, BI)	1568	1571	1570	1566	1571	1571
CH+NH deformacija (BI)	1512	/	/	/	/	/
PIV (P), CH (B), NH deformacija, N3C2 istezanje	1470 (pomak)	1477	1477	1475	1477	1477
NH+CH deformacija (BI), CH deformacija (P)	1410	/	/	/	/	/
CH deformacija (P)	/	1386	1384	1400	1410	1396
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1273	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1270	1270	1270	1270	1270
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1253	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1252	1242	1242	1252	1252
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1231	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1228	1225	1225	1230	1224
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1206	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1200	1200	1200	1200	1200
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1188	/	/	/	/	/
S=O istezanje vibracija	1014	1035	1031	1031	1034	1031
CH deformacija (BI)	967	950	950	950	950	950
S–C istezanje	631	628	633	630	637	634
	621	/	/	/	/	/

Tablica 16: Prikaz i usporedba određenih specifičnih vibracija u Ramanovim spektrima omeprazola i njegovih soli.

Vibracija	OMP	OMP-Li	OMP-Na	OMP-K	OMP-Mg	OMP-Ca
O-H, istezanje, vodikova veza	/	/	/	/	/	/
O-H, istezanje, slobodni	/	/	/	/	/	/
CH, istezanje (BI, P)	3076	3068	3070	3062	3066	3069
	3016	2994	2981	2991	2995	3000
CH ₃ istezanje simetrično	2837	2834	2830	2830	2830	2830
NH, istezanje	prekriveno	/	/	/	/	/
KIV (P), CH deformacija, CC istezanje (P, BI)	1629	1589	1592	1592	1592	1592
CH +NH deformacija, CC istezanje (BI)	1588	1570	1572	1565	1572	1572
CH+NH deformacija (BI)	1514	/	/	/	/	/
PIV (P), CH ₃ deformacija simetrična	1432	1450	1454	1450	1450	1446
NH+C ₄ H+C ₅ H deformacija (BI)	1356	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1364	1364	1364	1364	1364
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1273	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1274	1273	1270	1272	1273
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1255	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1230	1242	1241	1253	1243
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1232	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	1190	1225	1229	1231	1229
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1203	/	/	/	/	/
CH deformacija (BI)	/	/	1206	1201	1211	1203
NH+CH deformacija simetrično (BI)	1190	/	/	/	/	/
S=O istezanje vibracija	1009	992	985	1006	1002	990
CH deformacija (BI)	963	954	954	954	954	954
S–C istezanje	653	650	655	644	644	649
	635	628	623	620	620	620

4.4. Dinamička sorpcija vlage i "in situ" Ramanova spektroskopija

Za potrebe DVS (*dynamic vapour sorbtion* – dinamička sorpcija vlage) analize osmišljeni su eksperimenti u kojim je svaki od 6 uzoraka prvo posušen na 0 % vlage, zatim navlažen do 90 %, te ponovno do kraja posušen. Mjerenja su izvedena pri sobnoj temperaturi, a moguće promjene u uzorcima praćene su mjerenjem mase i snimanjem Ramanovih spektara. Omeprazol u cijelom ciklusu nije pokazao promjena u masi ili strukturi spektra, litijeva sol omeprazola pokazuje promjenu u masi i spektru na 0 % vlage (početak i kraj), natrijeva sol omeprazola pokazuje promjenu u masi i spektru na 0 % vlage (početak i kraj), kalijeva sol omeprazola pokazuje promjenu u masi i spektru na 90 % vlage i u tom obliku ostaje do 70 % vlage, a zatim se vraća u početni oblik do konačne točke sušenja (0 % vlage) – slika 40, magnezijeva sol omeprazola pokazuje promjenu u masi i spektru na 0 % vlage (početak i kraj), a kalcijeva sol omeprazola pokazuje promjenu u masi i spektru na 0 % vlage (početak i kraj). Rezultati pokazuju da je omeprazol stabilan (nehigroskopan) u cijelom ciklusu vlaženja i sušenja, dok su sve pripravljene soli pokazale osjetljivost na promjenu vlage (potvrđeno promjenom mase i strukture Ramanovih spektara).



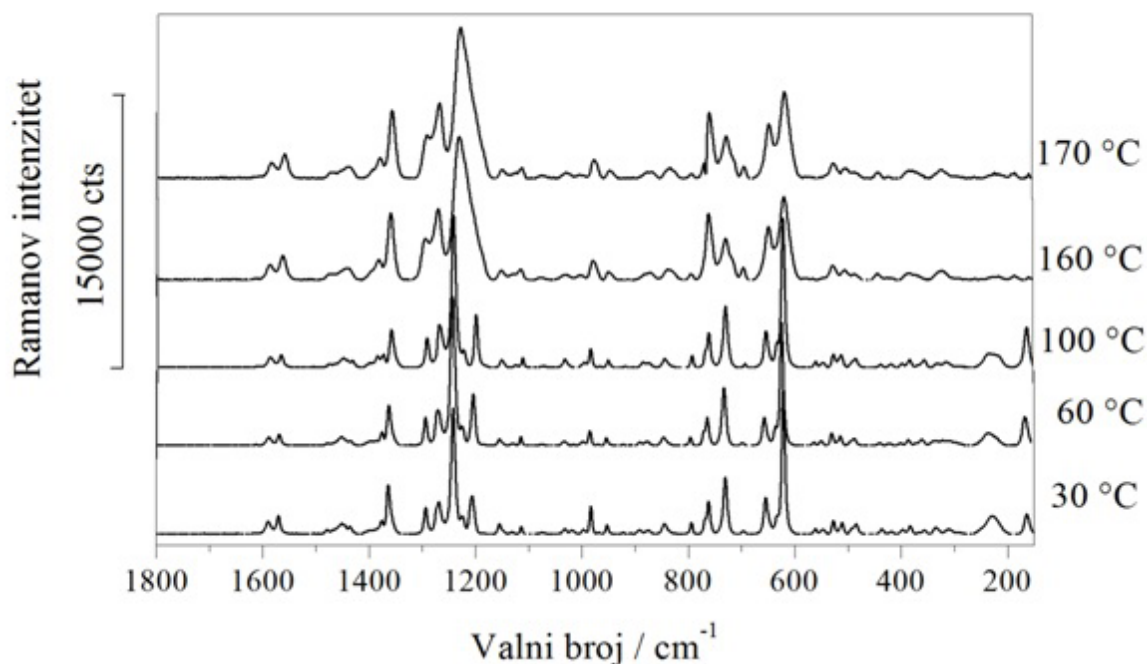
Slika 40. Prikaz Ramanovih spektara kalijeve soli omeprazola snimljenih u pokusu gravimetrijskih mjerenja (promjena vlage). Strelica na desnoj strani pokazuje smjer gibanja ciklusa.

Na slici 40 prikazana je apsolutna skala koja opisuje razlike u Ramanovom intenzitetu (označeno područje Ramanovog intenziteta u rasponu 40000 cts – krivulje su razmaknute zbog preglednosti). Na slici je vidljivo da do promjena u spektrima kalijeve soli omeprazola dolazi tek pri 90 % vlage što u korelaciji sa prethodno obavljenim termičkim mjerenjima (TGA i DSC) dovodi do zaključka da nastaje sol u hidratnom obliku. Najvidljivije promjene su prisutne u područjima između $1300 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ i $800 - 600 \text{ cm}^{-1}$ koje karakteriziraju vibracije na benzimidazolnom prstenu u blizini deprotoniranog dušikovog atoma zaslužnog za nastanak soli.

Promjene u prethodno opisanim područjima pri višim postocima vlage (početak pri 90 %), a prije svega na visokointenzitetnoj vrpici na 1230 cm^{-1} te vrpici srednjeg intenziteta na 620 cm^{-1} , manifestiraju se proširenjem istih i pomakom prema nižim valnim brojevima, što je karakteristično za početak urušavanja kristalne strukture.

4.5. Temperaturno ovisna analiza i "in situ" Ramanova spektroskopija

Za potrebe temperaturno ovisne (hot-stage) analize osmišljeni su eksperimenti u kojim je svaki od 6 uzoraka zagrijavan od $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom čega je praćena njegova stabilnost odnosno moguće promjene u Ramanovim spektrima. Tijekom temperaturno ovisne (hot-stage) analize u čistom omeprazolu nije uočen niti jedan fazni prijelaz već je pri $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ uslijedilo taljenje uzorka, dok je pri svih 5 sintetiziranih soli uočen barem jedan fazni prijelaz. Točnije u OMP-Li uočen je fazni prijelaz u području od $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a taljenje pri $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$. U OMP-Ca uočena je prva promjena faza u području od $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$, prijelaz u treću fazu u području od $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a taljenje pri $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$. U OMP-Mg uočen je prijelaz faza u području od $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, te vrlo brzo potom i taljenje pri $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$. U OMP-Na prva je promjena faze uočena već u području od $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, prijelaz u treću fazu u području oko $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a taljenje započinje pri $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (slika 41). U OMP-K uočen je prijelaz faza u području od $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$, te vrlo brzo potom i taljenje pri $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Temeljem obavljenih mjerenja zaključeno je, da je čista tvar OMP najstabilnija jer nije podložna faznim promjenama tijekom zagrijavanja dok su sve soli pokazale veću ili manju stabilnost (natrijeva i kalcijeva po dva fazna prijelaza prije temperature taljenja, a magnezijeva, litijeva i kalijeva sol po jedan fazni prijelaz).



Slika 41. Prikaz Ramanovih spektara natrijeve soli omeprazola snimljenih u pokusu termičkih mjerenja (promjena temperature).

Na slici 41 prikazana je apsolutna skala koja opisuje razlike u Ramanovom intenzitetu (označeno područje Ramanovog intenziteta u rasponu 15000 cts – krivulje su razmaknute zbog preglednosti). Na slici je vidljivo da do promjena u spektrima natrijeve soli dolazi u temperaturnom području 40 °C do 60 °C, na 160 °C te na 180 °C, što je u relativnoj korelaciji s prethodno obavljenim termičkim mjerenjima (TGA i DSC) i dovodi do zaključka da se možda mijenja hidratni oblik natrijeve soli omeprazola. Najvidljivije promjene su prisutne u područjima između 1300–1200 cm⁻¹ i 800–600 cm⁻¹ koje karakteriziraju vibracije na benzimidazolnom prstenu u blizini deprotoniranog dušikovog atoma zaslužnog za nastanak soli. Promjene u prethodno opisanim područjima pri višim temperaturama (od 160 °C na više), a prije svega na visokointenzitetnoj vrpci na 1230 cm⁻¹ te vrpci srednjeg intenziteta na 620 cm⁻¹, manifestiraju se proširenjem istih i pomakom prema nižim valnim brojevima, što je karakteristično za početak urušavanja kristalne strukture.

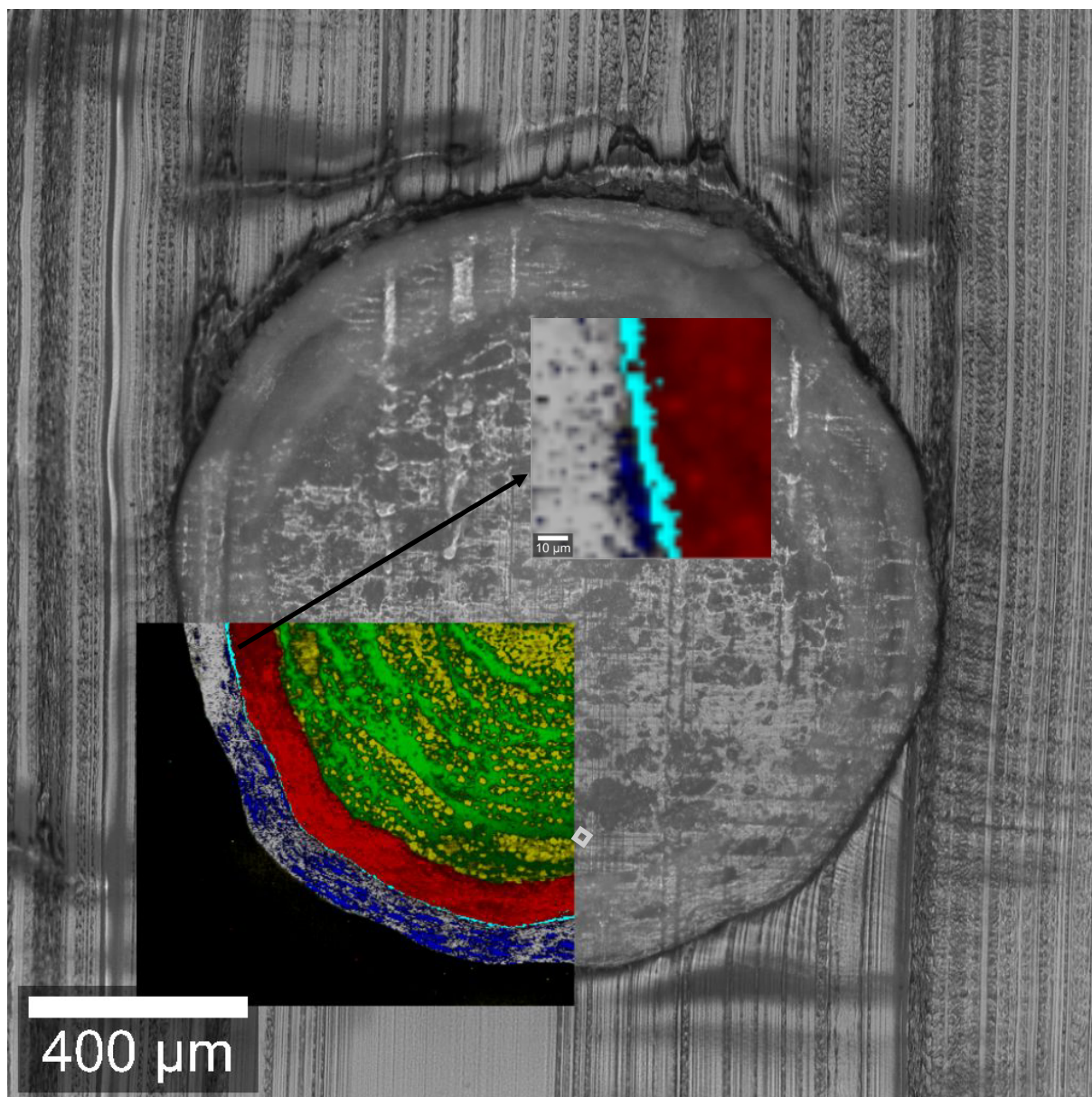
4.6. Ramanova mikrospektroskopija–mapiranje

U konačnoj fazi istraživanja mapiran je komercijalni uzorak kapsula omeprazola, kako bi se pokazao sastav i raspodjela pojedinih komponenata te ujedno ispitalo postoji li mogućnost presoljavanja između aktivne tvari omeprazola i kiselo/baznog stabilizatora bezvodnog natijevog hidrogenfosfata, odnosno postoji li mogućnost nastanka natijeve soli omeprazola. Uzorci su bili unutar roka valjanosti te propisno pohranjeni u blistrima te na sobnim uvjetima temperature i vlage.

4.6.1. Mapiranje komercijalnog uzorka omeprazola–prerez pelete

Napravljeni su prerezi peleta i mapirano je područje na jednoj odabranoj peleti veličine $800 \times 800 \mu\text{m}$, sa korakom $2 \mu\text{m}$ (ostali uvjeti snimanja su opisani u poglavlju 3.4.). Po završetku analize obrađeni su karakteristični spektri integracijom ispod površine specifičnih vrpca svih ulaznih komponenata, a pripadajuće grafičke reprezentacije obrađenih vidljivih komponenata nalaze se na slici 42. Tako je za saharozu integrirana karakteristična vrpca srednje jakog intenziteta na 850 cm^{-1} , a za škrob srednjeg intenziteta na 482 cm^{-1} . Nadalje omeprazolu i kiselo/baznom stabilizatoru (NaH_2PO_4) integrirane su vrpce na 1190 cm^{-1} (snažan intenzitet) i 940 cm^{-1} (snažan intenzitet). Vrpca izrazito snažnog intenziteta na 876 cm^{-1} pripada manitolu, dok su tri vrpce na 1451 cm^{-1} , 676 cm^{-1} i 637 cm^{-1} redom pripisane Eudragitu, talku i titanijevom dioksidu. Dodatna okolnost koja je olakšala integraciju i identifikaciju pojedinih karakterističnih vrpca je striktna podijeljenost komponenata po slojevima tako da se samo dio vrpca pojedinih komponenata preklapao.

S obzirom na izrazito jak Ramanov signal omeprazola te kvantitativno gledano njegovo prevladavanje u prvom sloju, kiselo/bazni stabilizator opažen je samo na granici detekcije te grafički nije reprezentiran. Jasna potvrda prisutnosti stabilizatora u omeprazolovom sloju potvrđena je SEM – EDS analizom, odnosno dokazana je prisutnost elemenata natrija i fosfora koji su sastavni dio stabilizatora.



Slika 42. Grafički prikaz raspodjele pojedinih komponenata u komercijalnom uzorku kapsula omeprazola. Saharoza (zeleno), škrob (žuto), omeprazol (crveno), manitol (svijetlo plavo), Eudragit (sivo), titanijev dioksid (tamno plavo).

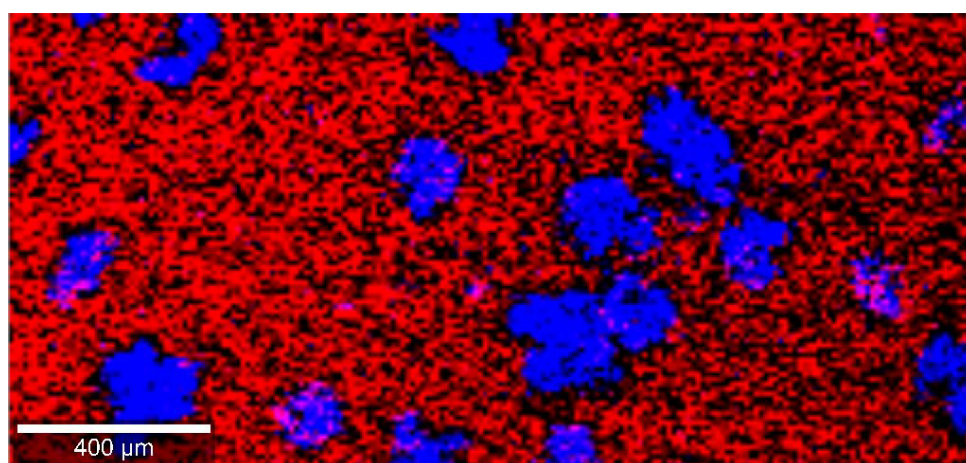
Iz slike 42 jasno je vidljivo da se kapsula omeprazola sastoji od šećerne jezgre (saharoza i škrob) te da nakon toga slijede pojedini slojevi koji su naštrcavani jedan za drugim (tzv. proces oblaganja peleta – *Fluid bed*). Prvi sloj nakon jezgre čini omeprazol sa kiselobaznim stabilizatorom i debljine je približno 70 µm, zatim slijedi tanak sloj manitola debljine do 5 µm, te na koncu zaštitni (gastrorezistentni) sloj koji se sastoji od kopolimera metakrilne kiseline (Eudragit), talka i titanijevog dioksida, a debljine je 75 – 80 µm.

Posebno je detaljno analizirano područje na granici slojeva aktivne komponente (omeprazol), međusloja (manitol) i vanjskog zaštitnog sloja s jedne strane, te šećerne jezgre s druge strane kako bi se potvrdila/opovrgla teza o presoljavanju. Podrobnim pregledom snimljenih spektara iz eksperimenta mapiranja, te posebice vrpce karakteristične za natrijevu sol omeprazola (623 cm^{-1}), ista nije pronađena te je zaključeno, da je sustav (peleta, odnosno kapsula) stabilan pod pravilnim uvjetima skladištenja, no s obzirom na prisutnost kiselo/baznog stabilizatora u sloju zajedno s omeprazolom nije isključena mogućnost reakcije pod nekim stresnim uvjetima temperature i/ili vlage, što je dobar temelj za neka buduća istraživanja.

4.6.2. Zasoljavanje česticama

Kako bi se ipak pokazalo kako izgleda prisutnost natrijeve soli omeprazola simulirani su dvokomponentni sustavi sastavljeni od *R*-omeprazola i natrijeve soli omeprazola prethodno pripravljene tijekom istraživanja.

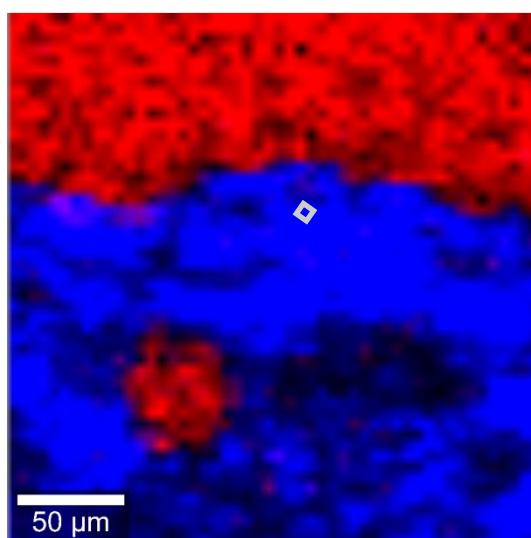
Prvi pokus uključivao je stiskanje KBr tablete omeprazola uz pritisak od 3 tone, kojoj su po površini fino raspršene čestice natrijeve soli omeprazola. Po pripremi, nasumično je izabrano područje veličine $2000 \times 900\ \mu\text{m}$, sa korakom $10\ \mu\text{m}$ (uvjeti snimanja opisani su u poglavlju 3.4.). Po završetku analize obrađeni su karakteristični spektri integracijom ispod površine specifičnih vrpca omeprazola i OMP-Na (vrpca na 1190 cm^{-1} karakteristična za omeprazol te vrpca na 623 cm^{-1} karakteristična za OMP-Na). Grafički prikaz obrađenih komponenata nalazi se na slici 43.



Slika 43. Prikaz raspodjele čestica OMP-Na (plava boja) u *R*-omeprazolu (crvena boja).

4.6.3. Presoljavanje na granici faza

U drugom pokusu simuliran je nastanak natrijeve soli omeprazola, na granici faza omeprazola i kiselo/baznog stabilizatora, koji je moguć u nekim peletama. Pripravljena je KBr tableta omeprazola i natrijeve soli omeprazola u omjeru 1 : 1, te je potom aksijalno prerezana na pola. Po pripravi, nasumično je izabrano područje na granici faza veličine $250 \times 250 \mu\text{m}$, sa korakom $5 \mu\text{m}$. (uvjeti snimanja opisani u poglavlju 3.4.). Po završetku analize obrađeni su karakteristični spektri integracijom ispod površine specifičnih vrpca omeprazola i OMP-Na na jednak način kao u prethodnom pokusu (vrpca na 1190 cm^{-1} karakteristična za omeprazol te vrpca na 623 cm^{-1} karakteristična za OMP-Na). Grafički prikaz obrađenih komponenta nalazi se na slici 44.



Slika 44. Prikaz granice slojeva OMP-Na (plava boja) i omeprazola (crvena boja).

Jednako kao i u pokusu zasoljavanja česticama OMP-Na (poglavlje 4.6.2.) jasno se može odrediti granica faza OMP/OMP-Na, te je zaključeno kako bi moguć nastanak OMP-Na bio jasno vidljiv i u komercijalnom uzorku kada bi bio prisutan.

§ 5. ZAKLJUČAK

Pripravljeno je i okarakterizirano različitim analitičkim tehnikama pet soli omeprazola i sam polazni spoj omeprazol.

Tehnike NMR i XRPD korištene su za potvrdu nastanka soli omeprazola analizom spektara/difraktograma te usporedbom sa patentnim podacima. Usporedbom ^1H MAS NMR spektara pripremljenih soli uočen je izostanak signala na δ 13,5 ppm, a za koji je u omeprazolu određeno da pripada protonu u vodikovoj vezi, a to se odnosi na proton na dušiku N1.

Usporedbom protonskih ^{13}C CP-MAS NMR spektara čvrstih uzoraka omeprazola i svih pripremljenih soli u OMP je uočen signal na δ 92,0 ppm koji pripada ugljikovom atomu C7, a koji je u uzorcima soli pomaknut prema vrijednosti δ 98,0 ppm, što znači da je došlo do određenih promjena u blizini atoma C7. Snimljeni difraktogrami praha uspješno su uspoređeni sa literaturnim podacima u slučaju OMP-Na, OMP-Mg i OMP-Ca, dok XRPD OMP-K i OMP-Li predstavljaju prvi takav opis. U končnici opisane analize su potvrdile da su uspješno pripravljene soli: OMP-Na, OMP-K, OMP-Li, OMP-Mg i OMP-Ca.

Za fizikalnu karakterizaciju pripravljenih soli i omeprazola korištene su termičke tehnike DSC i TGA. Uočeni su, uspoređujući ove tehnike generalno skladni fazni prijelazi pri svim solima osim u omeprazolu koji je tijekom cijelog ciklusa ostao stabilan. Za detaljnije razumijevanje rezultata termičkih analiza izvedena su i mjerenja DVS – Raman i *hot-stage* – Raman, a rezultati su bili generalno u suglasju sa DSC i TGA analizama uz zaključak, da dolazi do nastajanja hidratnih oblika pripravljenih soli.

Spektroskopske tehnike infracrvena i Ramanova spektroskopija iskorištene su za asignaciju karakterističnih vrpca u omeprazolu i pripravljenim solima, kako bi se strukturno okarakterizirale promjene do kojih dolazi na molekuli prilikom nastajanja soli. Tako je potvrđeno, da do nastanka svih soli dolazi odcjepljivanjem vodikovog kationa iz N–H veze na benzimidazolnom prstenu (izostanak vrpca na 1514 i 582 cm^{-1} u Ramanovim spektrima soli), a i delokalizacije elektrona na sulfoksidnom mostu (vrpce na 1009/1016 cm^{-1} te između 660 – 600 cm^{-1}) i benzimidazolnom prstenu (prije svega imidazolni dio) što je najvidljivije vidljivo analizom karakterističnih vrpca dotičnih skupina (vrpce u području 1300 – 1100 cm^{-1} u Ramanovim i infracrvenim spektrima soli).

Izvedeno je i mikrospektroskopsko mjerenje (mapiranje) pelete, kao i pripremljenih dvokomponentnih tableta omeprazola (Ramanova mikrospektroskopija), te je analizom spektara snimljenih na peleti prije svega kvalitativno okarakteriziran komercijalni uzorak, a određene su i debljine pojedinačnih slojeva. Prisutnost kiselo/baznih stabilizatora je potvrđena u sloju aktivne tvari, no prisutnost natrijeve soli omeprazola nije potvrđena u analiziranom uzorku te je zaključeno, da uzorak kapsula skladišten pod propisnim uvjetima vlage i temperature ne mijenja stabilnost.

Analizom snimljenih spektara na dvokomponentnim tabletama integriranjem karakterističnih vrpca (1190 cm^{-1} za omeprazol i 623 cm^{-1} za OMP-Na) potvrđena je prisutnost natrijeve soli omeprazola u tableti, a okarakterizirani su još i oblik te veličina čestica iste.



§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

as	antisimetrična vibracija
br	široka vrpca
δ	deformacijska vibracija
γ	torzija
IC	infracrveno zračenje
ip	u ravnini
m	srednji intenzitet
v	istezna vibracija
NIR	blisko infracrveno zračenje
OMP	omeprazol
OMP-Ca	kalcijeva sol omeprazola
OMP-K	kalijeva sol omeprazola
OMP-Li	litijeva sol omeprazola
OMP-Mg	magnezijeva sol omeprazola
OMP-Na	natrijeva sol omeprazola
oop	izvan ravnine
s	simetrična vibracija
sc	striženje
str	jak intenzitet
tw	uvijanje
UV	ultraljubičasto zračenje
VIS	vidljivo zračenje
vs	vrlo jak intenzitet
vw	vrlo slab intenzitet
w	slab intenzitet
wg	klaćenje

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Patent: US 2006/0160783 A1, Novel Omeprazole form sand related methods.
2. T. Lind, C. Cederberg, G. Ekenved, U. Haglund i L. Olbe, *Gut* **24** (1983) 270–276.
3. A. A. Al-Badr, Omeprazole, Comprehensive Profile, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Harry G. Brttain, Editor, 2008.
4. S. Mohan, N. Sundaraganesan i J. Mink, *Spectrochimica Acta* **47A** (1991) 1111–1115.
5. F. S. Murakami, K. L. Lang, C. Mendes, A. P. Cruz, M. A. S. Carvalho Filho i M. A.S. Silva, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49** (2009) 72–80.
6. M. J. Kendall, *Aliment Pharmacol Ther.* **17** (2003) 1–4.
7. C. E. Malen i B. H. Danree *J. Med. Chem.* **14** (1971) 244–246.
8. G. Sundell, S. E. Sjostrand i L. Olbe, *Acta Pharm. Tox. Suppl.* **4** (1977) 77.
9. P. Lindberg, A. Brändström, B. Wallmark, H. Mattsson, L. Rikner i K. J. Hoffmann, *Med. Res. Rev.* **10** (1990) 1–54.
10. J. G. Forte i H. C. Lee, *Gastroenterology* **73** (1977) 921–926.
11. G. Sachs, H. Chang, E. Rabon, R. Schackman, H. M. Sarau i G. Saccamani, *Gastroenterology* **73** (1977) 931–940.
12. E. Fellenius, T. Berglinth, G. Sachs, L. Olbe, B. Elander, S. E. Sjöstrand i B. Wallmark, *Nature* **290** (1981) 159–161.
13. B. Wallmark, G. Sachs, S. Mardh i E. Fellenius, *Biochem. Biophys. Acta* **728**, (1983) 31–38.
14. P. Miner Jr., P. O. Katz, Y. Chen i M. Sostek, *Am J Gastroenterol.* **12** (2003), 2616–2620.
15. N. J. Bell, D. Burget, C. W. Howden, J. Wilkinson i R. H. Hunt, *Digestion* **51** (1992) 59–67.
16. R. H. Holloway, J. Dent, F. Narielvala i A. M. Mackinnon, *Gut* **38** (1996) 649–654.
17. T. C. B. Dehn, H. A. Shepherd, D. Colin-Jones, M. G. W. Kettlewell i N. J. H. Carroll, *Gut* **31** (1990) 509–513.
18. J. Q. Huang i R. H. Hunt, *Yale J. Biol. Med.* **72** (1999) 181–194.
19. R. N. Zheng, *World J. Gastroenterol.* **15** (2009) 990–995.
20. G. Ghillebert, A. M. Demeyere, J. Janssens i G. Vantrappen, *Dig. Dis. Sci.* **40** (1995) 1317–1324.
21. R. K. Mittal, R. H. Holloway, R. Penagini, L. A. Blackshaw i J. Dent, *Gastroenterology* **109** (1995) 601–610.
22. S. J. Edwards, T. Lind i L. Lundell, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **15** (2001) 1729–36.

23. L. Olbe, E. Carlsson i P. Lindberg, *Nat. Rev. Drug Discover* **2** (2003) 132–139.
24. www.nps.org.au/medicines/digestive-system/indigestion-reflux-and-stomach-ulcer-medicines/heartburn-and-reflux-medicines/for-health-professionals/pharmacology (preuzeto 12. lipnja 2015.)
25. P. Lindberg, P. Nordberg, T. Alminger, A. Brandstrom i B. Wallmark, *J. Med. Chem.* **29** (1986) 1327–1329.
26. M. Besancon, J. M. Shin, F. Mercier, K. Munson, M. Miller, S. Hersey i G. Sachs, *Biochemistry* **32** (1993) 2345–2355.
27. Patent: US 5,470,983, Preparation of omeprazole and lansoprazole, and intermediates useful therein.
28. H. Cotton, T. Elebring, M. Larsson, L. Li, H. Sorensen i S. von Unge, *Tetrahedron: Asymmetry* **11** (2000) 3819–3825.
29. Aktiebolag Haessle. Jpn, Kokai Tokkyo Koho JP 62–72666 (Refs. 24 and 25. In: Rao et al.; Ref. 20).
30. Patent: US 6043371, Organic compound synthesis.
31. Patent: US 6,245,913 B1, Synthetic procedure for 5–methoxy–2–[(4–methoxy–3,5–dimethyl–2–pyridinyl)–methylthio]–1H–benzimidazole hydrochloride and its conversion to omeprazole.
32. X. L. Liu, *Shanxi Med. Univ. J.* **33** (2002) 330–332.
33. http://www.stn-international.de/archive/presentations/online_information03/psspa.pdf.
34. G. W. Rao, W. X. Hu i Z. Y. Yang, *Chin. J. Synth. Chem.* **10** (2002) 297–301.
35. Patent: US 4,620,008, Processes for the preparation of omeprazole and intermediates therefore.
36. R. B. Silverman, *Chapter 3: Receptors, The organic chemistry of drug design and drug action*, 2. izd., Academic Press, 2004, 148.
37. R. M. Claramunt, C. López i J. Elguero, *ARKIVOC* (2006) 5–11.
38. H. Ohishi, Y. In, T. Ishida, M. Inoue, F. Sato i M. Okitsu, *Acta Cryst.* **C45** (1989) 1921–1923.
39. V. F. Roche, *Am. J. Pharm. Educ.* **70** (2006), article 101, 1–11.
40. M. Mathew, V. Das Gupta i R. E. Bailey, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **21** (1995) 965–971.
41. A. G. Davidson i A. McCallum, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **22** (1996) 1173–1185.
42. A. Riedel, C. S. Leopold, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **31** (2005) 151–160.
43. F. S. Murakami, A. P. Cruz, R. N. Pereira, B. R. Valente i M. A. S. Silva, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **30** (2007) 113–121.
44. S. Martindale, *The Complete Drug Reference*, 33. izd., Pharmaceutical Press, London, Thomson Micromedex, Greenwood Village, 2002.

45. M. Dellagrecia, M. R. Iesce, L. Previtiera, M. Rubino, F. Temussi i M. Brigante, *Chemosphere* **63** (2006) 1087–1093.
46. British Pharmacopoeia, The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, CD-ROM version 11,0, London, 2007.
47. Patent: US 6,207,188 B1, Omeprazole sodium salt.
48. Patent: US 2004/0224987, Crystalline form C of omeprazole sodium and the related process of its preparation, a crystalline form D of omeprazole sodium and the related process of its preparation, and a process for preparation of crystalline form a of omeprazole sodium.
49. Patent: US 2009/0221646, Crystalline solvate of omeprazole sodium.
50. T. Ozawa, *J. Therm. Anal. Calorim.* **60** (2000) 887–894.
51. T. Ozawa, *Bull. Chem. Soc.* **38** (1965) 1881–1886.
52. J. Deng, Y. Chi, F. Fu, X. Cui, K. Yu, J. Zhu i Y. Jiang, *Tetrahedron-Asymmetry* **11** (2000) 1729–1732.
53. N. Markovic, S. Agntovic–Kustrin, B. Glass i C. A. Prestidge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (2006) 25–31.
54. S. Budavari (ur.), *The Merck index*, 12. izd., Merck Res. lab., New Jersey, 1996.
55. Patent: EP 1 018 340 A9: Inclusion aminoacid salts compounds of benzimidazole derivatives with cyclodextrins, their preparation and pharmaceutical formulations containing them.
56. Patent: US 6,048,981, Magnesium omeprazole and process for its preparation.
57. Patent: US 6,124,464, Process for the preparation of a magnesium salt of a substituted sulfinyl heterocycle.
58. Patent: US 6,713,495 B1, Magnesium omeprazole.
59. Patent: US 4,738,974, Base addition salts of omeprazole.
60. Patent: US 5,900,424, Omeprazole magnesium salt form.
61. Patent: O 124 495 B1, Omeprazole salts.
62. H. Günzler i H.-U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, prijevod 4. izd., Školska knjiga, Zagreb, 2006.
63. L. Bellot–Gurlet, S. Pagès–Camagna i C. Coupry, *J. Raman Spectrosc.* **37** (2006) 962–965.
64. M. R. Witkowski, *Am. Pharm. Rev.* **8** (2005) 56–62.
65. M. de Veij, P. Vandenabeele, T. De Beer, J. P. Remon i L. Moens, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009) 297–307.
66. A. M. Herrero, P. Carmona, F. Jiménez–Colmenero i C. Ruíz–Capillas, Applications of Vibrational Spectroscopy to Study Protein Structural Changes in Muscle and Meat Batter Systems, u J.

M. Chalmers, P. R. Griffiths (ur.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 1. izd., John Wiley & Sons, Chichester, 2010.

67. K. C. Gordon i C. M. McGoverin, *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 151–162.

68. D. E. Bugay, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48** (2001) 43–65.

69. Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus i M. Ulmschneider, *Anal. Chim. Acta* **535** (2005) 79–87.

70. L. S. Taylor i F. W. Langkilde, *J. Pharm. Sci.* **89** (2000) 1342–1353.

71. S. Huffman i L. Breckenridge, *Am. Pharm. Rev.* **12** (2009) 66–69.

72. M. D. Morris i W. F. Finney, *Spectroscopy* **18** (2004) 155–159.

73. M. Skenderovska, B. Minčeva–Šukarova i L. Andreeva, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **27** (2008) 9–17.

74. M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito i A. Jorito, *Physics Reports*, (2004).

75. J. Yamamoto i H. Kagi, *Eur. J. Mineral.* **20** (2008) 529–535.

76. S. Sasic i L. Zhang, *Pharmaceutical Applications of Raman Chemical Imaging*, u S. Sasic i Y. Ozaki (ur.), *Raman, Infrared, and Near-Infrared Chemical Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester, 2010, 169–185.

77. N. Furuyama, S. Hasegawa, T. Hamaura, S. Yada, H. Nakagami, E. Yonemochi i K. Terada, *Int. J. Pharm.* **361** (2008) 12–18.

78. E. Widjaja i R. K. Hong Seah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2008) 274–281.

79. D. Clark i S. Sasic, *Cytometry Part A* **69A** (2006) 815 – 824.

80. M. Rapacciuolo, C. de Rosa, G. Guerra, G. Mensitieri, A. Apicella i M. A. Del Nobile, *J. Mater. Sci. Lett.* **10** (1991) 1084–1087.

81. V. Wu, T. Rades i D. J. Saville, *Pharmazie* **55** (2000) 508–512.

82. J. H. Kirk, S. E. Dann i C. G. Blatchford, *Int. J. Pharm.* **334** (2007) 103–114.

83. <http://www.law360.com/articles/13867/teva-to-pay-up-to-70m-to-settle-with-pfizer> (preuzeto 25.svibnja 2015.).

84. M. Mosharraf i C. Nyström, *Int. J. Pharm.* **122** (1995) 35–47.

85. F. Podczeck i Y. Mia, *Int. J. Pharm.* **144** (1996) 187–194.

86. R. L. Frost i M. L. Weier, *J. Raman Spectrosc.* **35** (2004) 299–307.

87. R. L. Frost i S. Bahfenne, *J. Therm. Anal. Calorim.* **100** (2010) 89–94.

88. C. J. Strachan, D. Pratiwi, K. C. Gordon i T. Rades, *J. Raman Spectrosc.* **35** (2004) 347–352.

89. M. Szelagiewicz, C. Marcolli, S. Cianferani, A. P. Hard, A. Vit, A. Burkhard, M. von Raumer, V. Ch. Hofmeier, A. Zilian, E. Francotte i R. Schenker, *J. Therm. Anal. Calorim.* **57** (1999) 23–43.

90. M. P. Feth, N. Nagel, B. Baumgartner, M. Bröckelmann, D. Rigal, B. Otto, M. Spitzenberg, M. Schulz, B. Becker, F. Fischer i C. Petzoldt, *Eur. J. Pharm. Sci.* **42** (2011) 116–129.
91. U. J. Griesser, M. E. Auer i A. Burger, *Sci. Pharm.* **67** (1999) 319–330.
92. D. A. McKeown, *Am. Mineral.* **90** (2005) 1506–1517.
93. M. P. Feth, J. Volz, U. Hess, E. Sturm i R. P. Hummel, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 3765–3780.
94. A. Burger, J. O. Henck, S. Hetz, J. M. Rollinger, A. A. Weissnicht i H. Stöttner, *J. Pharm. Sci.* **89** (2000) 457–468.
95. J. Tao, K. J. Jones i L. Yu, *Cryst. Growth Des.* **7** (2007) 2410–2414.
96. R. L. Frost i M. L. Weier, *J. Raman Spectrosc.* **35** (2004) 299–307.
97. R. L. Frost i S. Bahfenne, *J. Therm. Anal. Calorim.* **100** (2010) 89–94.
98. R. L. Hassel i N. D. Hesse, *Investigation of Pharmaceutical Stability Using Dynamic Vapor Sorption Analysis*, preuzeto sa stranice TA Instruments, <http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TA337%20Investigation%20of%20Pharmaceutical%20Stability%20Using%20DVS.pdf> (preuzeto 25.svibnja 2015.)
99. J. Sun, *Am. Pharm. Rev.* **14** (2011).
100. M. P. Feth, J. Jurascheck, M. Spitzenberg, J. Dillenz, G. Bertele i H. Stark, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 1080–1092.
101. V. Niederwanger, F. Gozzo i U. J. Griesser, *J. Pharm. Sci.* **98** (2009) 1064–1074.
102. K. Kachrimanis, K. Fucke, M. Noisternig, B. Siebenhaar i U. J. Griesser, *Pharmaceut. Res.* **25** (2008) 1440–1449.
103. Q. Zhang, K. L. A. Chan, G. Zhang, T. Gillece, L. Senak, D. J. Moore, R. Mendelsohn i C. R. Flach, *Biopolymes* **95** (2011) 607–615.
104. A. Columbano, G. Buckton i P. Wikeley, *Int. J. Pharm.* **237** (2002) 171–178.
105. J. Vollenbroek, G. A. Hebbink, S. Ziffels i H. Steckel, *Int. J. Pharm.* **395** (2010) 62–70.
106. M. Viertelhaus, R. Hilfiker i F. Blatter, *Cryst. Growth Des.* **9** (2009) 2220–2228.
107. P. N. Balani, S. Y. Wong, W. K. Ng, E. Widjaja, R. B. H. Tan i S. Y. Chan, *Int. J. Pharm.* **391** (2010) 125–136.
108. Patent: US 7,553,856 B2, Crystalline form of Omeprazole.
109. Patent: WO 01/87831 A2, Novel amorphous form of Omeprazole salts.
110. Patent: 6,150,380, Crystalline form of Omeprazole.
111. G. Kresse i J. Hafner, *Phys. Rev. B* **47** (1993) 558.
112. G. Kresse i J. Furthmuller, *Phys. Rev. B* **54** (1996) 11169.
113. G. Kresse i D. Joubert, *Phys. Rev. B* **59** (1999) 1758.

114. J. P. Perdew, K. Burke i M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3865; *Phys. Rev. Lett.* **78** (1997) 1396.
115. H. J. Monkhorst i J. D. Pack, *Phys. Rev. B* **13** (1976) 5118.
116. P. M. Bhatt i G. R. Desiraju, *Chemical communications*, Cambridge, England (2007), 2057–2059.
117. D. M. Wood i A. Zunger, *J. Phys. A* **18** (1985) 1343.
118. S. Baroni, S. de Gironcoli i A. del Corso, *Rev. Mod. Phys.* **73** (2001) 515.
119. D. Šahnić, E. Meštrović, T. Jednačak, I. Habinovec, J. Parlov Vuković i P. Novak, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 2092–2099.
120. N. B. Colthrup, L. H. Daly i S. E. Wiberley, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, 3rd Ed. Academic Press, Boston 1990.
121. M. A. Palafox, *Int. J. Quant. Chem.* **77** (2000) 661–684.
122. A. W. White, R. Almasy, A. H. Calvert, N. J. Curtin, R. J. Griffin, Z. Hostomsky, K. Maegley, D. R. Newell, S. Srinivasan i B. T. Golding, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 4084–4097.
123. J. J. Chen, Y. Wei, J. C. Drach i L. B. Townsend, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 2449–2456.
124. I. Tapia, L. Alonso-Cires, P. L. Lo´pez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innera´rity i A. Orjales, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 2870–2880.
125. F. Carrie`re, *Chem. Mater.* **9** (1997) 1989–1993.
126. T. Yamamoto, *Macromolecules* **31** (1998) 6063–6070.
127. J. L. Hedrick, *Macromolecules* **29** (1996) 7335–7341.
128. A. Suwaiyan, R. Zwarich i N. Baig, *J. Raman Spectrosc.* **21** (1990) 243.
129. H. G. Tompkins, D. L. Allara i G. A. Pasteur, *Surf. Interface Anal.* **5** (1983) 101–104.
130. M. M. Cordes i J. L. Walter, *Spectrochim. Acta* **24** (1968) 1421.
131. M. A. Morsy, M. A. Al Khaildi i A. Suwaiyan, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) 9196–9203.
132. P. J. Larkin, *IR and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation*, Waltham, Elsevier, 2011.
133. K. C. Medhi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **57** (1984) 261–266.
134. T. Vrbanec, P. Šket, F. Merzel, M. Smrkolj i J. Grdadolnik, *J. Spectrosc.* **2017** (2017) 11 stranica. DOI: 10.1155/2017/6505706.
135. A. A. Badwan, L. N. Nabulsi, M. M. Al Omari, N. H. Daragmeh, M. K. Ashour, A. M. Abdoh i A. M. Y. Jaber, *Analytical Profiles of drug Substances and Excipients*, **29** (2002) 213–259.

136. N. Anilkumar, *Gastroretentive delivery system of clarithromycin and proton pump inhibitor using different polymers for helicobacter pylori infection*, Doktorska disertacija, University of Delhi, India, 2013. <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/9059>
137. G. Raj, *Advanced Inorganic Chemistry VOL 1.*, 31. izd., ed. M. Chatwal, GOEL Publishing House, Meerut, India, 2008.
138. J. Leszczynski, *Challenges and advances in Computational Chemistry and Physics, Noncovalent forces*, 19. Izd., Springer International Publishing Switzerland, 2015.





§ 8. DODATAK

U dodatku su ispisane koordinate omeprazola prije i poslije minimizacije dobivene metodom VMD. Nakon toga slijede rezultati optimizirane strukture.

Početna struktura:

86

Generirano pomoću VMD metode.

N	3,771554	0,837824	5,606754
N	-2,633097	6,048390	4,258596
N	2,308138	2,315110	6,503703
N	-1,169679	4,571104	3,361647
N	-0,979185	-0,345334	3,355810
N	2,117643	7,231548	6,509541
H	4,097772	-0,002745	5,087189
H	-2,959313	6,888959	4,778162
H	3,360426	4,699407	7,676131
H	-2,221968	2,186807	2,189220
H	-4,006973	5,096618	7,751964
H	5,145432	1,789596	2,113387
H	-3,231805	1,331531	5,755560
H	4,370263	5,554684	4,109790
H	1,374751	1,352085	3,288760
H	-0,236294	5,534128	6,576591
H	2,342208	-0,147995	3,371492

H	-1,203750	7,034207	6,493859
H	2,251932	8,659158	3,185429
H	-1,113474	-1,772943	6,679921
H	2,348159	-0,216661	0,921390
H	-1,209701	7,102875	8,943961
H	-2,719068	7,795626	0,054828
H	3,857526	-0,909412	9,810523
H	-2,026226	7,696866	1,690598
H	3,164684	-0,810653	8,174752
H	-1,936277	4,872894	9,617558
H	3,074735	2,013320	0,247793
H	1,237994	7,636951	1,276633
H	-0,099536	-0,750738	8,588717
H	2,153547	6,163002	0,920125
H	-1,015090	0,723211	8,945225
H	5,979829	5,504379	0,536457
H	-4,841370	1,381835	9,328894
H	1,190712	2,718915	8,750191
H	-0,052254	4,167297	1,115160
H	4,233587	5,173156	0,337997
H	-3,095129	1,713058	9,527353
H	-1,295226	1,688029	6,907297
H	2,433685	5,198184	2,958053
H	-0,220772	3,083862	6,599760
H	1,359230	3,802351	3,265590
H	-1,330849	2,508477	5,314569
H	2,469308	4,377736	4,550781
C	2,460806	1,177815	5,840623
C	-1,322347	5,708398	4,024727
C	3,600817	2,771921	6,697652
C	-2,462358	4,114293	3,167697
C	-5,780372	3,960450	7,289983

C	6,918830	2,925762	2,575367
C	-4,413951	4,179112	7,327008
C	5,552411	2,707102	2,538342
C	-3,495810	3,234484	6,791220
C	4,634268	3,651730	3,074131
C	-3,924767	2,048678	6,191682
C	5,063225	4,837535	3,673668
C	4,533780	1,849467	6,149356
C	-3,395320	5,036747	3,715994
C	1,347436	0,281667	3,549689
C	-0,208978	6,604548	6,315661
C	0,245028	-0,437961	2,812482
C	0,893430	7,324174	7,052868
C	-4,085958	8,358578	1,616628
C	5,224416	-1,472366	8,248723
C	4,659923	7,756090	0,977350
C	-3,521463	-0,869877	8,888000
C	3,362910	7,859879	1,512886
C	-2,224451	-0,973666	8,352464
C	3,237592	8,563526	2,715447
C	-2,099134	-1,677312	7,149903
C	-2,699825	8,274302	1,039068
C	3,838283	-1,388087	8,826282
C	2,166790	7,260022	0,829977
C	-1,028332	-0,373808	9,035373
C	0,999416	3,087991	9,764427
C	0,139042	3,798223	0,100924
C	-1,210645	2,659023	6,397906
C	2,349104	4,227191	3,467444
O	-2,177350	3,588490	6,905843
O	3,315809	3,297724	2,959507
O	1,273794	-1,219551	5,781621

O	-0,135336	8,105765	4,083730
O	0,745605	4,503123	9,637542
O	0,392853	2,383090	0,227809
S	1,035398	0,220694	5,356750
S	0,103060	6,665519	4,508601

Optimizirana struktura:

86

N	3,7879350	0,8902280	5,5876030
N	-2,5922410	6,1165930	4,1856230
N	2,3342020	2,3866410	6,4684490
N	-1,1385080	4,6201800	3,3047770
N	-0,9737610	-0,2968580	3,3620210
N	2,1694550	7,3036790	6,4112050
H	4,1086300	0,0413220	5,0782560
H	-2,9129360	6,9654990	4,6949700
H	3,4014740	4,7802940	7,6078010
H	-2,2057790	2,2265260	2,1654250
H	-3,9635660	5,2172060	7,6938410
H	5,1592600	1,7896140	2,0793850
H	-3,2124090	1,4226530	5,7446060
H	4,4081030	5,5841680	4,0286200
H	1,3888780	1,3871470	3,2681590
H	-0,1931840	5,6196740	6,5050670
H	2,3486450	-0,1168100	3,3682370
H	-1,1529510	7,1236310	6,4049890
H	6,8579180	-0,8247540	3,1815950
H	-5,6622240	7,8315750	6,5916310
H	2,3489690	-0,2171080	0,9192180
H	-1,1532750	7,2239290	8,8540080
H	-2,6781050	7,8098830	-0,0401660

H 3,8737990 -0,8030620 9,8133920
H -1,9822740 7,7285890 1,5952970
H 3,1779680 -0,7217680 8,1779290
H -1,8900630 5,0066770 9,5578520
H 3,0857570 2,0001440 0,2153740
H 1,2806910 7,6461660 1,1753420
H -0,0849970 -0,6393450 8,5978830
H 2,1877480 6,1629440 0,8359890
H -0,9920540 0,8438770 8,9372370
H 6,0096960 5,4793040 0,4528900
H -4,8140020 1,5275170 9,3203360
H 1,2237390 2,8252670 8,7118570
H -0,0280440 4,1815540 1,0613690
H 4,2613230 5,1547400 0,2623600
H -3,0656290 1,8520810 9,5108660
H -1,2715190 1,7837850 6,8876090
H 2,4672130 5,2230360 2,8856170
H -0,1904370 3,1698630 6,5598390
H 1,3861310 3,8369580 3,2133870
H -1,3062710 2,5837950 5,2844980
H 2,5019660 4,4230250 4,4887270
C 2,4794890 1,2400990 5,8197920
C -1,2837950 5,7667220 3,9534340
C 3,6296670 2,8391080 6,6537930
C -2,4339730 4,1677120 3,1194330
C -5,7438760 4,0845210 7,2502620
C 6,9395710 2,9223000 2,5229640
C -4,3762530 4,2964490 7,2816160
C 5,5719480 2,7103720 2,4916100
C -3,4642220 3,3401710 6,7561570
C 4,6599170 3,6666500 3,0170680
C -3,9006690 2,1490020 6,1728740

C 5,0963630 4,8578190 3,6003510
C 4,5566080 1,9047620 6,1155110
C -3,3609140 5,1020590 3,6577150
C 1,3565210 0,3203420 3,5429430
C -0,1608270 6,6864790 6,2302830
C 0,2487790 -0,4029260 2,8173860
C 0,9469150 7,4097470 6,9558390
C -4,0386690 8,4001200 1,5170780
C 5,2343630 -1,3932990 8,2561480
C 4,7025440 7,7434290 0,8674210
C -3,5068490 -0,7366080 8,9058050
C 3,4072470 7,8609410 1,4042720
C -2,2115530 -0,8541200 8,3689540
C 3,2882000 8,5806910 2,5979060
C -2,0925060 -1,5738700 7,1753190
C -2,6542400 8,3011060 0,9377690
C 3,8499340 -1,2942860 8,8354560
C 2,2065380 7,2586240 0,7316570
C -1,0108440 -0,2518030 9,0415690
C 1,0365580 3,2083960 9,7216400
C 0,1591370 3,7984250 0,0515860
C -1,1829520 2,7476690 6,3655490
C 2,3786470 4,2591520 3,4076770
O -2,1436850 3,6886840 6,8634550
O 3,3393790 3,3181370 2,9097700
O 1,2798220 -1,1515510 5,7942200
O -0,0841280 8,1583720 3,9790060
O 0,7898840 4,6230900 9,5770230
O 0,4058100 2,3837300 0,1962030
S 1,0480550 0,2843290 5,3512860
S 0,1476390 6,7224920 4,4219400



§ 9. ŽIVOTOPIS

Tomislav Vrbanec rođen je 27.4.1981. u Zagrebu.

Obrazovanje:

1999. – 2006. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, dipl. ing. kemije

1995. – 1999. Gimnazija Tituša Brezovačkog, Zagreb

1988. – 1994. Glazbena škola Vatroslava Lisinskog, Zagreb – glasovir

Radno iskustvo:

2006. – danas, KRKA, d.d., Novo mesto, Razvoj in raziskave zdravil, samostalni istraživač

2006. PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i Razvoj, vanjski suradnik

Sudjelovanja:

2006. – danas sudjelovanje na dvadesetak međunarodnih stručnih konferencija, simpozija, radionica i seminara.

2006. – danas predavanja za studente Sveučilišta u Ljubljani i Sveučilišta u Zagrebu o primjeni spektroskopskih metoda u farmaceutskoj industriji.

2000., 2001. aktivno sudjelovanje u prezentaciji Kemijskog odsjeka PMF-a na Studentskoj smotri Sveučilišta u Zagrebu.

Znanstveni radovi u časopisima:

1. T. Vrbanec, P. Šket, F. Merzel, M. Smrkolj i J. Grdadolnik, *J. Spectrosc.* **2017** (2017) 11 stranica. DOI: 10.1155/2017/6505706.

2. S. Kukec, R. Dreu, T. Vrbanec, S. Srčić i F. Vrečer, *Int. J. Pharm.* **430** (2012) 74–85.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. T. Vrbanec, *Use of different microspectroscopical methods in pharmaceutical industry*, Predavanje, 10th Central European Symposium on Pharmaceutical technology, Drug delivery for specific populations/3rd International analytical symposium: Analytical evaluation of API's

and pharmaceutical products: from molecule to the final product, Portorož, Slovenija, 16.9.2014.

2. T. Vrbanec, *NIR spectroscopy as a method for fast identification*, Predavanje, 4th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences/2nd International analytical symposium: Analytical evaluation of APIs and pharmaceutical products: from particles to the pharmaceutical compounds, Bled, Slovenija, 2011.

3. T. Vrbanec, *Use of NIR spectroscopy in pharmaceutical industry*, Predavanje, 22. Simpozij Sekcije farmaceutskih tehnologa, Quality by design (QbD), Ljubljana, Slovenija, 2010.

4. D. Zupančič Božič, T. Vrbanec, F. Vrečer, *Near infrared spectroscopy (NIR) as a method for tablet crushing strength determination*, Predavanje, 7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Bidelivery Systems, Ljubljana, Slovenija, 2008.

5. D. Škalec Šamec, T. Vrbanec, A. Kwokal, Z. Šiljković, D. Šišak i E. Meštrović, *Morphological Study of Z-Isomer of Entacapone*, Poster, XX. jubilarni skup hrvatskih kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 2007.

6. A. Kwokal, T. Vrbanec, D. Čavužić i E. Meštrović, *NIR spectroscopy: Determination of Optimal homogenization Time*, Poster, XX. jubilarni skup hrvatskih kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, 2007.



Članstvo:

Hrvatsko kemijsko društvo