



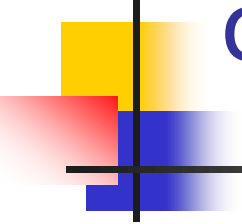
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАКУЛТЕТ „ФАКУЛТЕТ ФАРМАЦИЯ“
ЦЕНТЪР ЗА ДИСТАНЦИОННО ОБУЧЕНИЕ

Лекция №04

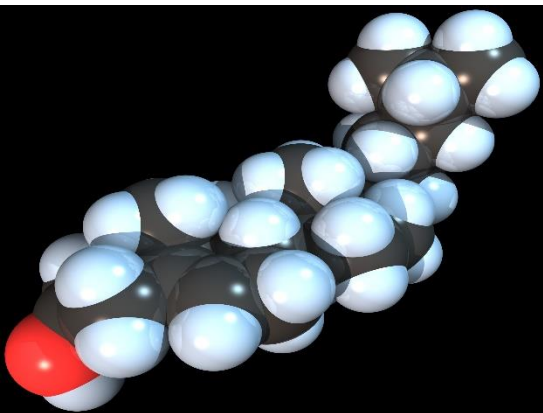
**Анализ на антихиперлипидемични и лекарства, влияещи върху
съсирваемостта на кръвта**

проф. Данка Обрешкова, дм, дфн

Анализ на лекарства, действащи на сърдечно-съдовата система



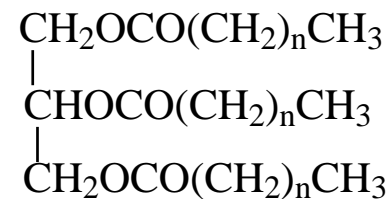
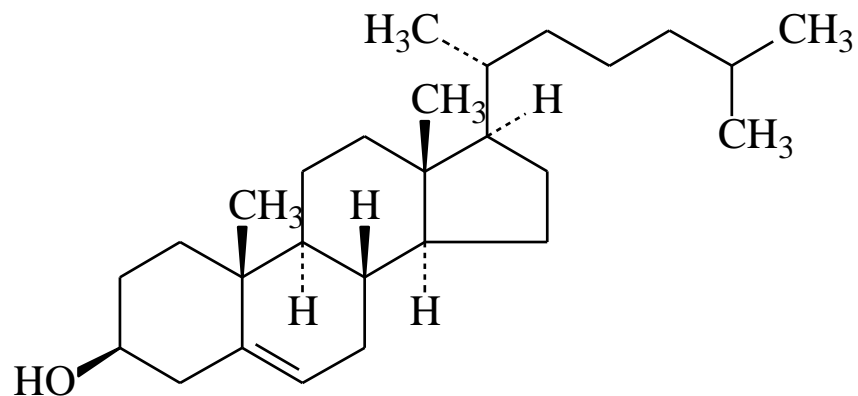
Анализ на антихиперлипидемични
и лекарства, влияещи върху
съсирваемостта на кръвта

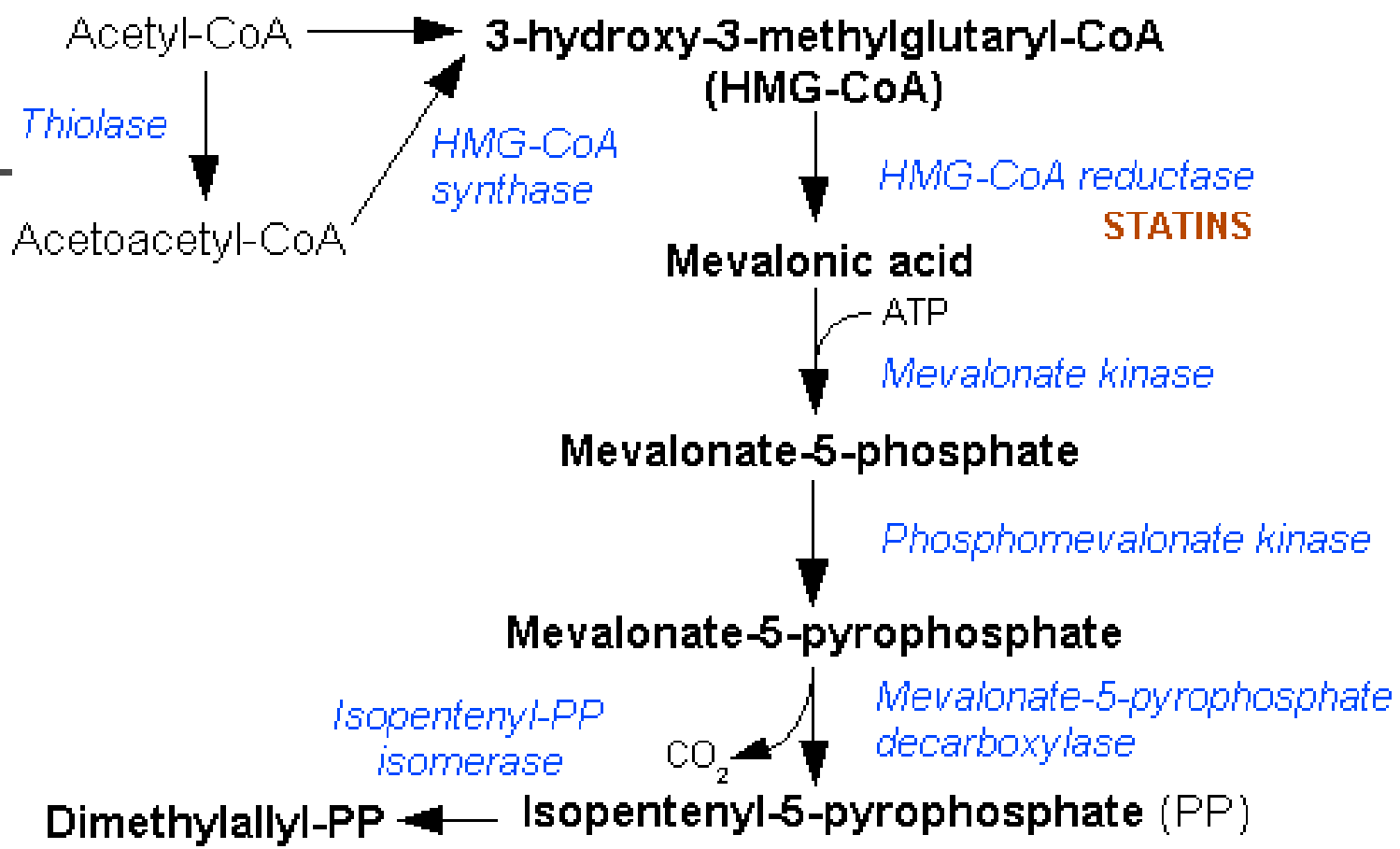
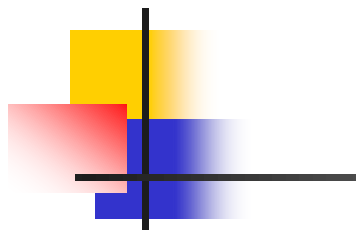


2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-
dodecahydro-1H-
cyclopenta[a]phenanthren-3-ol

$n = 4 - 40$

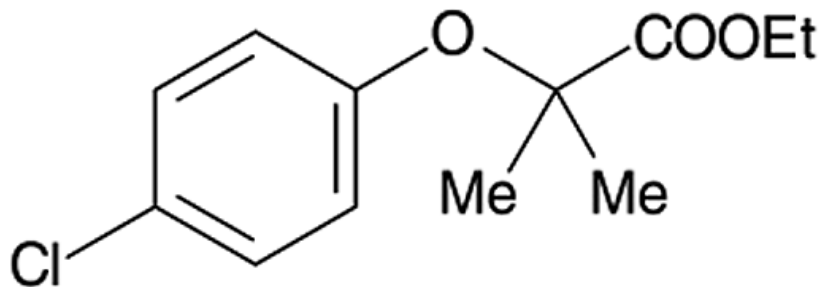
Cholesterol







Clofibrate



Безцветна течност, много малко
разтворима във вода,
смесваща се лесно с етанол и етер

ethyl 2-(4-chlorophenoxy)-2-methyl-propionate.

Идентичност – ИЧ- и УВ-спектрофотометрия

Тестове – коефициент на пречупване и
относителна плътност

Определяне на летливи примеси

Условия за газхроматографски анализ

Сорбент-силанизирана

диатомитова земя

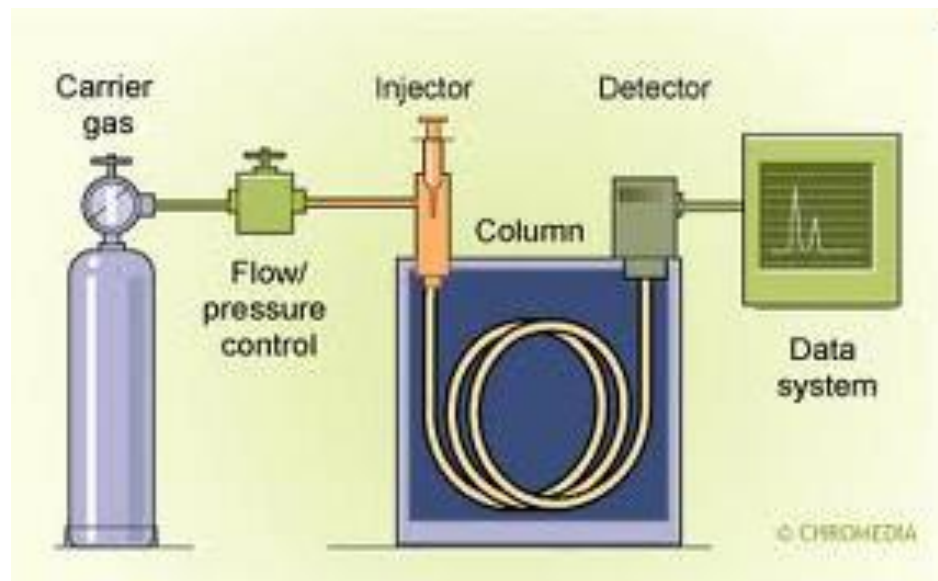
Газ-носител-азот

Детектор-пламъково-

йонизационен

Температура - 185°C

Обем на пробите – 2 μl

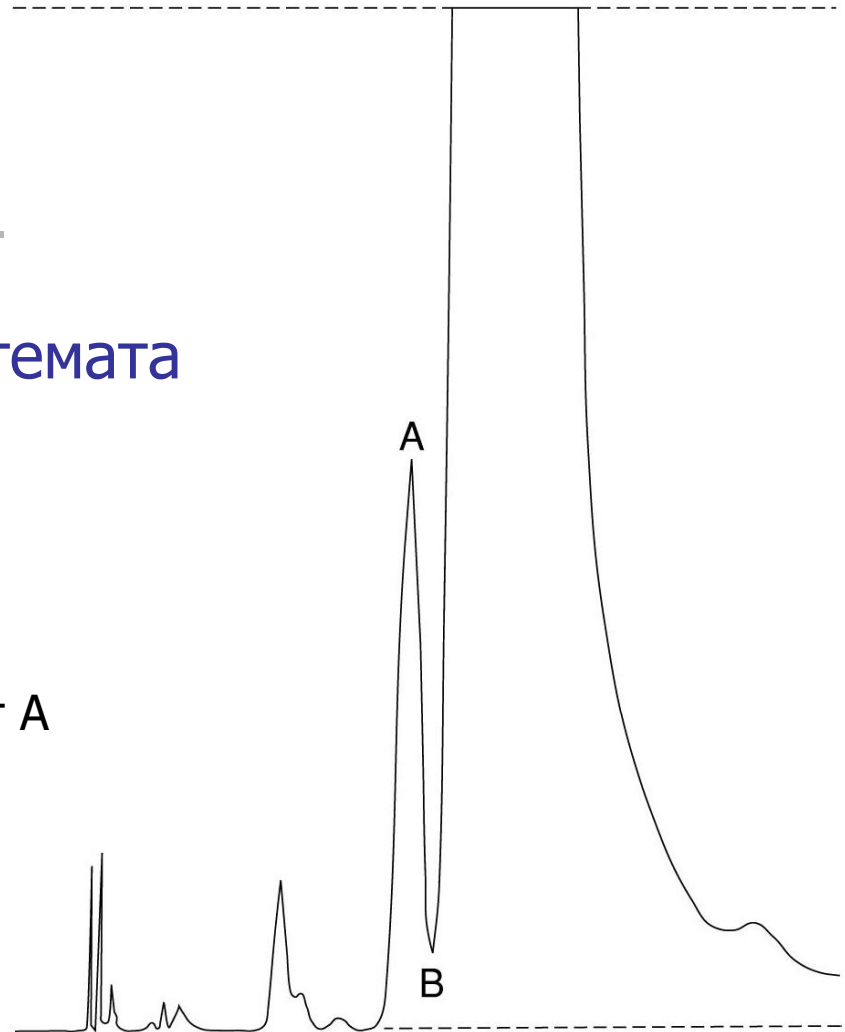




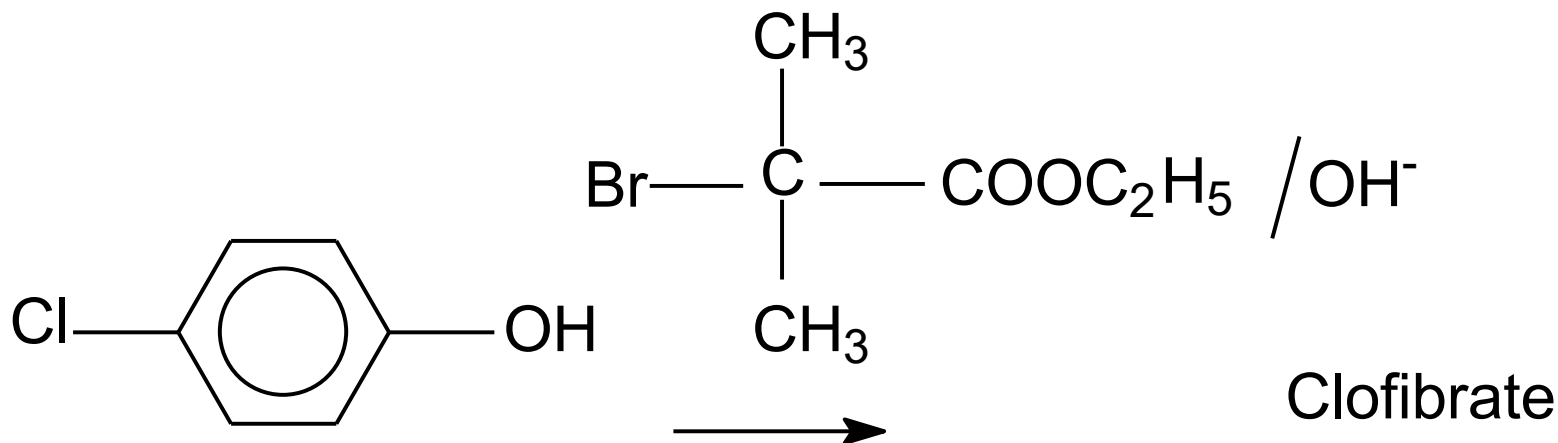
Тест за пригодност на системата

Определянето е невалидно, ако:

- A е съизмерима с най-малко 30% от скалата на детектора
- Разликата A-B е повече от 75% от A

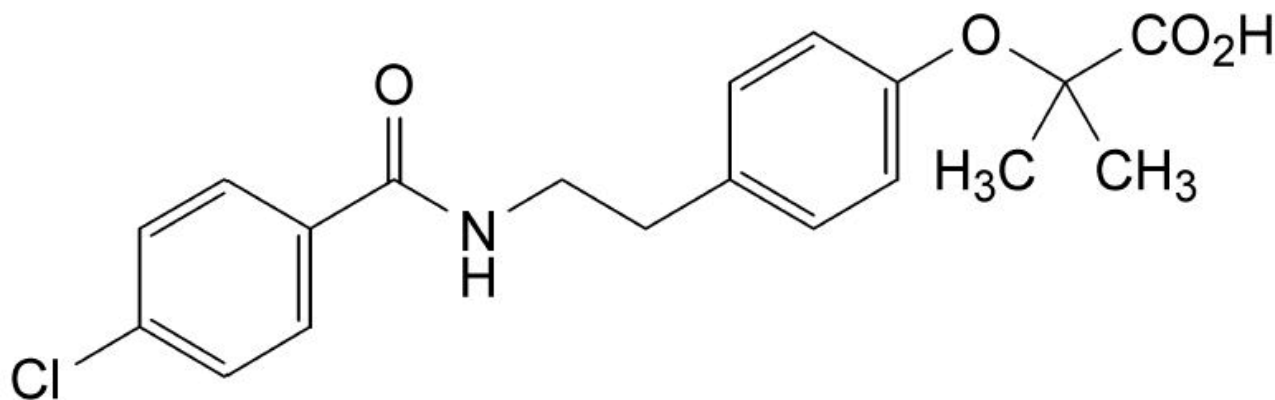


Тест за 4-хлорофенол – газова хроматография



Nicotinic acid.....

Bezafibrate

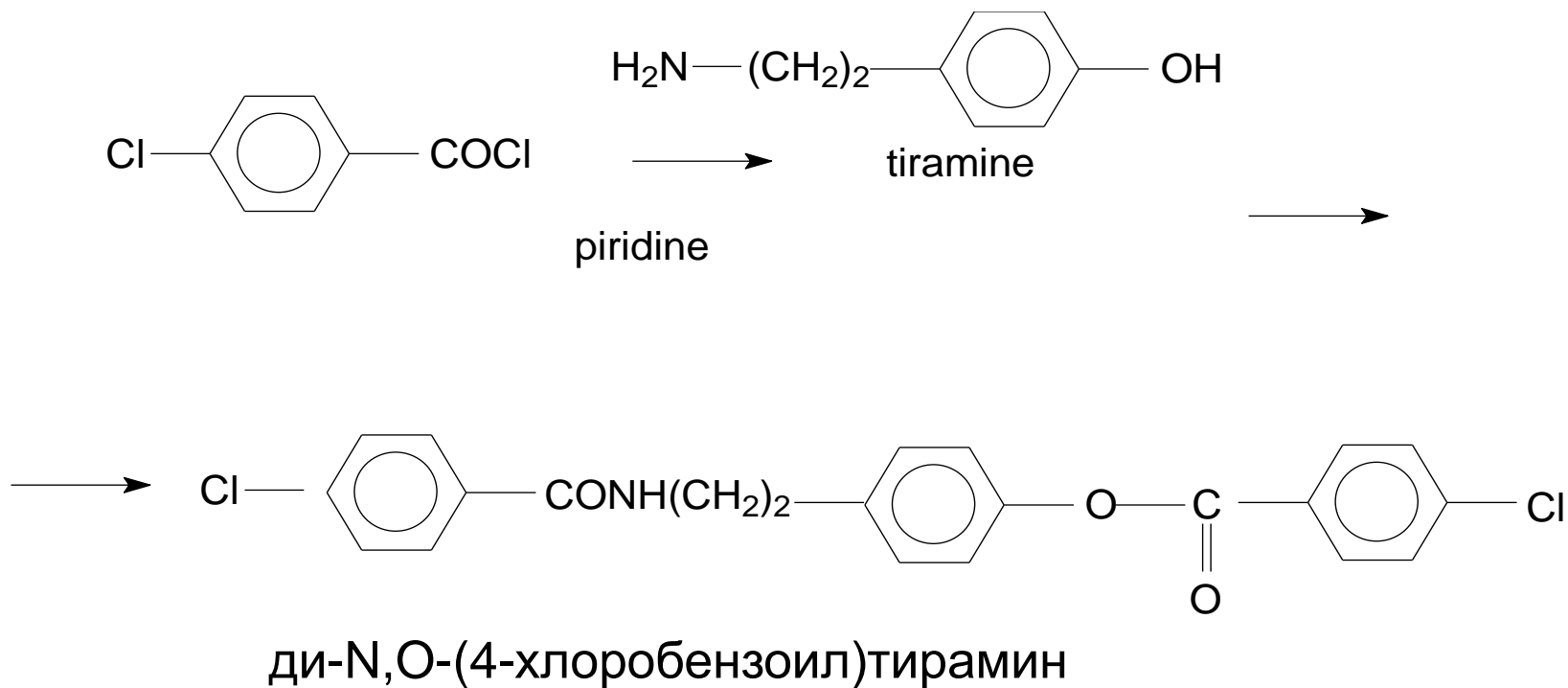


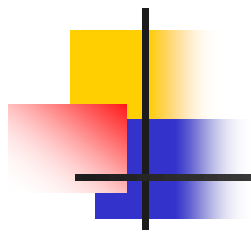
2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoic acid

Неразтворим във вода, малко разтворим в ацетон и етанол,
разтваря се в разредени разтвори на алкални хидроксиди

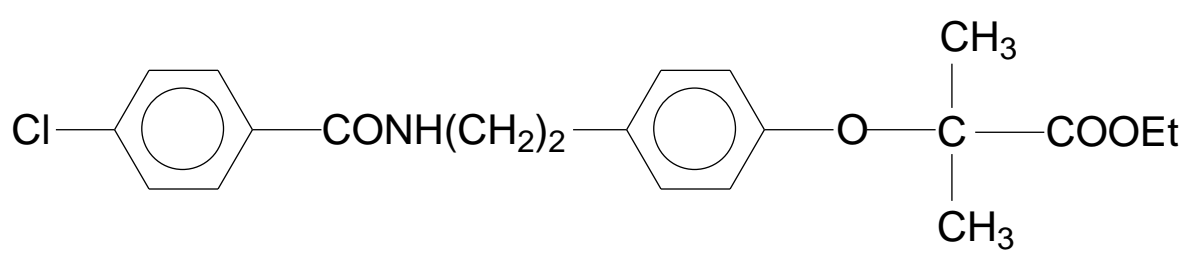
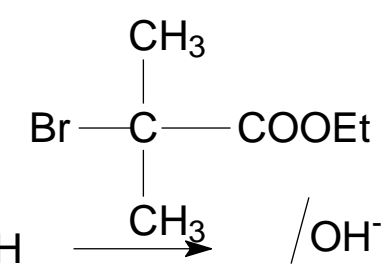
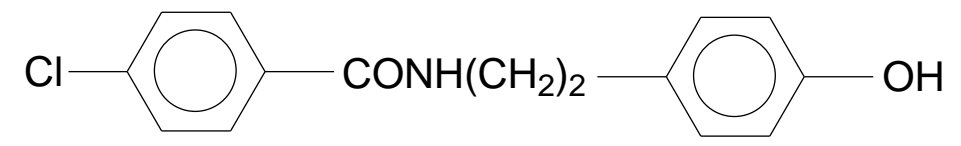
Идентичност – ИЧ, т.т., ТСХ

Получаване на Bezafibrate

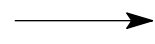




KOH/H₂O

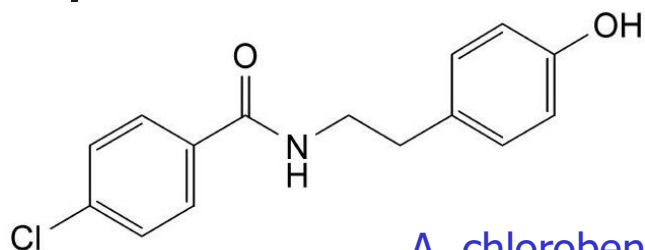


OH⁻

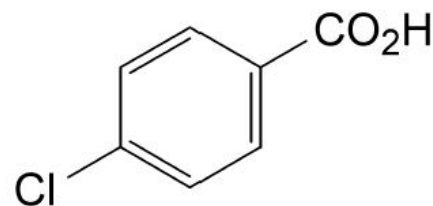


Bezafibrate

Контрол на чистотата - BETX

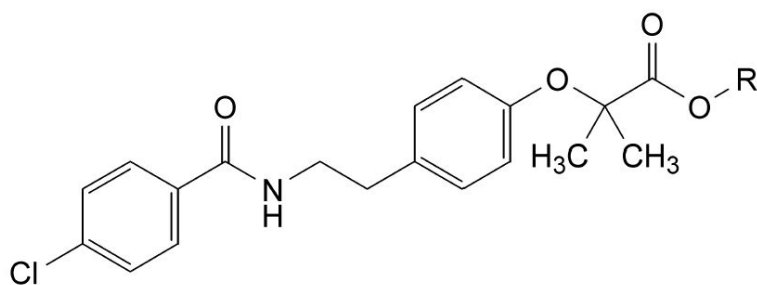


A. chlorobenzoyltyramine



B. 4-chlorobenzoic acid

C. R = CH₃: methyl 2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoate,



D. R = CH₂-CH₃: ethyl 2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoate,

E. R = CH₂-CH₂-CH₂-CH₃: butyl 2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoate



Приготвяне на разтворите

Изследван р-р – разтворител подвижна фаза (фосфатен буфер:метанол) $C=500 \mu\text{g/ml}$

Стандартен р-р „а“ – приготвя се чрез стъпково разреждане на изследвания р-р $C=2.5 \mu\text{g/ml}$ (0.5%)

Стандартен р-р „b“ – приготвя се чрез 10кратно разреждане на стандартен р-р „а“ $C=0.25 \mu\text{g/ml}$

Стандартен р-р „с“ – към 1 ml от изсл. р-р се прибавя 1 ml солна к-на, след изпаряване до сухо, сухият остатък се разтваря в подвижна фаза

Тест за пригодност на системата

Определянето не е валидно, ако:

-степената на разделяне между двата пика от хроматограмата на ст. р-р „с“ е по-малко от 5.0;

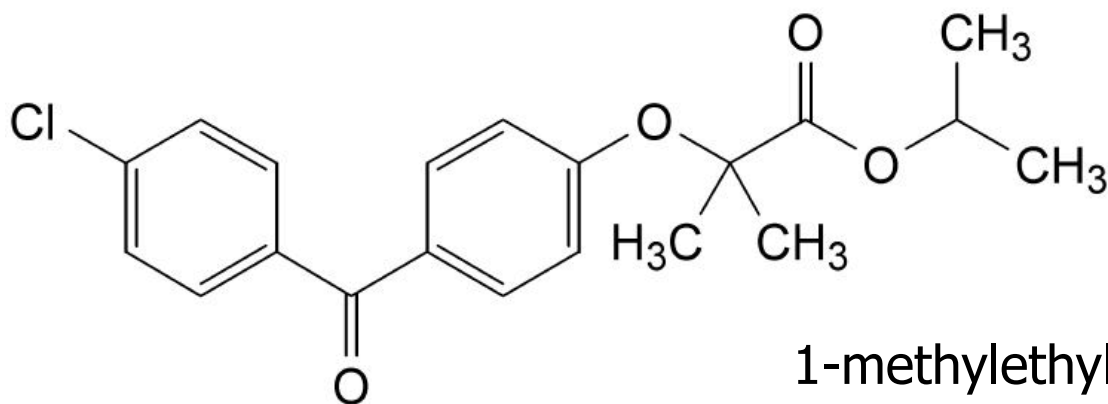
-отношението сигнал/шум на основния пик от хроматограмата на ст. р-р „b“ е по-малко от 5.0

Количествено определяне

Титруване на киселина заряден тип
НА със стандартен разтвор на
натриев хидроксид, водно-етанолна
среда, индикатор фенолфталеин

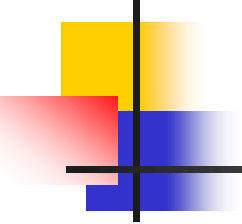


Fenofibrate



1-methylethyl 2-[4-(4-chlorobenzoyl)
phenoxy]-2-methylpropanoate

Идентичност – ИЧ-спектър и точка на топене



Количествено определяне на сродни вещества и на субстанцията – изократична ВЕТХ

Примес А – свободна фенофибринова киселина

Тест за пригодност на системата

-определяне на онечиствания – степен на разделяне на пиковете на два от примесите

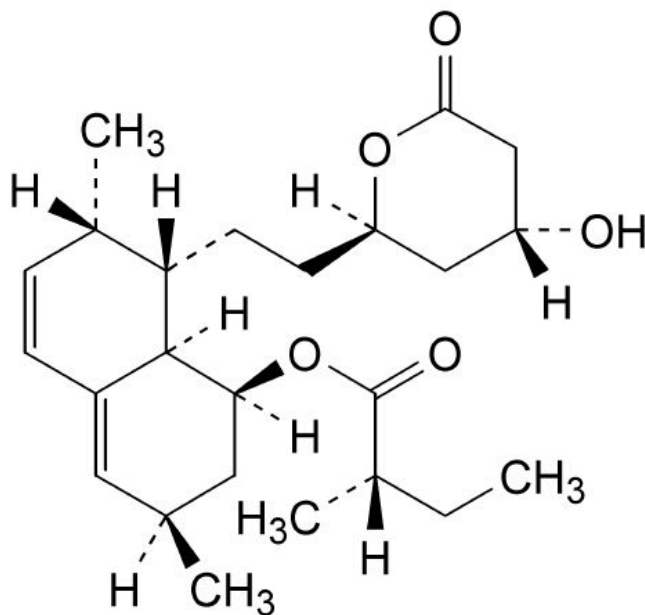
-количествено определяне на субстанцията

Стандартният р-р на фенофибрат се инжектира 6 пъти.

Определянето не е валидно, ако стойността на RSD, % от шестте площи превишава 1.0

HMG-CoA редуктазни инхибитори

Lovastatin

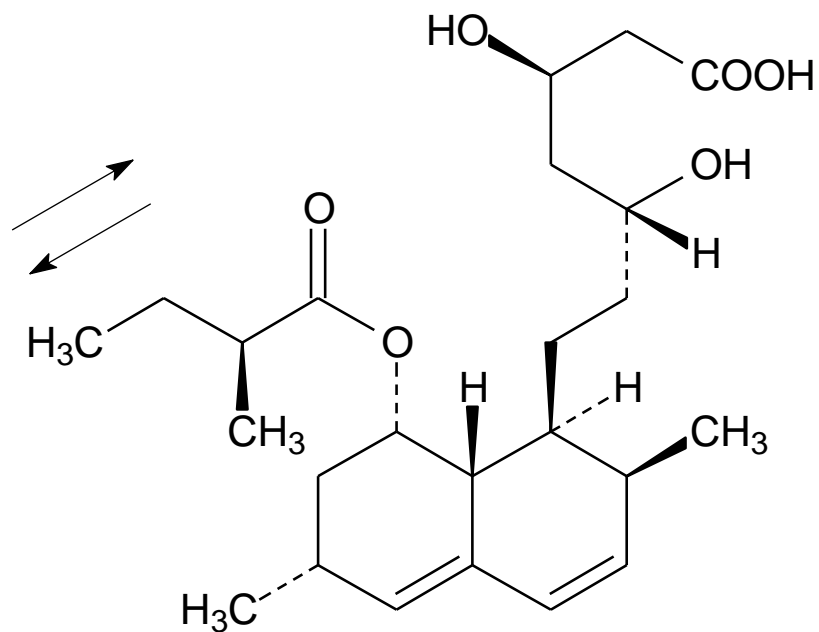
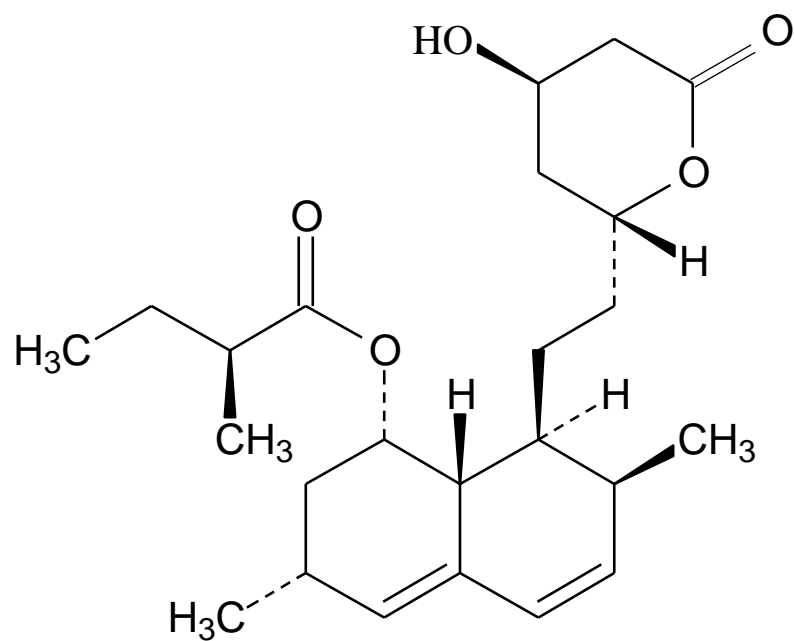


Идентичност

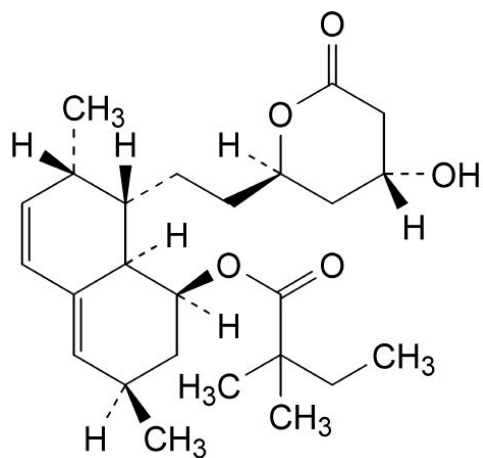
ИЧ-спектрофотометрия
Поляриметрия

(1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-[2-[(2*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl (2*S*)-2-methylbutanoate

Бета-гидрокси киселина – примес В



VETX тест за чистота и количествено определяне



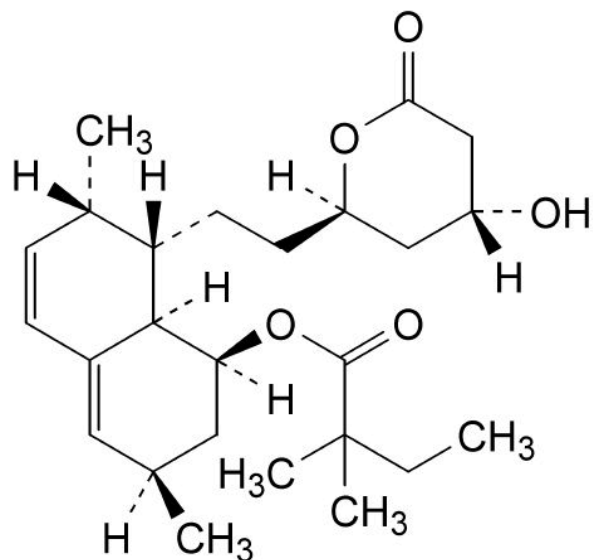
Simvastatin

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)	Comment
0 - 5	60	40	isocratic
5 - 7	60 → 65	40 → 35	linear gradient
7 - 13	65 → 90	35 → 10	linear gradient
13 - 15	90	10	isocratic
15 - 17	90 → 60	10 → 40	linear gradient
17 - 20	60	40	re-equilibration

Пригодност на системата

Разделяне на Lovastatin и Simvastatin

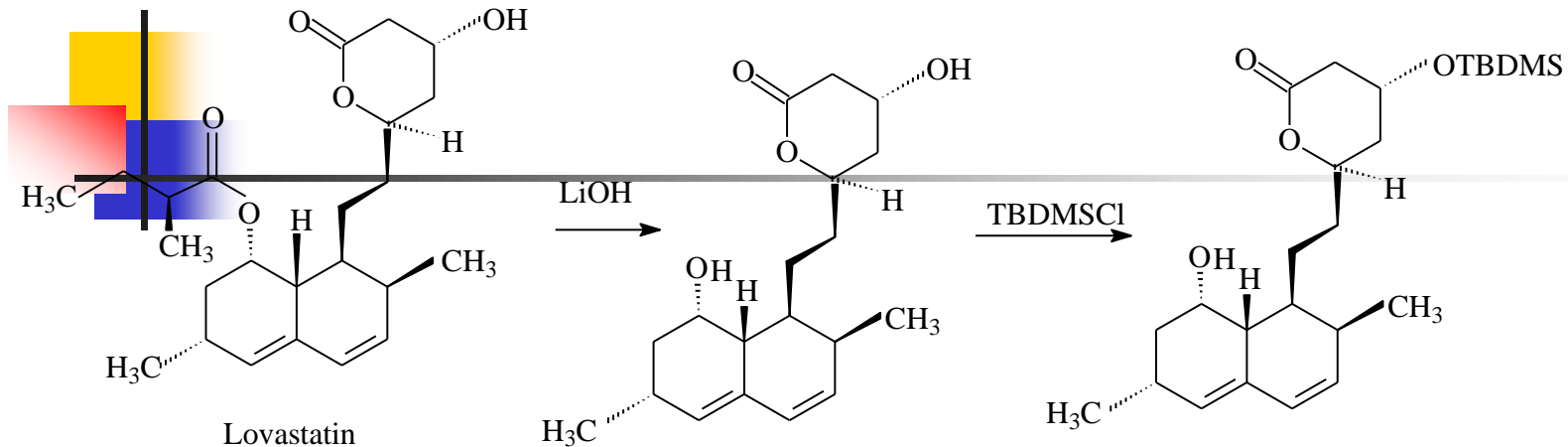
Simvastatin



Идентичность

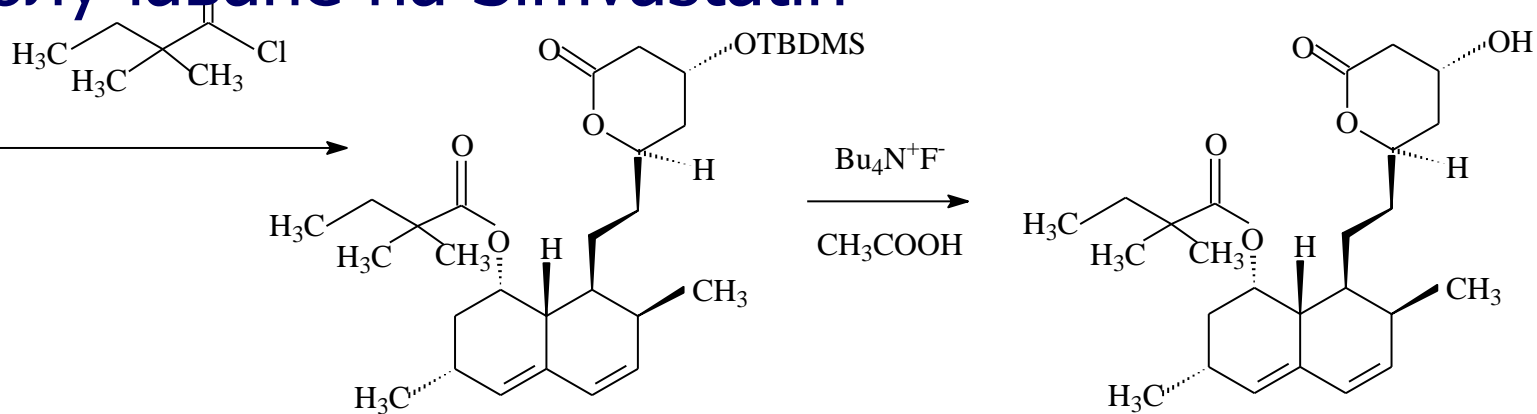
ИЧ-спектрофотометрия
Поляриметрия

(1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-[2-[(2*R*,4*R*)-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl] 2,2-dimethylbutanoate



A fungal metabolite isolated from cultures of *Aspergillus terreus* and *Monascus ruber*

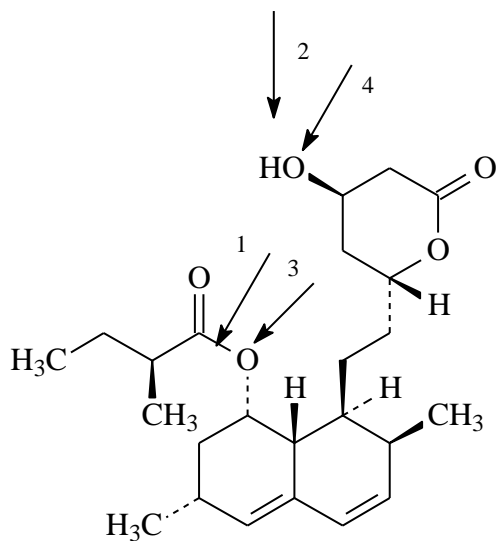
Получаване на Simvastatin

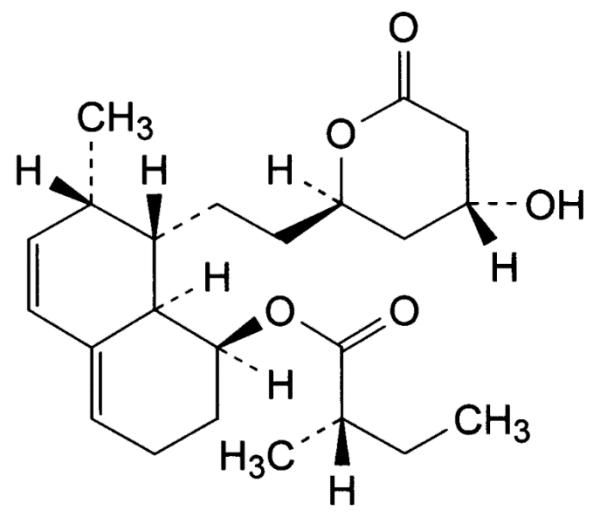
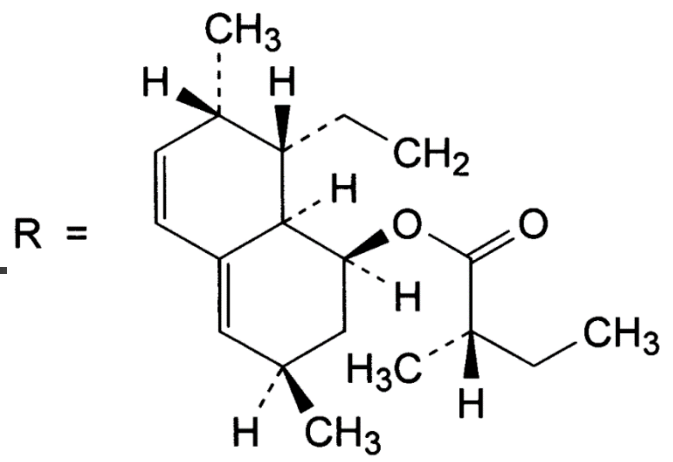
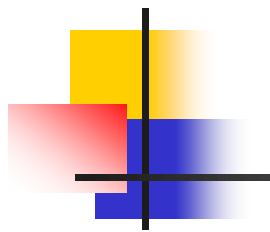


Simvastatin е полусинтетично производно на Lovastatin и се получава от него.

Подходът е хидролиза на естерната група (деацилиране) до получаването на съответния диол.

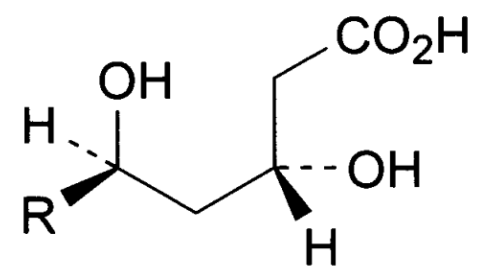
След това, защита на хидроксилната група в лактоновия пръстен, получаване на естера с 2,2-диметилбутирил хлорид и възстановяване на защитената хидроксилна група.





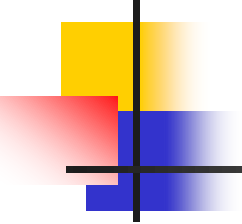
A. mevastatin

IMPURITIES



B. Hydroxy acid lovastatin

Градиентна ВЕТХ за количествено определяне на субстанцията и примесите



примес Е – Lovastatin (прекурсор от синтеза)


Други примеси:

- производно с отворен лактонен пръстен
- епиловастатин
- анхидросимвастатин (двойна връзка в лактонното ядро)
- димерен продукт



За идентифициране на ***Simvastatin*** и ***Lovastatin*** са проучени възможностите на quadrupol и ion trap мас спектрометрия.

Основната фрагментация и при двете вещества следва схемата: елиминиране на естерната странична верига, дехидратация и дисоциация на лактонното ядро. Друг главен фрагментационен процес е реангажирането на двойните връзки. Данни от тандем мас спектрометрични изследвания (MS/MS) дават предположение за образуване на фрагменти чрез взаимодействие на бета-хидрокси групата с карбоксилна група, образувана при отварянето на лактонното ядро. Проучванията на структурни аналози на ***Simvastatin*** и ***Lovastatin*** потвърждават, че дехидратирането на бета-хидрокси лактона се извършва преференциално спрямо бета, гама-незаместени лактони.



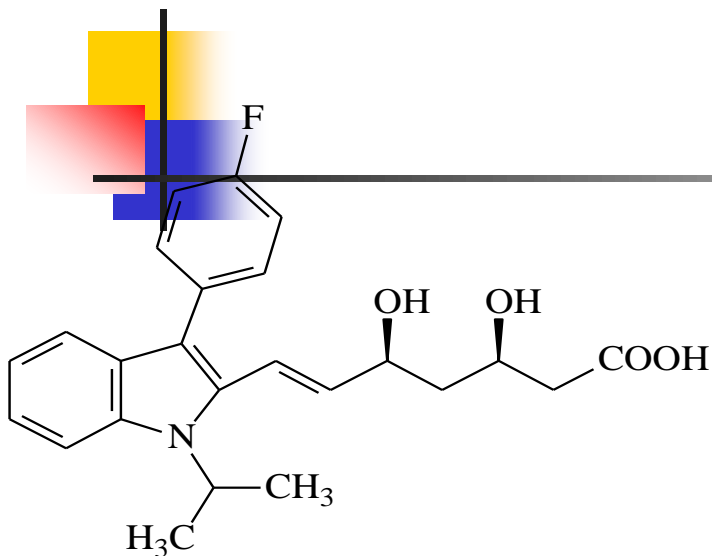
1. Количественото съдържание на **simvastatin** в таблетна лекарствена форма е определено чрез УВ-производна спектрофотометрия. Получена е II производна на функцията при 243 nm. Намалено е влиянието на ексципиентите от лекарствената форма. Резултатите са сравними с такива, получени при използване на HPLC метод.

2. **Simvastatin** е определен количествено в кръвна плазма с ВЕТХ по метода на вътрешния стандарт. Като такъв е използват **lovastatin**. Активните вещества са екстрахирани със солвентна смес циклохексан-дихлорметан, а подвижната фаза е ацетонитрил – вода в съотношение 70 : 30. Аналитичният добив е 93.3 %.

3. Проведени са проучвания за потенциален инхибиторен ефект на сок от грейпфрут върху CYP3A4-медиран лекарствен метаболизъм. Моделно лекарство, избрано като субстрат на ензима е **simvastatin**. Серумните концентрации на SV и SVA са определяни с течно хроматография – тандем мас спектрометрия (LC/MS/MS) в продължение на 24 часа. Резултатите сочат, че при едновременно приемане на сок от грейпфрут и simvastatin се повишава C_{max} на серумната концентрация на simvastatin, както и площта под кривата – серумна концентрация-време. Ефектът се запазва дори 24 след приемане на сок от грейпфрут – повишението на серумната концентрация е около 10 % от първоначалното.

4. **Simvastatin** и активният му метаболит – бета-хидрокси киселина са определени едновременно в човешка плазма с чувствителен течно-хроматографски метод след течно-твърда екстракция. При екстракцията са използвани C 18 колони с размери 50 x 2 мм и е установено, че по този начин успешно е ограничена обратната лактонизация на бета-хидрокси киселината. Лимитът на детекция е 50 pg/ml.

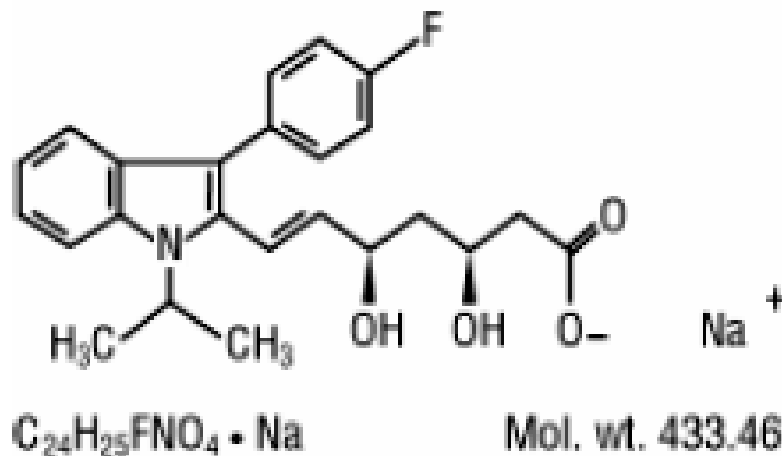
Fluvastatin



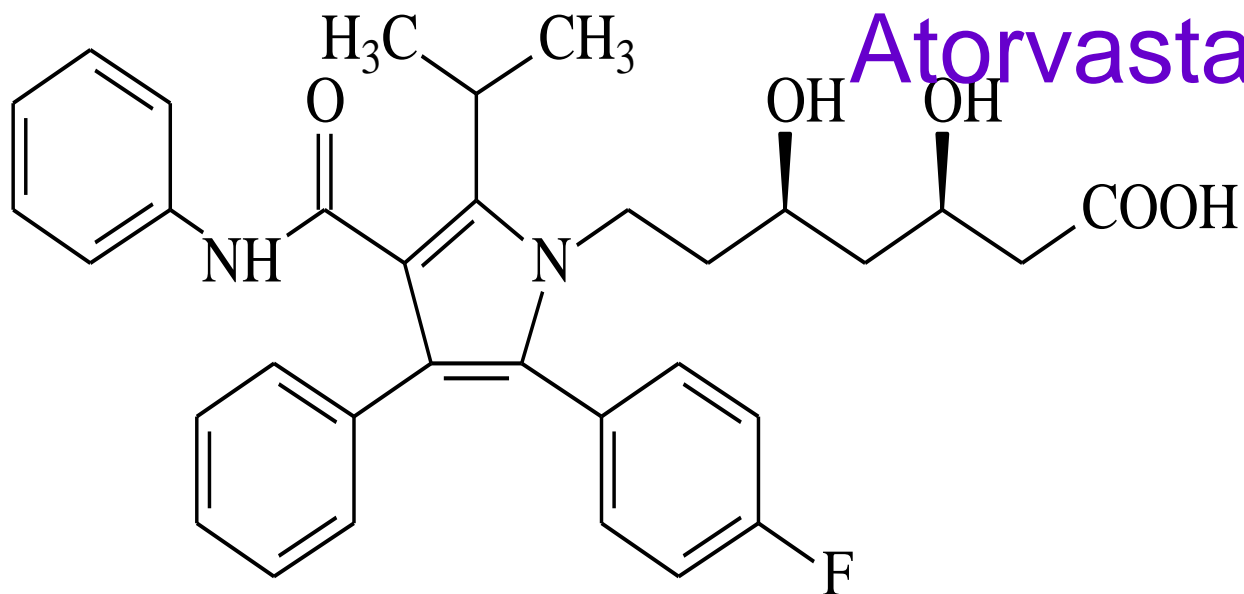
[R*, S*-(E)]-()-7-[3-(4-fluorophenyl)-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxy-6-heptenoic acid

Lescol® (fluvastatin sodium), is a water-soluble cholesterol lowering agent which acts through the inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase.

Fluvastatin sodium is [R*,S*-(E)]-(±)-7-[3-(4-fluorophenyl)-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxy-6-heptenoic acid, monosodium salt. The empirical formula of fluvastatin sodium is $C_{24}H_{25}FNO_4 \cdot Na$, its molecular weight is 433.46 and its structural formula is:



Atorvastatin

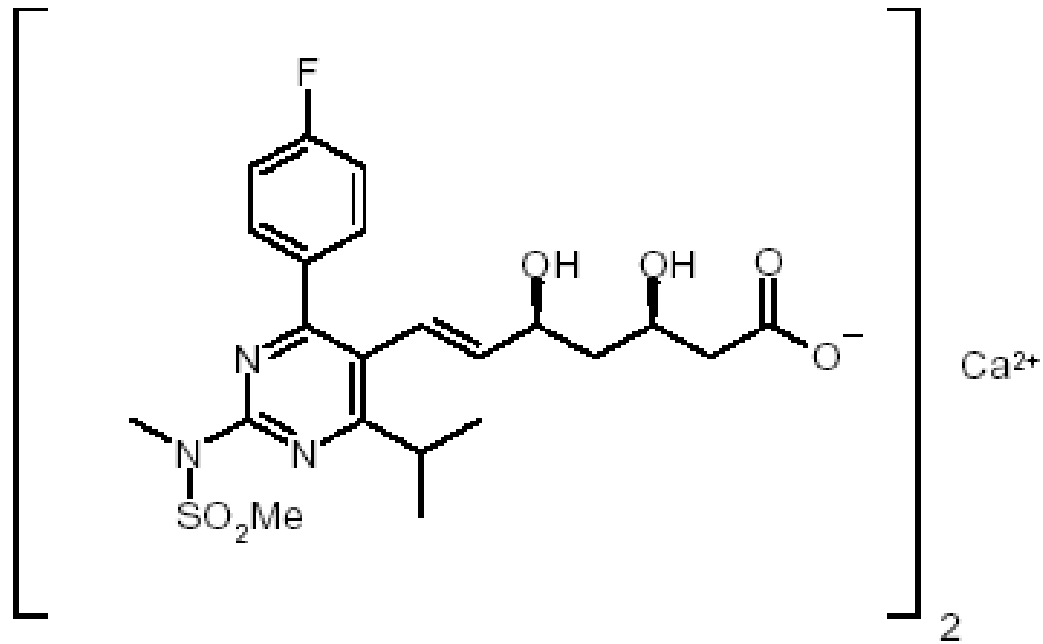


**[R -(R* , R*)]-2-(4-fluorophenyl)-
beta,delta-dihydroxy-
5-(1-methylethyl)-3-phenyl-4-
[(phenylamino)carbonyl]-
1H -pyrrol-1-heptanoic acid**

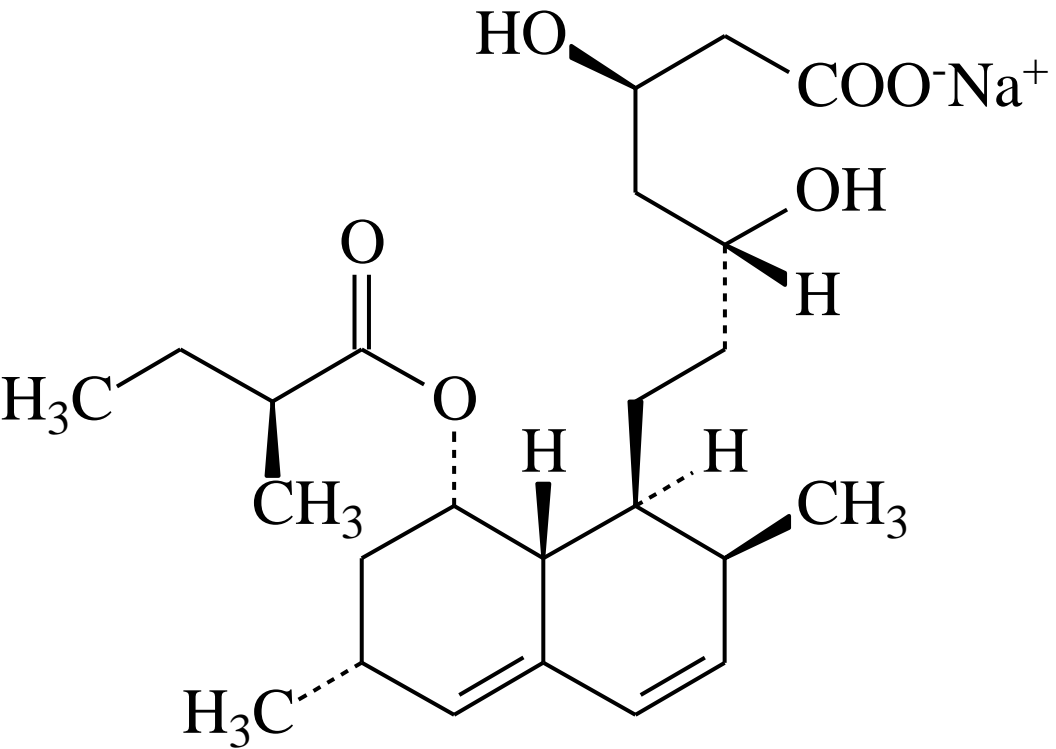


Rosuvastatin

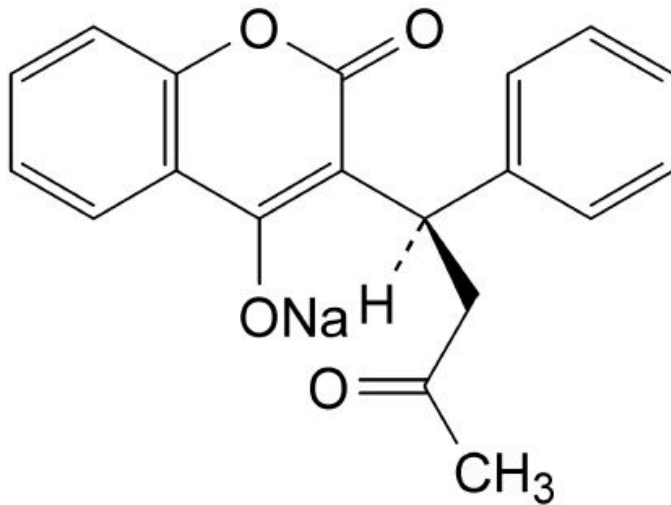
bis[(E)-7-[4-(4-fluorophenyl)-6-isopropyl-2-[methyl(methylsulfonyl)amino] pyrimidine-5-yl](3R,5S)-3,5-dihydroxyhept-6-enoic acid] calcium salt



Pravastatin



Warfarin Sodium



and enantiomer

2-oxo-3-[(1*RS*)-3-oxo-1-phenylbutyl]-2*H*-1-benzopyran-4-olate

Подходи за идентифициране

Тестове А и В. Към воден р-р на субстанцията се прибавя солна к-на. Определя се т.т. и се заснема ИЧ-спектър на промитата с вода и изсушена утайка. Филтратът се запазва за тест Е.

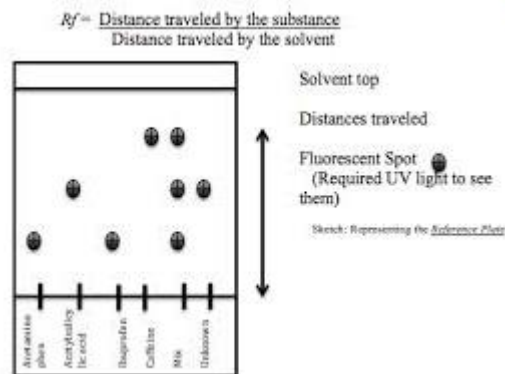
Тест С. ТСХ от определяне на сродни

вещества

Тест D. Цветна качествена реакция

Тест Е. Качествена реакция за доказване

на натриеви йони



Контрол на чистотата - ТСХ

Тест за пригодност на системата

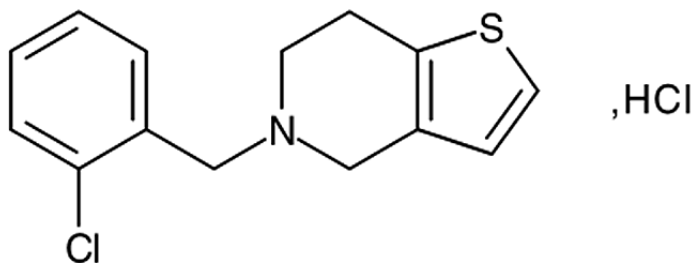
Петната на изследваната субстанция и аценокумарола да са добре разделени

Количествено определяне

Измерва се абсорбцията на разтвор
на изследваната субстанция в
0.1 М р-р на NaOH при 308 nm



Ticlopidine HCl



5-(2-chlorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*c*]pyridine

Идентичност

ИЧ-спектър, доказване на хлориди,
УВ-спектрофотометрия

Заснемат се спектри на разтвори А и В (получен чрез разреждане от А). За р-р А са характерни абс. максимуми-при 268 и 275 nm, а за р-р В – при 214 и 232 nm. Стойностите на отношението на абсорбциите на двата р-ра, измерени при 268 и 275 nm, са съответно 1.1 и 1.2.

Определяне на примеси

ВЕТХ с градиентно елуиране

Граница – 0,1%

Тест за пригодност
– степен на разделяне
- отношение сигнал/шум

The following chromatogram is published for information.

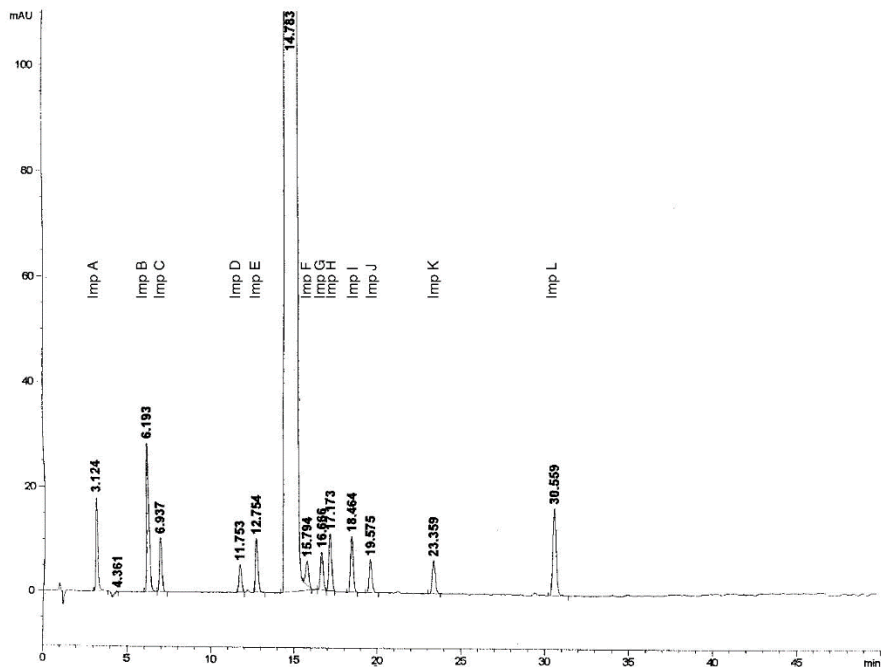


Figure 1050-1. – Type chromatogram for the test for related substances for ticlopidine hydrochloride



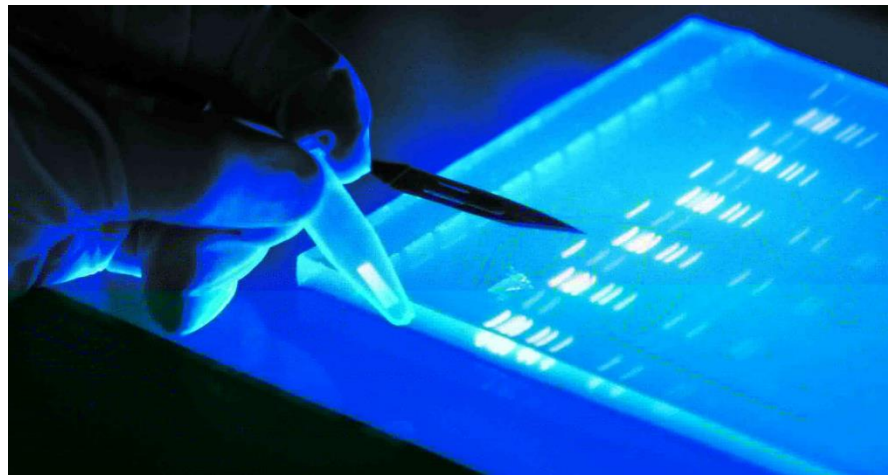
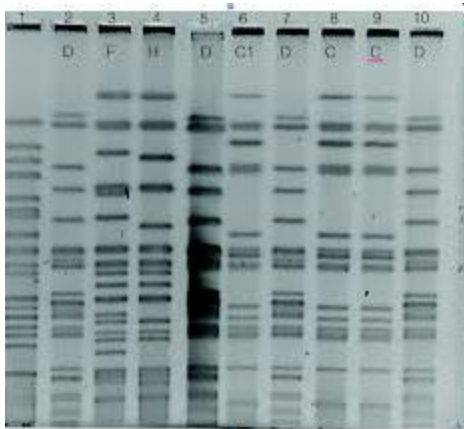
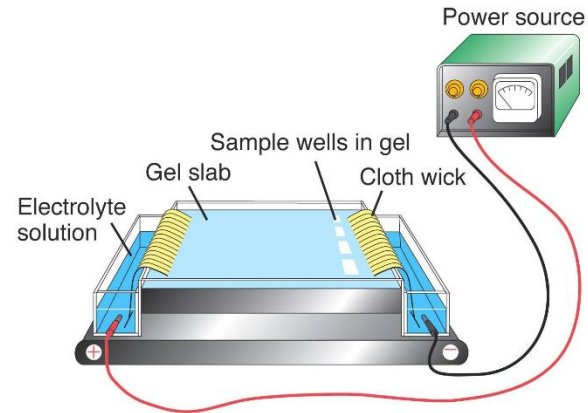
Количествено определяне

Потенциометрично титруване с перхлорна
киселина в ледена оцетна киселина

Heparin Calcium/Sodium

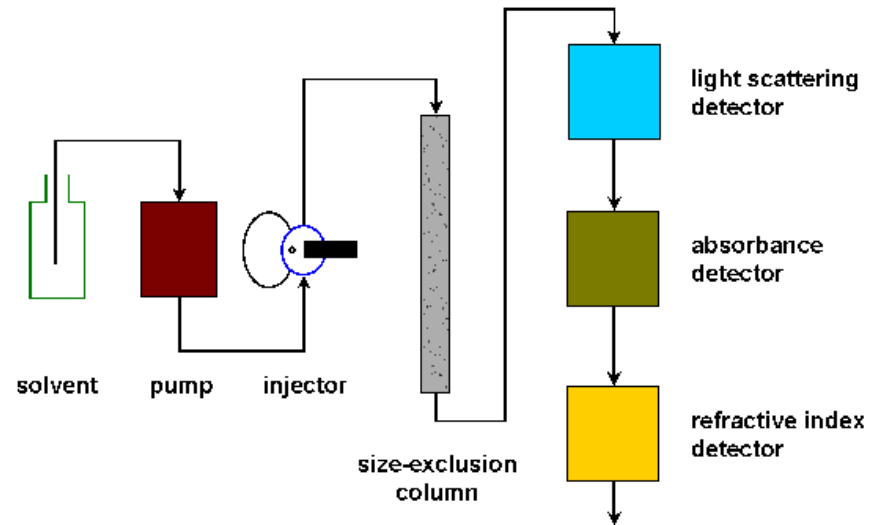
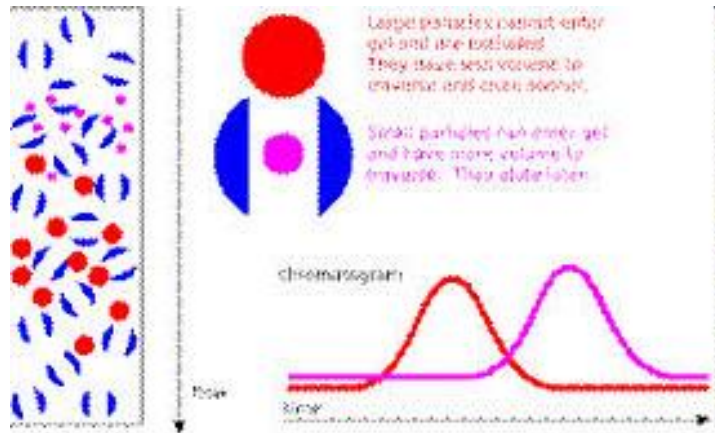
Идентичност

Антикоагулантна активност, вкл.
кол. определяне
Поляриметрия
Електрофореза
Доказване на калций/натрий
электроферограми

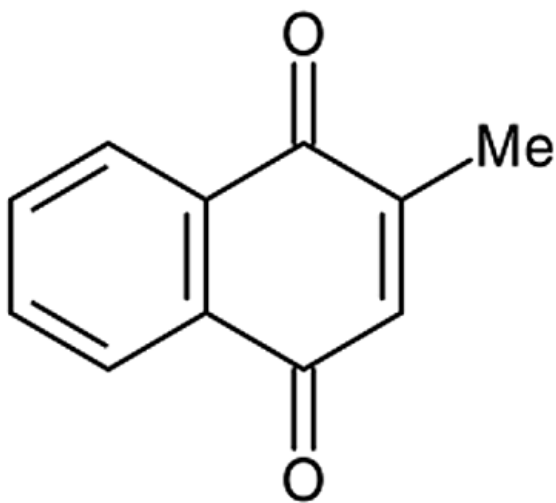


Low-molecular-weight Heparins

Size-exclusion chromatography (изключваща по размери) хроматография



Menadione



2-methyl-naphthalene-1,4-dione

Светлочувствително, бледо-жълто кристално в-во, неразтворимо във вода, малко разтворимо в етанол.



Идентичност

ИЧ-спектър, точка на топене,

цветни качествени реакции:

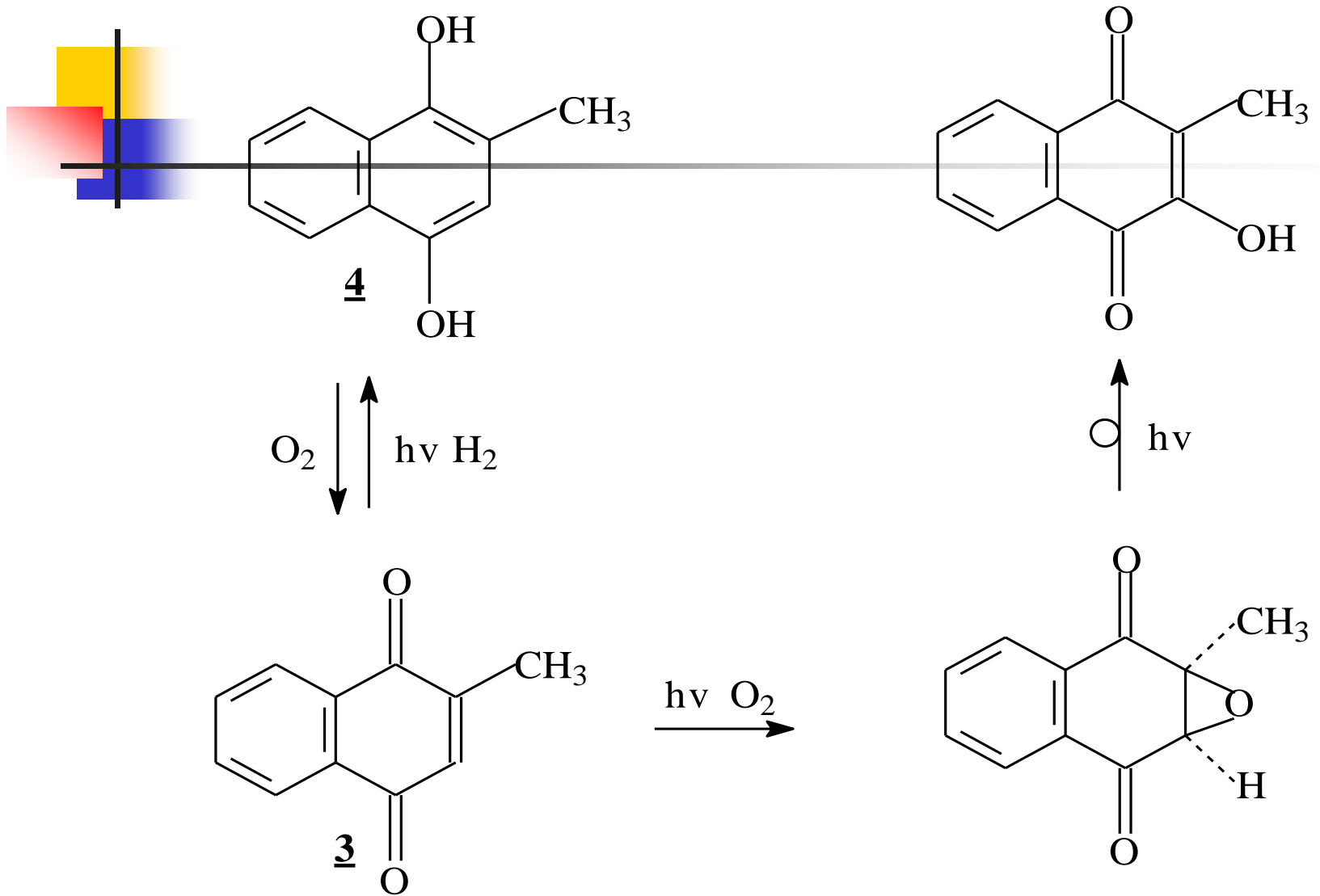
-реакция с етилацетат в амонячна среда, след

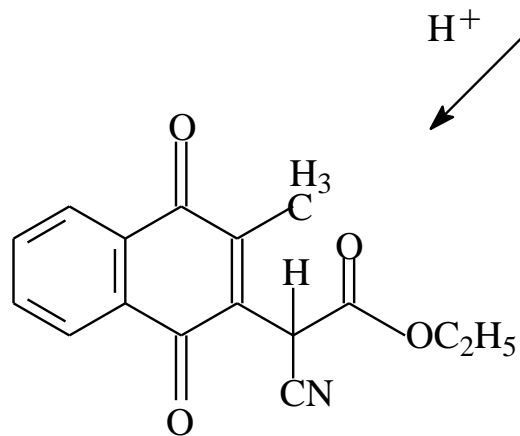
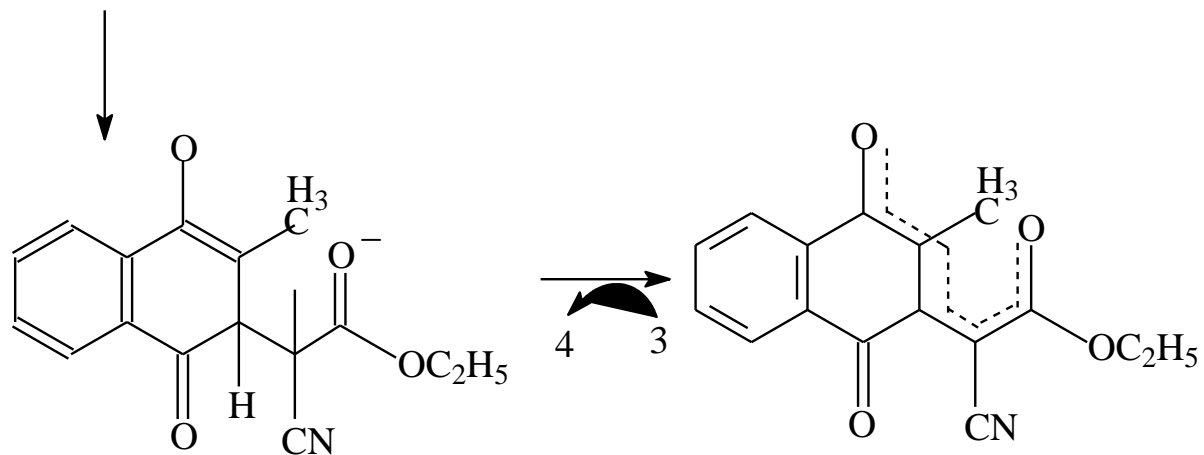
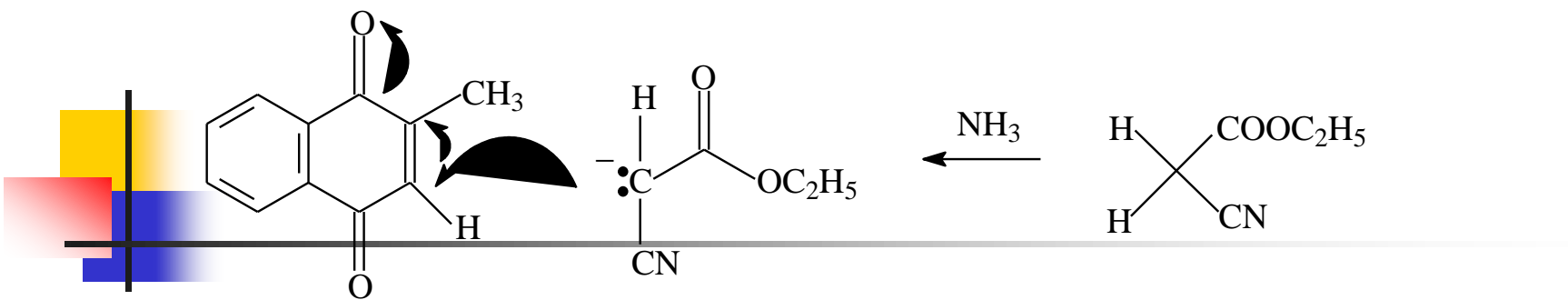
взаимодействие със солна к-на полученото

оцветяване изчезва

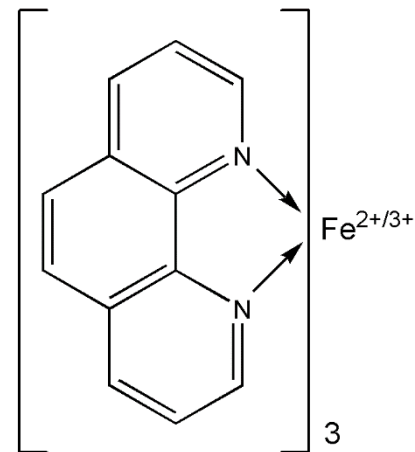
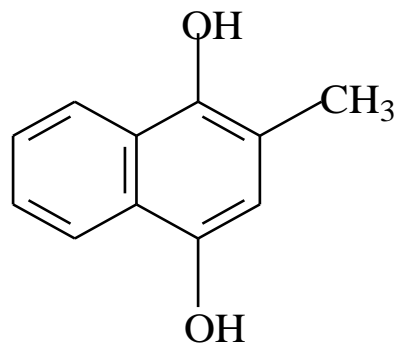
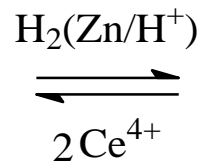
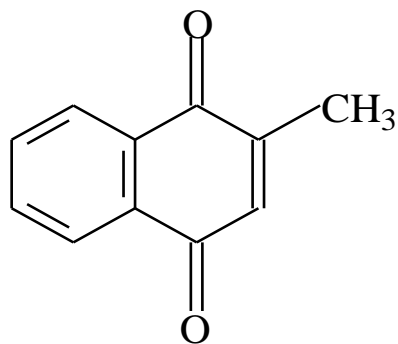
-след прибавяне на солна к-на към алкохолен р-р на

субстанцията, се получава червено оцветяване





Количественно определяне



Н.В.Светлочувствителност

Тест за Menadione - ТСХ

Количествено определяне
на субстанцията

ВЕТХ с нормални фази

-сорбент – силикагел

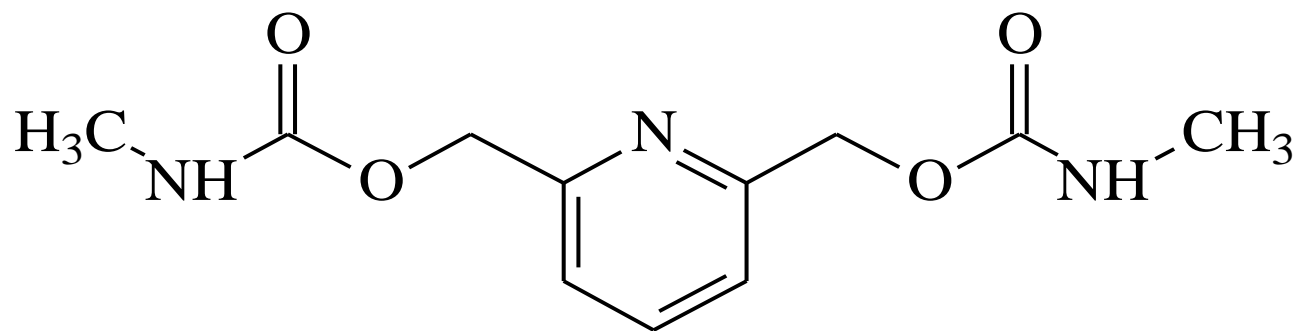
-компоненти на подвижната фаза –

октанол, диизопропилов етер и хептан

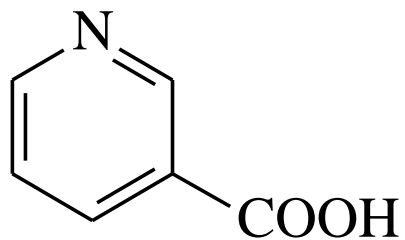


Pyridine derivatives

Pyridinol Carbamate



Nicotinic acid



2,6-pyridindimethanol-bis(methylcarbamate)