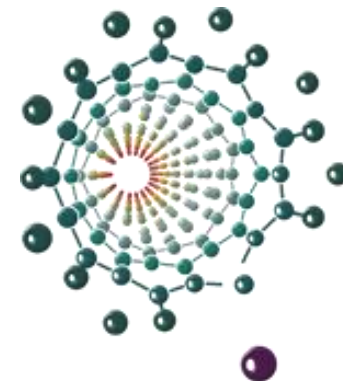




EPR

Primene u farmaciji



Prof. Miloš Mojović



EPR – osnovni principi

- EPR laboratorija na FFH
- EPR – primena u: fizičkoj hemiji, biologiji, medicini, farmaciji ...

<http://www.bioscope.ffh.bg.ac.rs/eplab/about-us/>



Izgled aparature za EPR u spektrometriju u X i L oblasti:

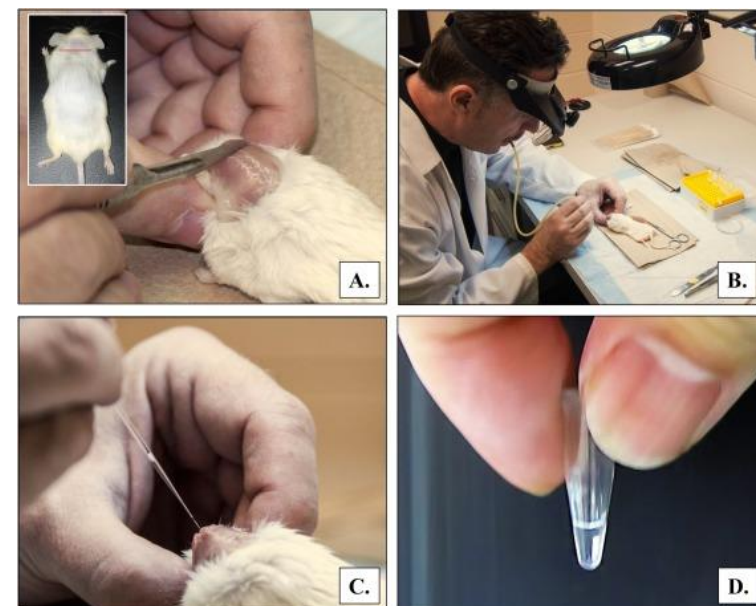
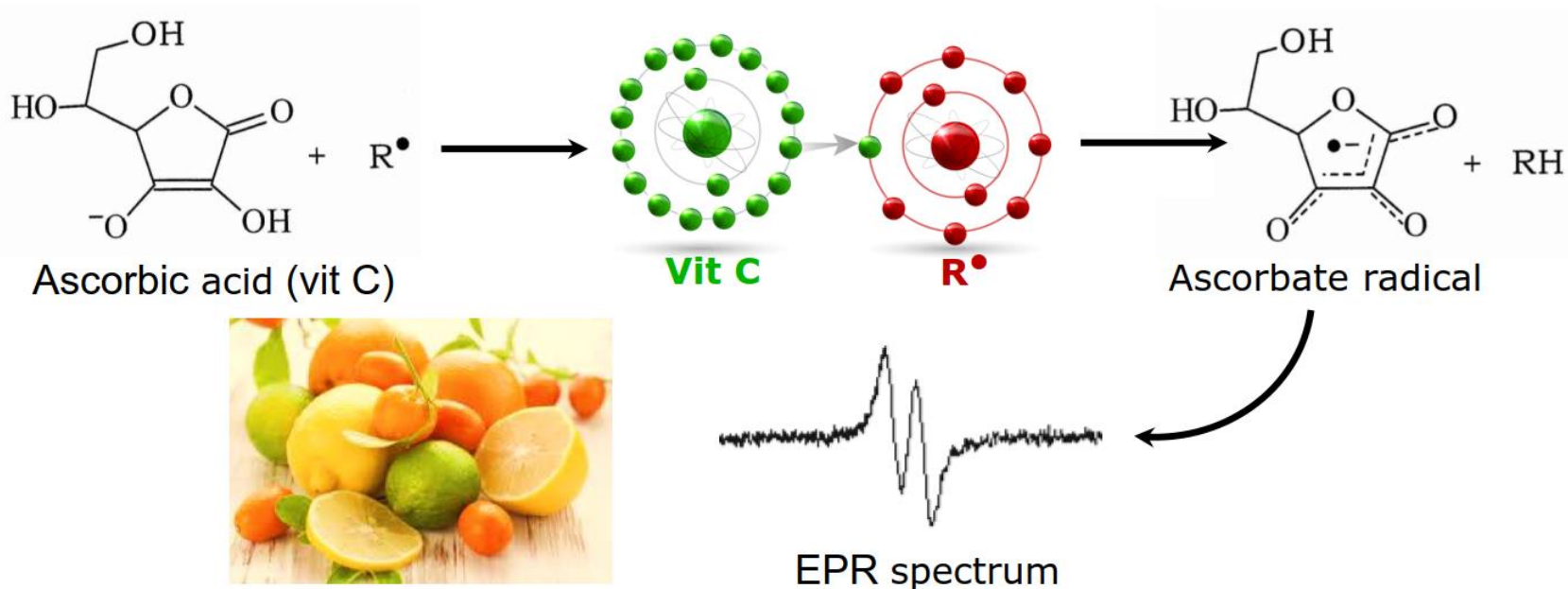
EPR Bruker Biospin Elexsys II E540

- X- (9.5GHz), L-band (1.2GHz)
- Rezonatori
- Različita snimanja: tN₂ (100-350K), tHe (4-100K)
- EPR spektroskopija i imidžing



Šta je EPR?

- Detektujemo nesparene elektrone.
- Slobodni radikali, prelazni metali.
- Jedina poznata tehnika koja direktno detektuje slobodne radikale.

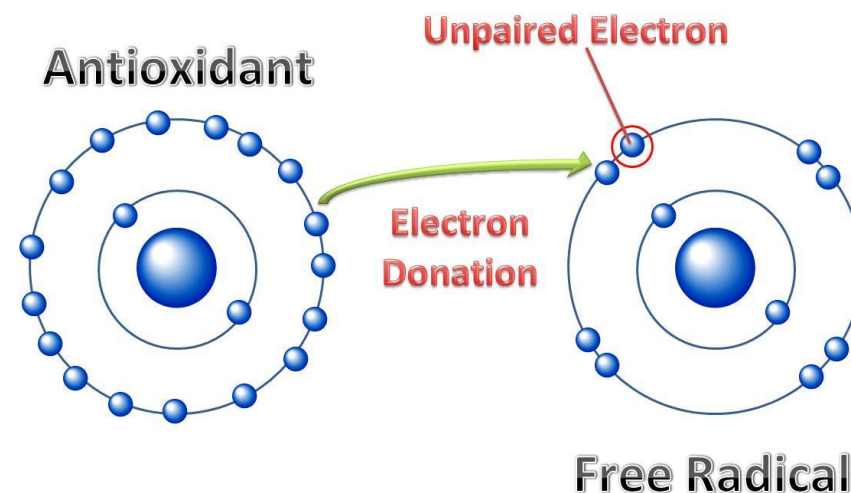




EPR Lab

Slobodni radikali i antioksidansi

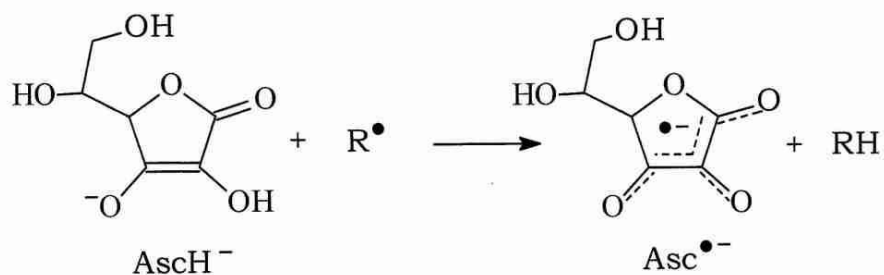
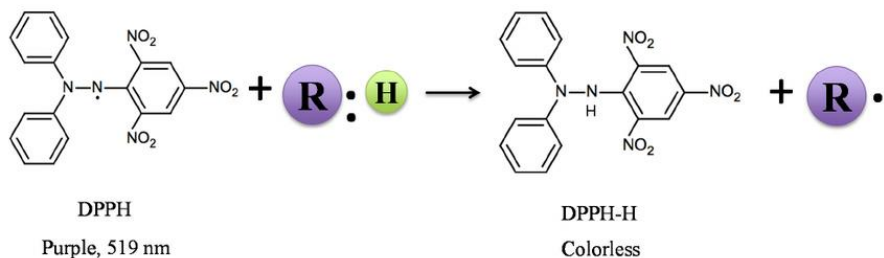
- **Šta su slobodni radikali?**
- Izazivaju oštećenja DNK, proteina, ćel. membrana, povezani sa patofiziološkim stanjima.
- **Da li su slobodni radikali samo štetni?**
- **Šta su antioksidansi?**
- Sprečavaju ili usporavaju oksidaciju drugih molekula uklanjajući slob. radikale.
- Ima ih u biljkama, raznim tradicionalnim lekovima, hemijski ih generišemo ...



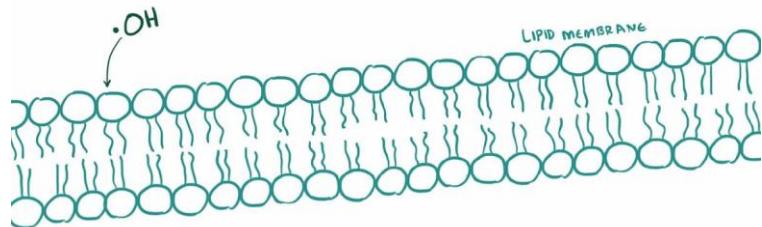


EPR metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti



LIPID PEROXIDATION



- EPR je **jedina pouzdana metoda** za ovu svrhu.
- Druge metode često se baziraju na uklanjanju biološki-irelevantnih radikala (npr. DPPH ili ABTS) kao i puko oslanjanje na analitiku bez konkretnih dokaza o uticaju na ROS ili RNS.
- EPR spektroskopija može:
 - Odrediti kapacitet AOX da ukloni **•OH, •O₂, NO•** ... (generatorski sistemi).
 - Odrediti kapacitet AOX da ukloni dugoživeće radikale (**CC•, Asc•**).
 - Odrediti kapacitet AOX da speči **lipidnu peroksidaciju** u membrani indukovanu ROS i RNS (primenom lipozoma, micela i ćel. kultura).



EPR metode

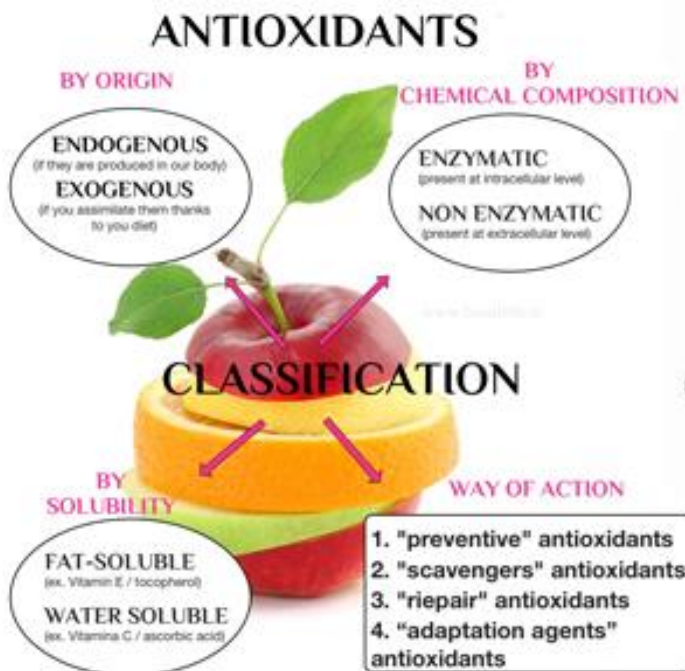
Određivanje AOX kapaciteta vodonerastvornih jedinjenja

Šta raditi sa vodonerastvornim AOX?

- Najbolji AOX su često vodonerastvorni i ovo je problem koji se teško (ili loše) rešava.

- EPR može rešiti i ovaj problem pomoću posebne metode.
- Ova metoda je inače ekskluzivno razrađena u **EPR Lab FFH**.

Nakarada et. al. Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds toward biologically relevant free radicals: example of avarol, J Liposome Res. 30 (2019) 218-226.



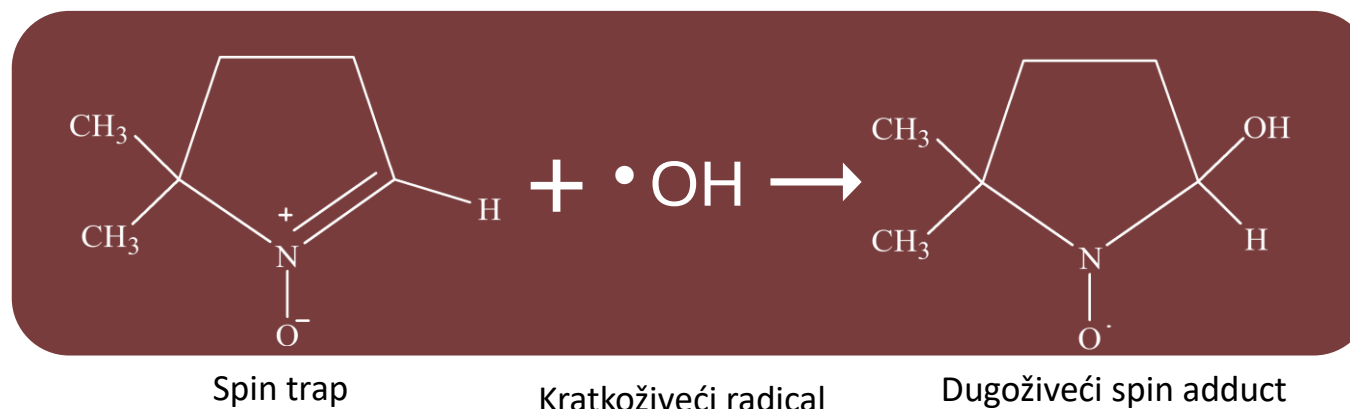


EPR metode

Određivanje AOX kapaciteta za uklanjanje kratkoživećih radikala

EPR spin-trapping

- Oksidativni stres je uzrok mnogih patofizioloških stanja.
- Neke metode su posredne (spektrofluorimetrija). Problemi: ima artefakata.
- EPR može meriti $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$, $\text{NO}\cdot$ (čak i *in vivo*) pomoću spin-trap metode.
- **Princip spin-trap metode:**
- Ovako možemo detektovati ROS intra- i ekstracelularno.

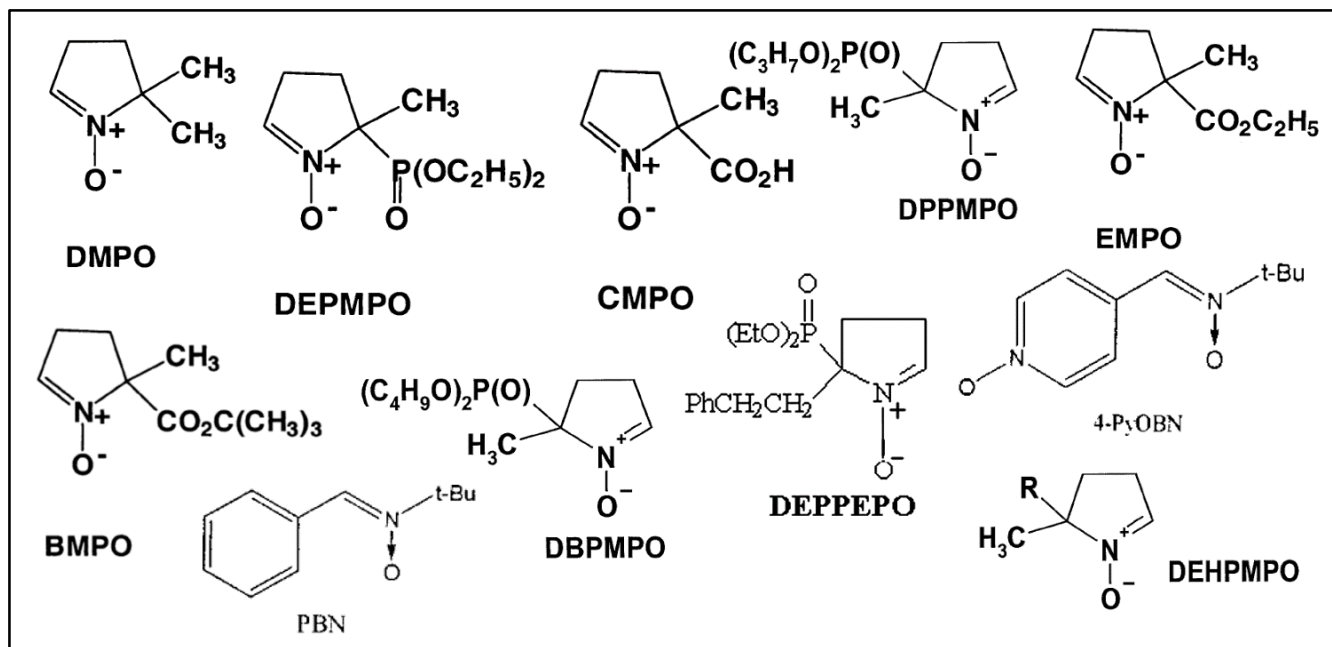




EPR metode

EPR spin-trapping

- Šta mora da poseduje jedan dobar spin-trap?
- Spin-trap market?



Spin-trap market

Problemi:

- Preskupi su.
- Često sadrže nečistoće.
- Degradiraju se na višim T.
- Imaju isuviše složen EPR signal.
- U višim dozama letalni.
- Adukti skloni raspadanju.
- Adukti podložni i redukciji i oksidaciji.
- Složena kinetika.

Benefiti:

- Neprocenjivi.



EPR metode

EPR spin-traping *in vivo*?

Type	Name	Structure	Lipophilicity	Lifetime of O ₂ ^{•-} Products	Detection	Applications
Spin Traps	PBN		10	–	R [•] RO [•]	Detection of R-C [•] <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .
	POBN		0.15	–		
	DMPD		0.06	0.9 min	OH [•] , O ₂ ^{•-} , R [•] , RO [•]	Cell-free and extracellular detection of OH [•] , O ₂ ^{•-} , R [•] , S [•] .
	EMPD		0.33	10 min	OH [•] O ₂ ^{•-} RO ₂ [•]	
	DEMPD		0.16	17 min	R [•] S [•]	
	BMPD		–	23 min	OH [•] , O ₂ ^{•-} , S [•]	

- Detekcija O₂^{•-} radikala u biosistemima limitirana je sporom kinetikom O₂^{•-} trapovanja (~55 M⁻¹ s⁻¹)
- Biodegradacija adukata (redukcija do HA i oksidacija u sekundarne nitrone).
- Ali, ciklični HA reaguju sa O₂^{•-} 100 puta brže nego trapovi!
- Mogu se takmičiti sa ćelijskim AOX i reagovati sa intraćelijskim O₂^{•-}.
- Neki spicificni HA ...



EPR metode

Tehnika upotrebe hidroksilamina

Type	Name	Structure	Lipophilicity	Lifetime of O2 ⁻ Products	Detection	Applications
Cyclic Hydroxylamines	PP-H		0.005	More than 4 hours in blood plasma, in cells and tissue	O ₂ ⁻ ONOOH Aryl-O [•]	Quantitative measurements of extracellular O ₂ ⁻ and quantification of intracellular O ₂ ⁻ in cells and tissue samples. <i>In vivo</i> O ₂ ⁻ detection.
	CAT1-H		0.01			
	CP-H		0.05			
	CM-H		27	Can be used <i>in vivo</i> i.p. and i.v. injections		
	TMT-H		35			
	TM-H		43			

- Nedostatak specifičnosti HA prevazilazimo korišćenjem inhibitora proizvodnje $O_2^{\bullet-}$ i SOD.
- Bitno je naelektrisanje probe (katjonska, anjonska, neutralna).
- Bitna je lipofilnost i ćelijska propustljivost za specifičnu probu.
- *Site-specific* $O_2^{\bullet-}$ detekcija sa visokom osetljivošću.
- Neki specifični spin-trapovi ...



EPR metode

EPR spin-trapovi

CDMIO . K

[4-Carboxy-2,2-dimethyl-2H-imidazole-1-oxide . K]

ALX-430-089-M010 10 mg

ALX-430-089-M050 50 mg

Water soluble, **non-cell permeable spin trap**. Stable against reduction by vitamin C and thiols.

DMPIO

[2,2-Dimethyl-4-phenyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-088-M010 10 mg

ALX-430-088-M050 50 mg

Widely used, **cell permeable** and highly sensitive **spin trap**. Alternative to PBN (Prod. No. ALX-430-082). More lipophilic than TMIO (Prod. No. ALX-430-073). Does not trap the superoxide radical.

TMPO

[3,3,5,5-Tetramethyl-pyrroline-N-oxide; M4PO]

ALX-430-084-M100 100 mg

ALX-430-084-M500 500 mg

Solid cell permeable spin trap.

TMIO

[2,2,4-Trimethyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-073-M050 50 mg

ALX-430-073-M250 250 mg

ALX-430-073-G001 1 g

Selective, **cell permeable** and non-toxic **spin trap** for peroxynitrite and secondary O-, C-, S-, and N-centered free radicals.

MCPIO

[2-(2-Carboxyethyl)-2-methyl-4-phenyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-083-M010 10 mg

ALX-430-083-M050 50 mg

Cell permeable, stable spin trap. Alternative to PBN (Prod. No. ALX-430-082).

POBN (high purity)

[α -(4-Pyridyl 1-oxide)-N-tert-butyl nitron]

ALX-430-091-M500 500 mg

ALX-430-091-G001 1 g

Cell permeable hydrophilic spin trap for both *in vivo* and *in vitro* studies. Water soluble analog of PBN (Prod. No. ALX-430-082). Low paramagnetic impurities.

TEMPONE-H . HCl

[1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine . HCl]

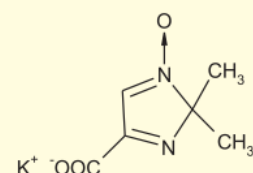
ALX-430-071-M010 10 mg

ALX-430-071-M050 50 mg

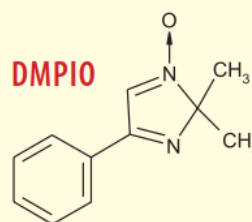
ALX-430-071-M250 250 mg

Very effective, **cell permeable** and non-toxic **spin trap** for the detection of superoxide radical and peroxynitrite.

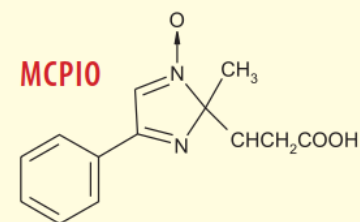
Chemical Structures



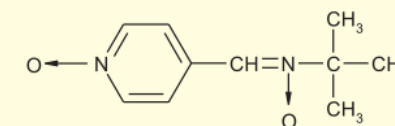
CDMIO . K



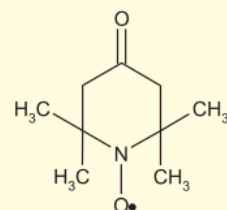
DMPIO



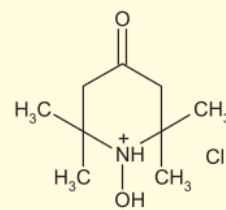
MCPIO



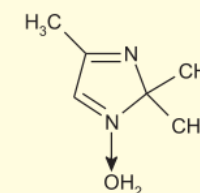
POBN (high purity)



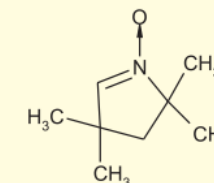
TEMPONE



TEMPONE-H . HCl



TMIO



TMPO



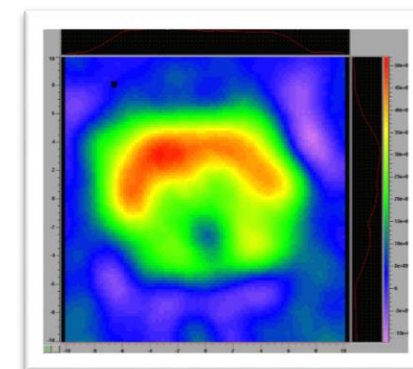
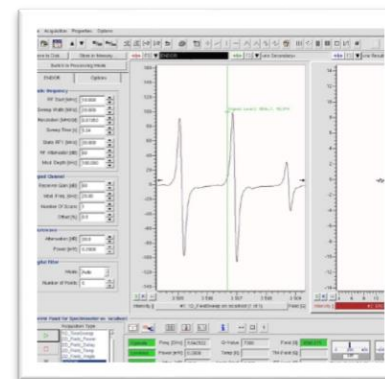
EPR metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vivo*

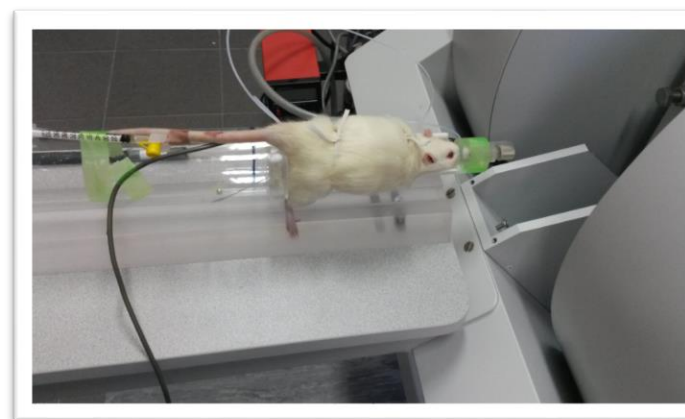
Da li su mogući *in vivo* EPR eksperimenti?

- Da li možemo vizualizovati performanse jednog antioksidansa *in vivo*?
- Možemo, upotrebom kombinovane EPR spektroskopije i imidžinga.
- Koriste se spinske probe ili NO trapovi (za sada).

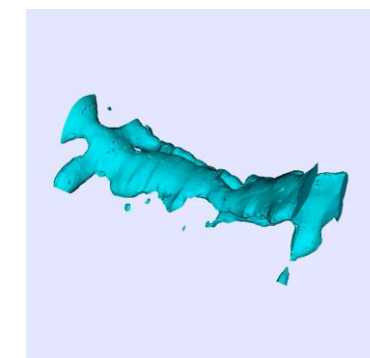
Slobodni radikali *in vivo*
EPR spektroskopija



Slobodni radikali *in vivo*
2D EPR imidžing



In vivo EPR merenje



Slobodni radikali *in vivo*
3D EPR imidžing

- L-band EPR spektroskopija i imidžing.
- Svi eksperimenti sa životinjama moraju se izvoditi u skladu sa domaćim i međunarodnim zakonima "Animal testing regulation laws".



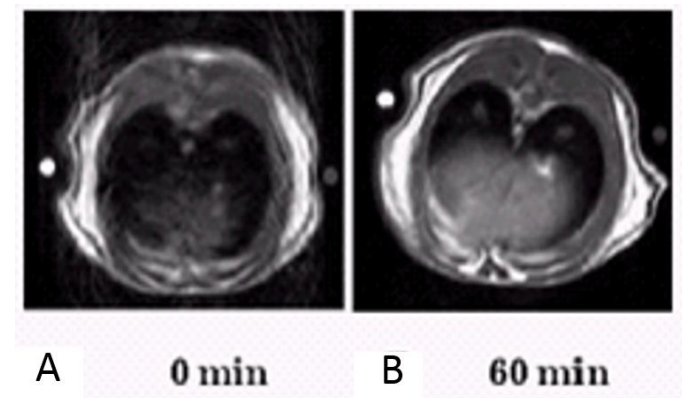
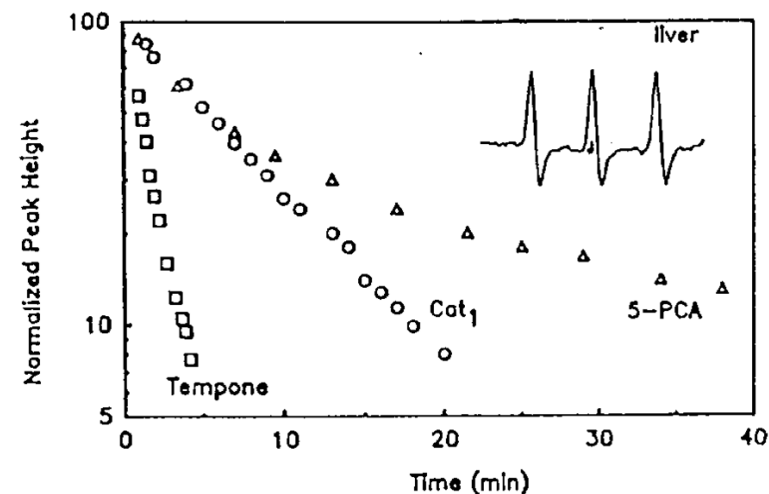
EPR metode

In vivo spektroskopija malih životinja za detekciju NO i ROS



Ispitivanje farmakokinetike nitroksida

- L-band EPR rezonatori u koje smeštamo male životinje.
- EPR signal se smanjuje pod uticajem ispiranja probe ili delovanjem endogenih antioksidanasa.
- Možemo pratiti BBB propustljivost ili totalni antioksidativni kapacitet tkiva i organa.
- Rezultati se porede sa onima koji se dobijaju kada se aplicira potencijalni lek.
- Paramagnetski efekat nitroksida može istovremeno poslužiti i kao MRI kontrastni agens.



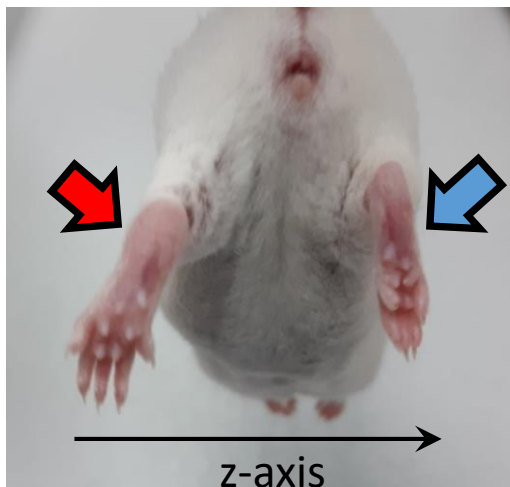


EPR metode

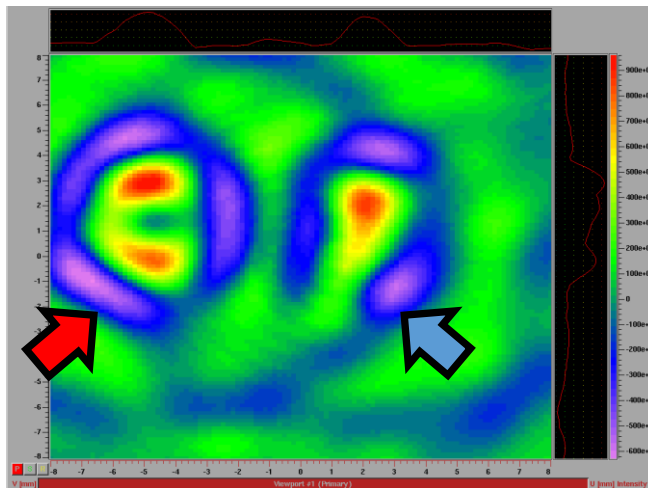
Određivanje efikasnosti antiinflamatornih lekova *in vivo*

Inflamacija

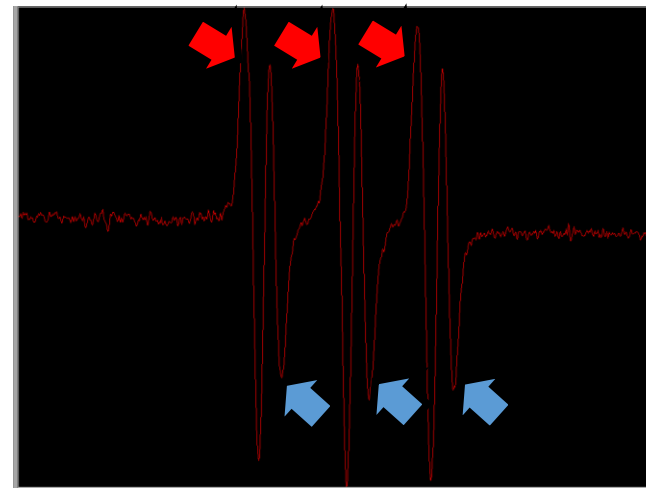
- Indukujemo inflamaciju (npr. pomoću LPS ili lokalno).
- Snima se redukcija signala spinske probe *in vivo* kao posledice poremećenog redoks statusa.
- Može se raditi i EPR spektroskopija i *imaging*.



Miš - 2.5 meseci starosti
(indukovana inflamacija leve noge)



In vivo 2D EPR slika u x-z ravni koja prikazuje inflamiranu i zdravu nogu



In vivo 1D gradijentni EPR spektar duž z-ose, snimljen posle 10 min



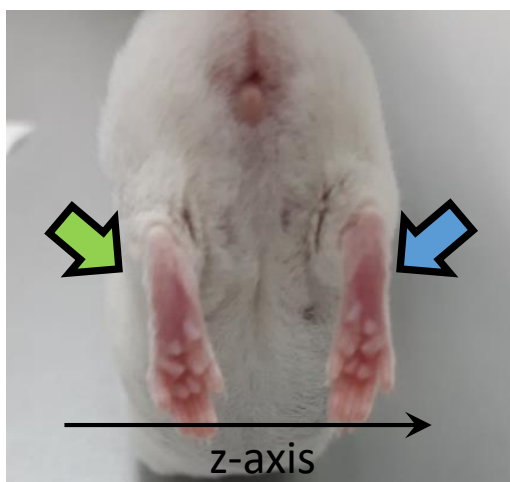
EPR metode

Određivanje efikasnosti antiinflamatornih lekova *in vivo*

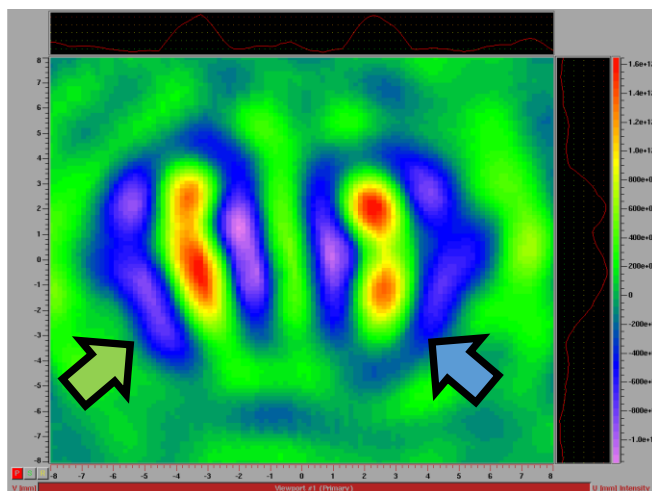


Delovanje antiinflamatornog leka

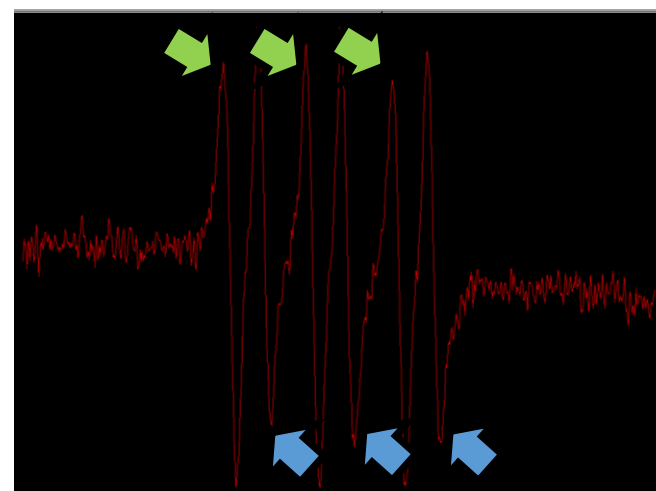
- Tretiramo inflamaciju.
- Snima se redukcija signala spinske probe *in vivo* kao posledice poremećenog redoks statusa.
- Može se raditi i EPR spektroskopija i *imaging*.



Miš - 2.5 meseci starosti
Tretirana inflamirana leva noga



In vivo 2D EPR slika u x-z ravni koja
prikazuje tretiranu i zdravu nogu



In vivo 1D gradijentni EPR spektar duž
z-ose, snimljen posle 10 min



EPR metode

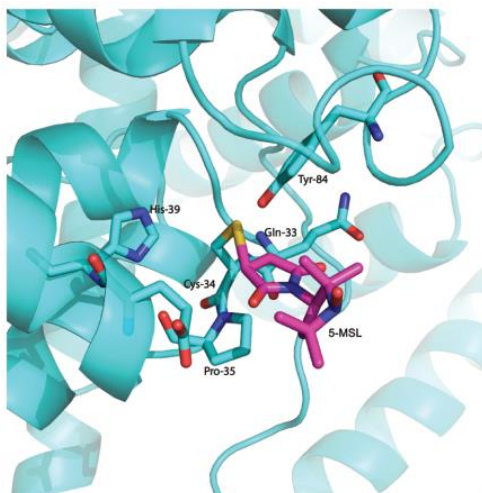
Spinsko obeležavanje

Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disorder, caused by an impaired function of β -glucocerebrosidase, which results in accumulation of glucocerebroside in cells.

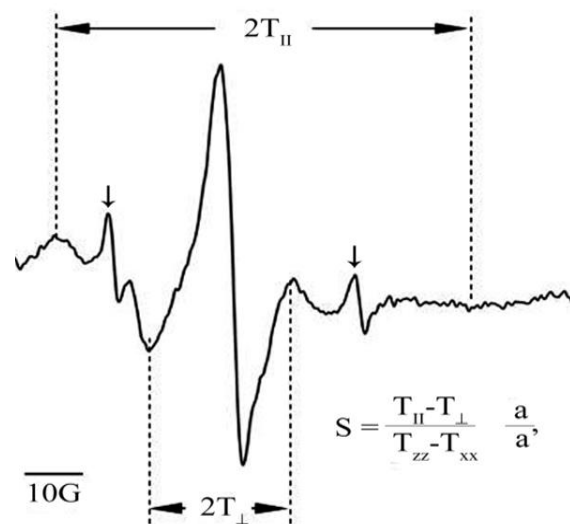
Pavićević et. al. J. Phys. Chem. B, 10898–10905, 118 (2014).

EPR spinsko obeležavanje membrana i proteina

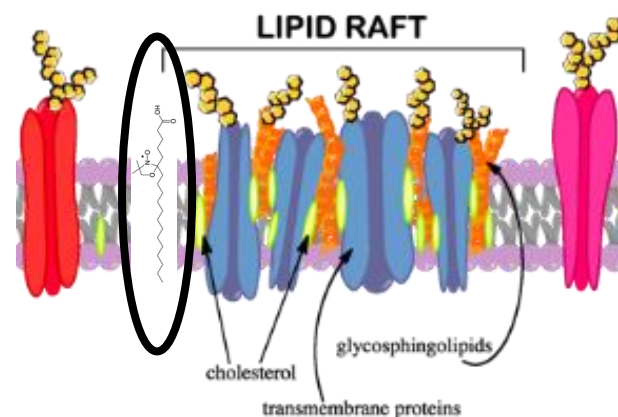
- Koristimo specijalno dizajnirane EPR-aktivne molekule (spinske obeleživače).
- Obeležavamo membrane i proteine.
- Možemo detektovati lipidnu peroksidaciju od strane ROS/RNS.
- Možemo ispitivati konformacione promene proteina (npr. u interakciji sa lekovima)
- Primer: Praćenje efikasnost terapije Gošeeve bolesti lekom Elelyso (obeležavanje membrana PBMC)



Spin-label 5-MSL kovalentno vezan za Cys-34 od BSA



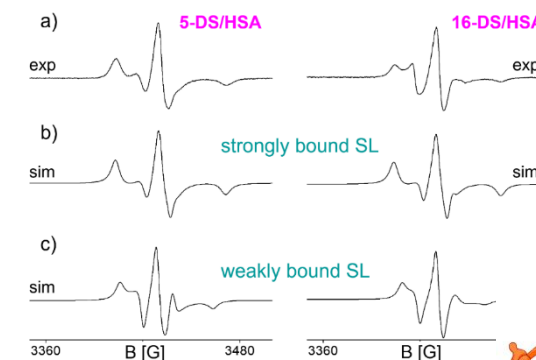
EPR spektar 5-MSL vezan za BSA



5-DS i 16-DS ugrađeni u membranu PBMC

	Strongly bound (SB)	Weakly bound (WB)	Ratio SB/WB
5-DS / control-HSA	0.79 ± 0.08*	0.15 ± 0.02	5.3 ± 0.5
16-DS / control-HSA	0.63 ± 0.06	0.33 ± 0.03	1.9 ± 0.2
5-DS / LABC-HSA	0.49 ± 0.05	0.44 ± 0.04	1.1 ± 0.1
16-DS / LABC-HSA	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.04	1.1 ± 0.1

*The mean value of 15 simulations. The goodness of fits for all simulations was <5.



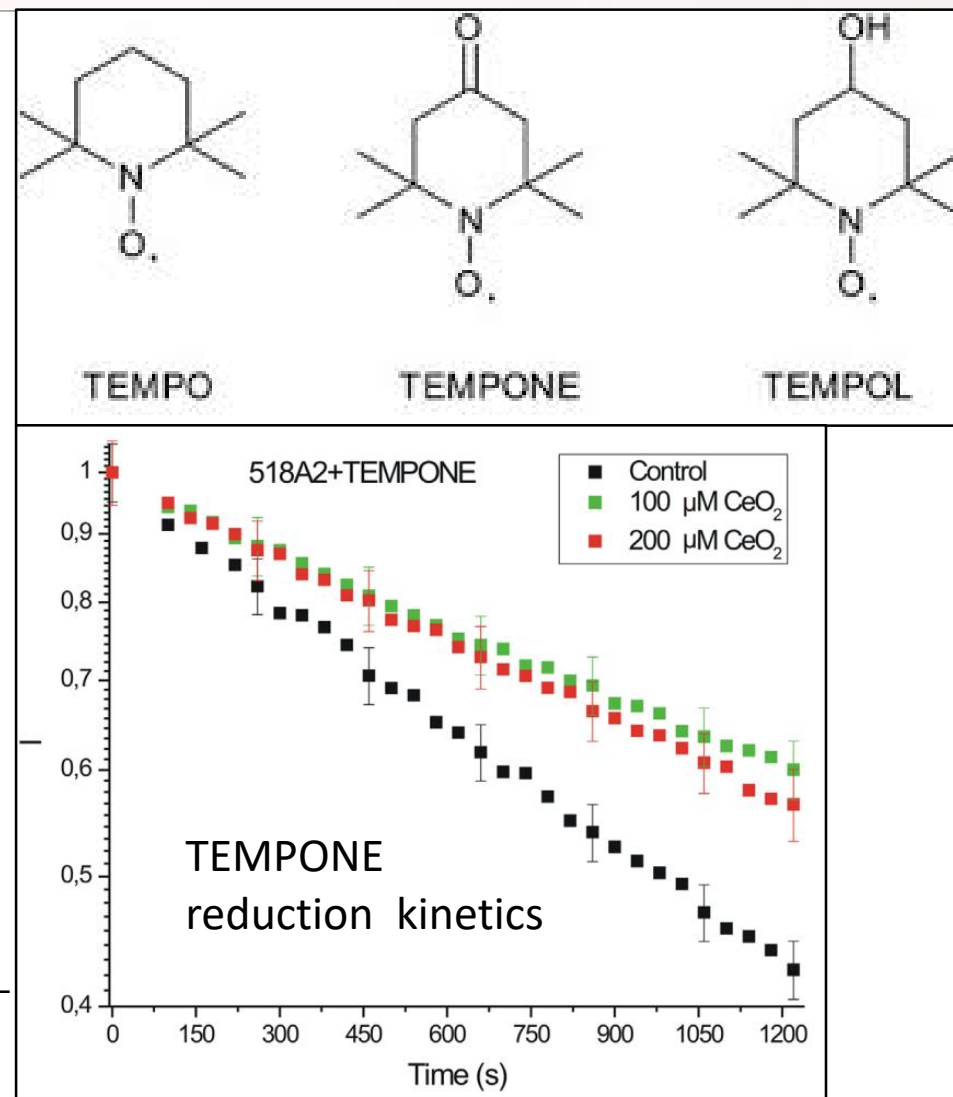


EPR metode

Ispitivanje ćelija kancera

- Efekat leka na proizvodnju ROS od ćelijskih linija melanoma 518A2 i kolorektalnog adenocarcinoma HT-29.
- **EPR** metoda **spin-proba** pomoću TEMPONE.
- Kinetika redukcije spinske probe povezuje se sa količinom slobodnih radikala u sistemu.
- Rezultati pokazuju potencijal novih lekova u smislu oštećenja antioksidativnog kapaciteta kancer ćelija.
- CONP (cerium oxide nanoparticles) pokazuju nisku inhibitorsku aktivnost za zdrave humane ćelije.

Pesic et. al. Chemico-Biological Interactions 232, 85–93 (2015).



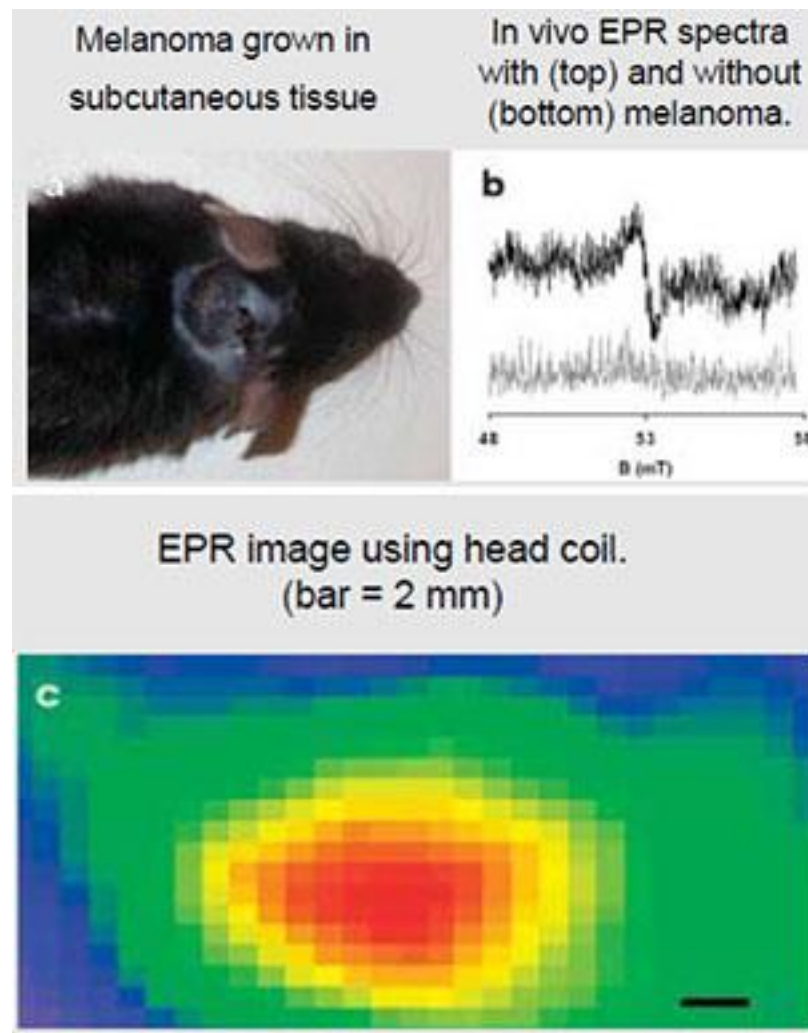


EPR metode

EPR spektroskopija i imidžing - koža

Primena u farmaciji - koža

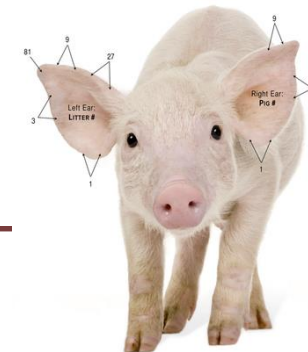
- Direktino ispitivanje uticaja leka na prisustvo slobodnih radikala u koži.
- Lek može ili namerno generisati radikale ili ih uklanjati.
- Ispitavanje delovanja UV zračenja na kožu (sa i bez leka).
- Ispitivanje isporuke lekova kroz kožu (integrisanih u liposome ili miclele).
- Praćenje kontrolisane isporuke lekova kroz kožu.





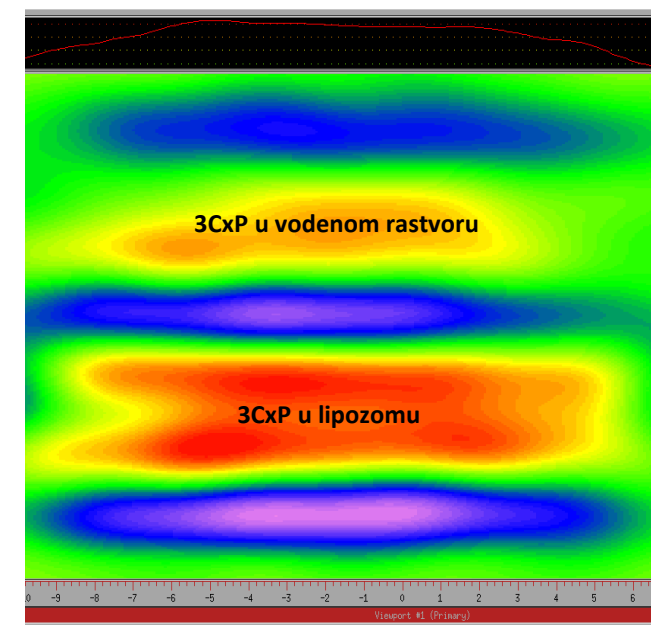
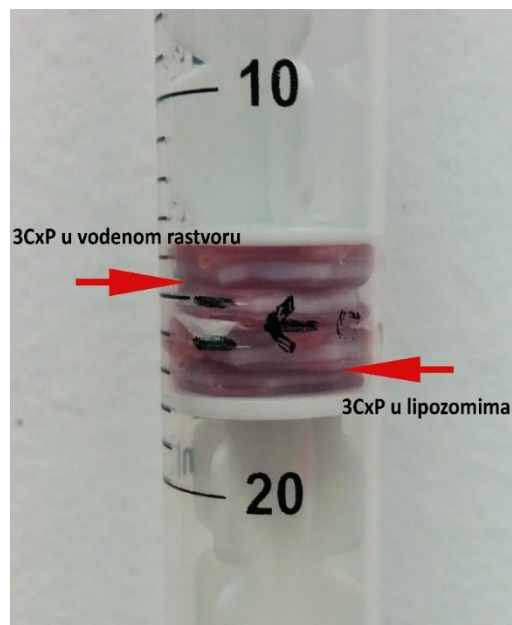
EPR metode

Ispitivanje prodiranja kozmetičkih preparata i kožu *ex vivo*



Primer: primena u farmaciji – prodiranje u kožu

- Ispitivanje signala 3CxP probe kao zamene za aktivnu komponentu leka.
- Cilj je ispitivanje isporuke lekova kroz kožu (razlika: vodeni rastvor leka i lekova integrisanih u liposome).
- Krajnji cilj je kontrolisana isporuke lekova kroz kožu.



Osim toga što je evidentno dublje prodiranje lipozoma kroz kožu (nego vodenog rastvora), primetna je i razlika u nivou redukcije signala 3CxP probe askorbatom.



Još neke primene u farmaciji

Zašto je potrebno detektovati slobodne radikale u lekovima?



- Ima 5 oblasti gde nam EPR može pomoći:

I. Detekcija i procena degradacije

- Foto
- Termalna
- Hemijska

II. Optimizacija stabilnosti & rok trajanja

- Stabilnost leka
- Antioksidansi
- Efikasnost

III. Praćenje hem. reakcija

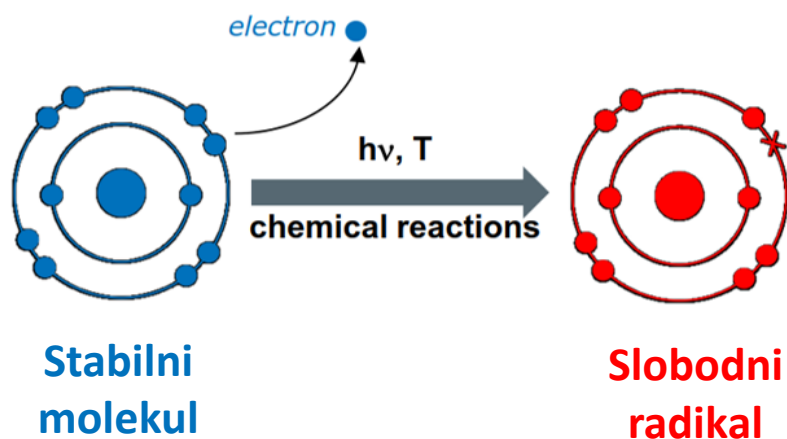
- Optimizacija prinosa
- Zelena hemija
- Hemikalije

IV. Praćenje sterilizacije

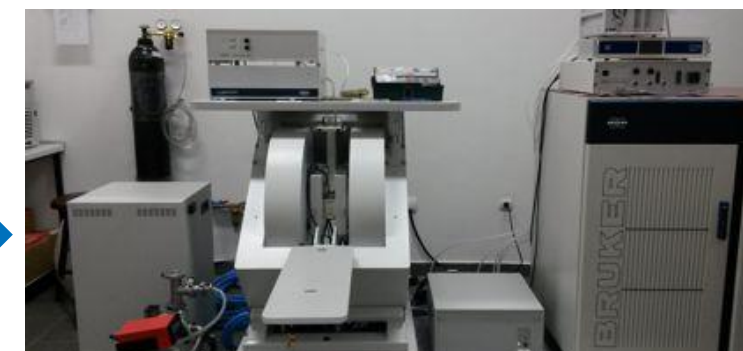
- Ozračivanje
- Termalna

V. Detekcija nečistoća

- Elementi u tragovima
- Toksični nus-proizvodi



Slobodi radikali i prelazni metali





Još neke primene u farmaciji



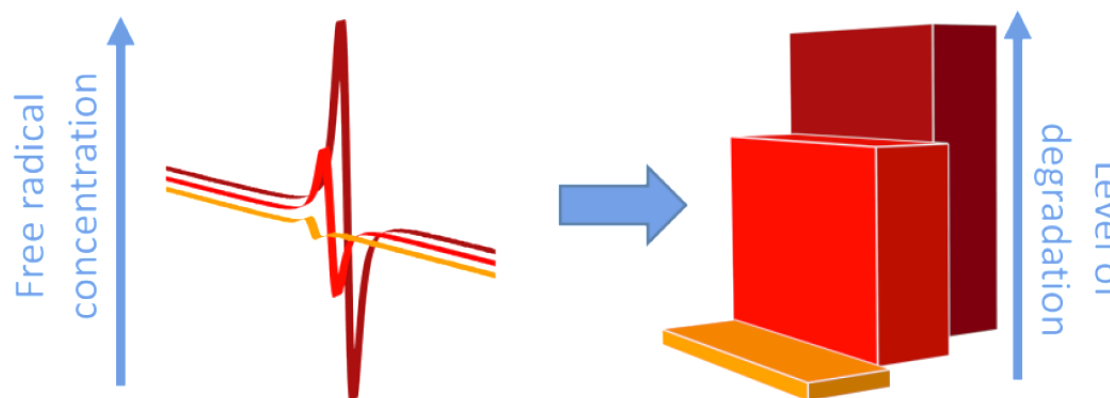
I. Praćenje degradacije leka

Faktori koji utiču na stabilnost farmaceutskog preparata:

- Toplota
- Svetlost (UV, VIS)
- Kiseonik
- Vlaga
- Proces sterilizacije
- Nečistoće
- Pomoćni sastojci

Svi ovi faktori utiču na degradaciji API-ja, dodataka leku ili formulacija

- Degradacioni procesi često uključuju učešće slobodnih radikala i prelaznih metala
- Degradacija se koreliše sa EPR signalom





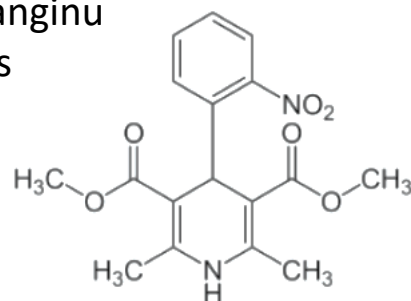
Još neke primene u farmaciji



I. Praćenje degradacije leka

- **Kako EPR ovde može pomoći?**
 - Merenjem tj. određivanjem uzročnika degradacije leka
 - Merenjem nivoa degradacije API-ja, dodataka leku ili formulacija
 - Predvideti rok trajanja tj. stabilnost API-ja, dodataka leku ili formulacija

Lek za anginu
pektoris



Nifedipine

Photodegradation of Nifedipine after exposure to light shows the formation of N-based free radical. The amount of free radicals corresponds to the level of degradation



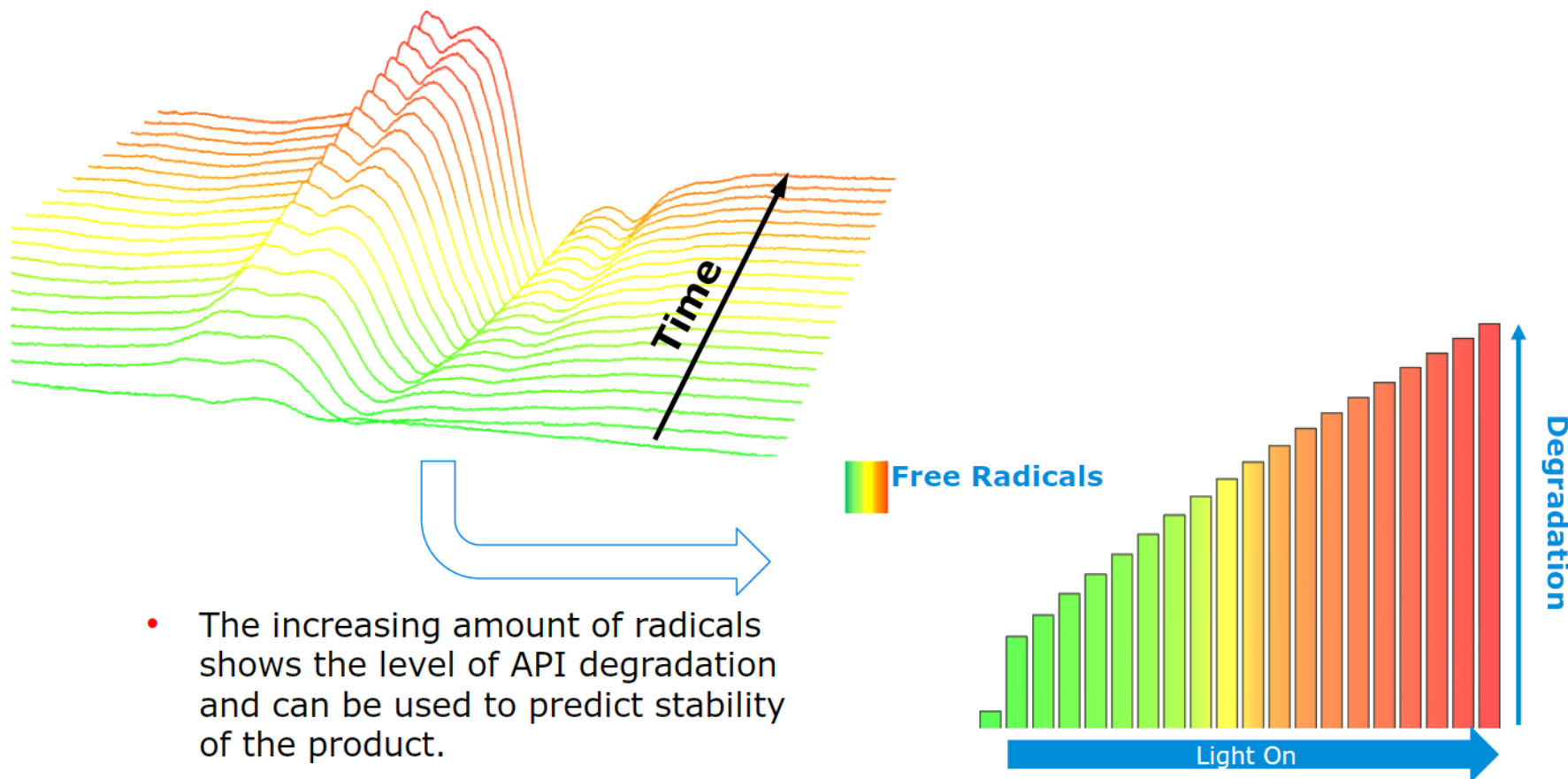


Još neke primene u farmaciji



I. Praćenje degradacije leka

- Vremenska zavisnost visine EPR pika radikala dobijenog degradacijom API-ja



- The increasing amount of radicals shows the level of API degradation and can be used to predict stability of the product.

Williams H.E. and Claybourn M. (AstraZeneca), Predicting the photostability characteristics of active pharmaceutical ingredients using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **(2012)** 38(2) 200



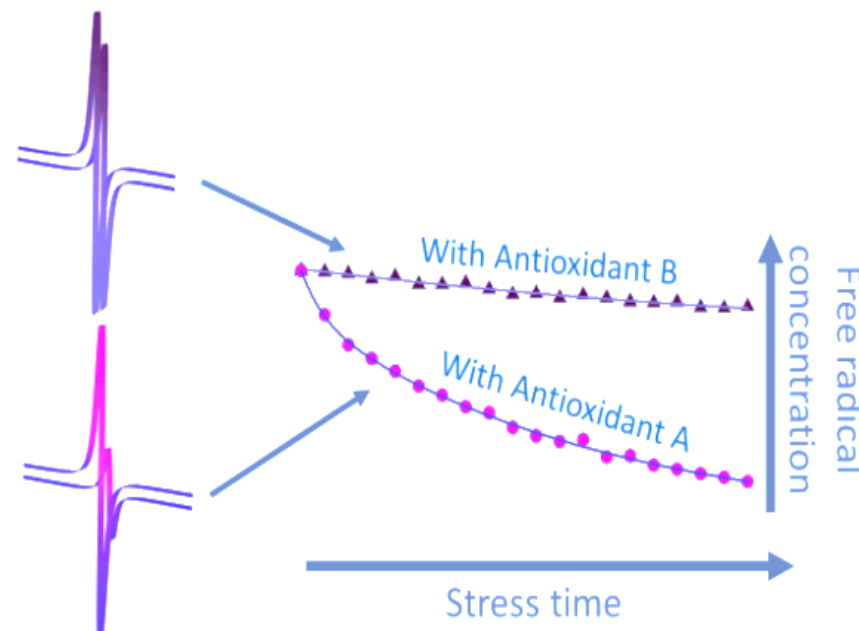
Još neke primene u farmaciji

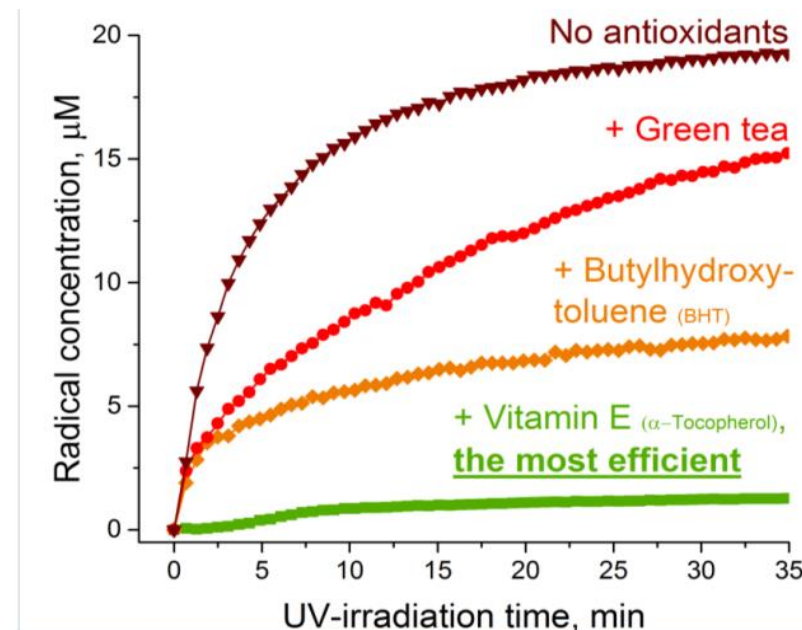
II. Optimizovanje stabilnosti i roka trajanja leka



- Ispitivanje kako indukovani oksidativni stres utiče na oksidaciju/degradaciju u cilju predviđanja stabilnosti leka.
- Tokom testa na stres, lek se podvrgava toploti, delovanju svetlosti i hemijskim agensima
- Na ovaj način se postiže:
 - Bolje razumevanje mehanizama degradacije
 - Određivanje svojstvene stabilnosti i roka trajanja
 - Razvijanje stabilnijih formulacija

Antioxidant A is more effective than antioxidant B at quenching the free radicals in the drug formulation

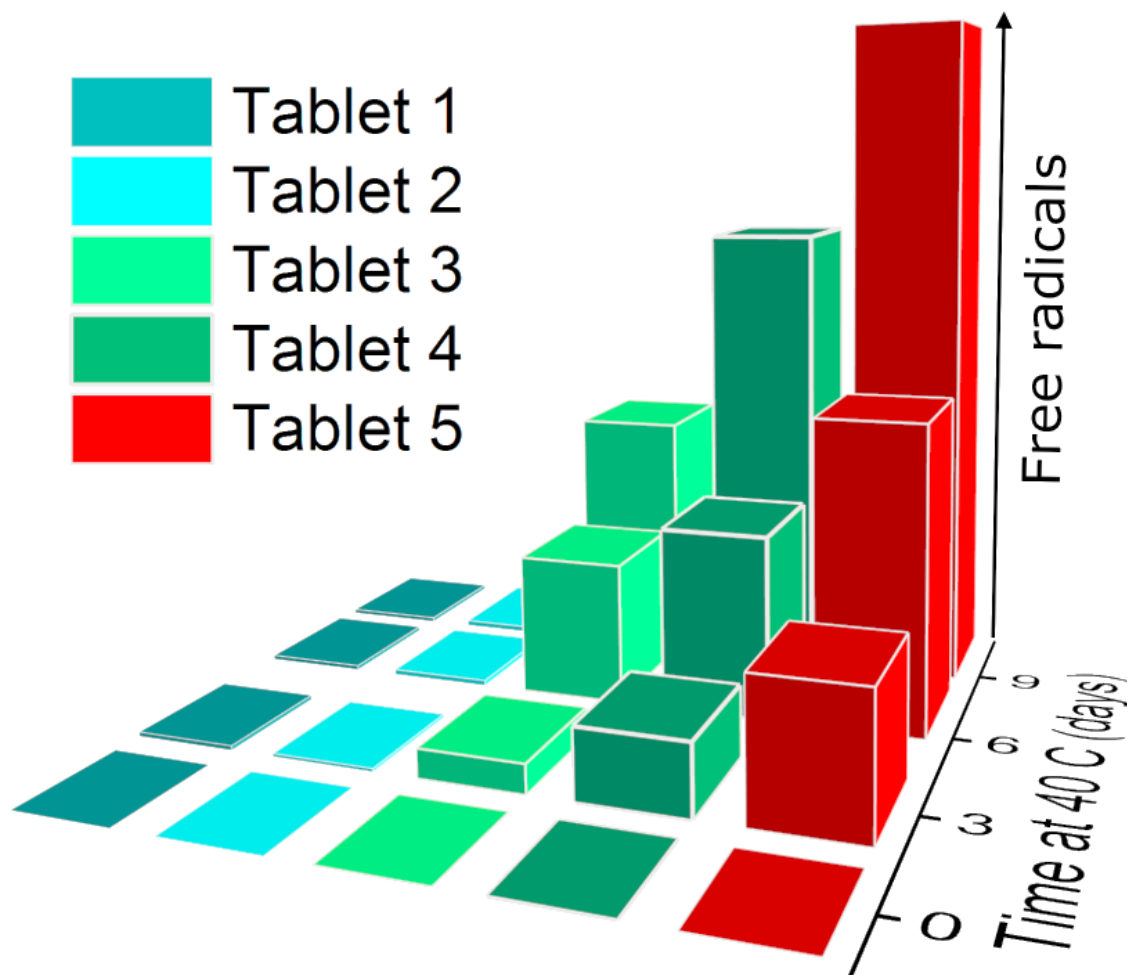






Još neke primene u farmaciji

II. Optimizovanje stabilnosti leka i roka trajanja leka



Određivanje roka trajanja:

- Pet formulacija u obliku tableta se testiraju na temperaturski stres od 40°C, tokom perioda od 10 dana.
- Povećana koncentracija slobodnih radikala u tabletama 3-5, pokazuje skraćen rok trajanja leka.
- Tablete 1&2, koje imaju nisku koncentraciju slobodnih radikala, pokazuju bolji potencijal za dalji razvoj leka.

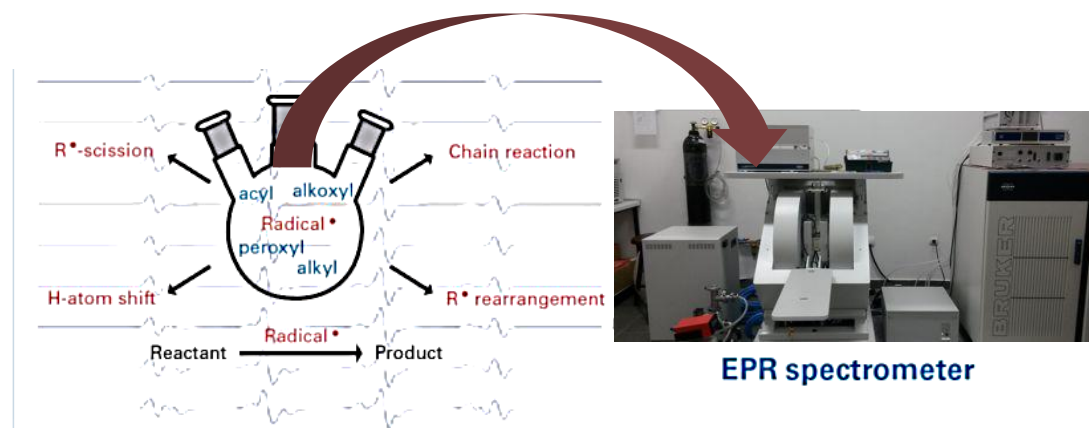


Još neke primene u farmaciji

III. Praćenje toka hemijskih reakcija – proizvodnja leka



- Praćenje reakcije je kritično za proces razumevanja, optimizacije i unapređenje procesa proizvodnje leka.
- Razumevanje reakcionih mehanizama vodi smanjenju troškova i očuvanju kvaliteta finalnog proizvoda.
- Informacije dobijene iz proučavanja kinetike i modelovanja, omogućavaju predviđanje uslova sinteze leka, što dovodi do optimizacije i kontrole procesa proizvodnje leka, kao i proceni rizika.
- Detaljno poznavanje hemijskih mehanizama proizvodnih procesa, koji uključuju radikale i prelazne metale, su važni za povećanje prinosa i ekološkim aspektima proizvodnje leka.



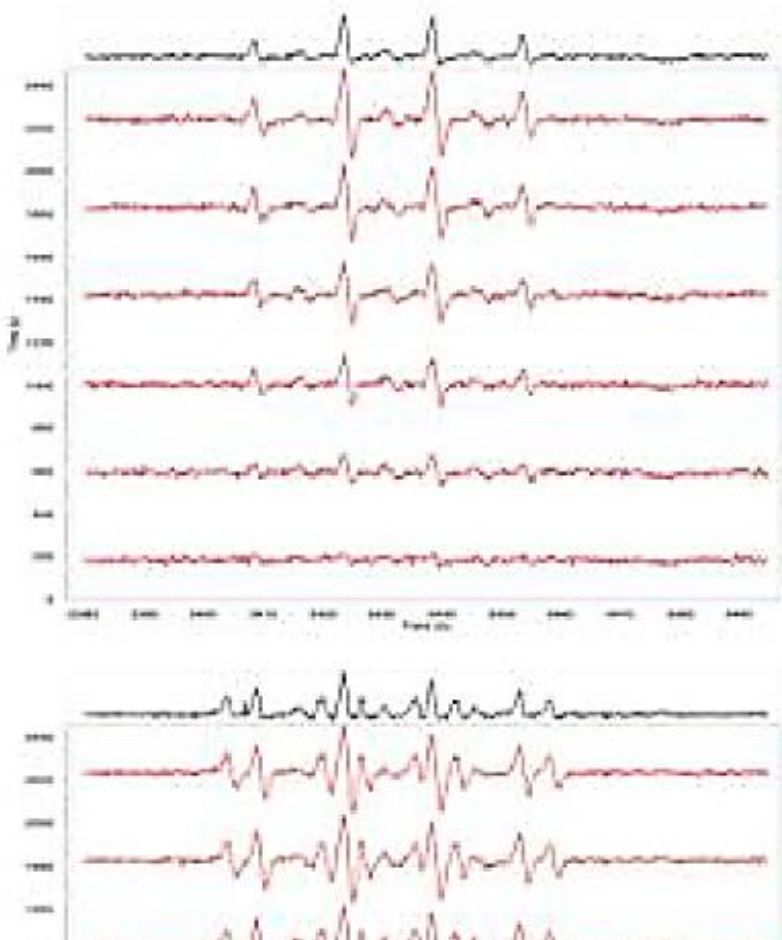


Još neke primene u farmaciji

III. Praćenje toka hemijskih reakcija



- Kako EPR ovde može pomoći?



- Identifikacija reakcionih intermedijera (slobodnih radikala i prelaznih metala) daje informacije o mehaničkim svojstvima leka.
- Dobijaju se odgovori na dva osnovna pitanja: reakcioni prinos i reakciona kinetika.
- Dobijaju se podaci za kreiranje kinetičkih modela.
- Kvantifikacija količine slobodnih radikala i metala tokom reakcije.

Hydroxyl Radical Generation by Ultrasonic Irradiation

As an example of closed loop reaction analysis, the radical generation initiated by ultrasonic irradiation was analyzed. When hydrogen peroxide (H_2O_2) is added to water and ultrasonic irradiation is performed, OH radicals are generated. These OH-radicals can be observed by using the spin trapping reagent DMPO (Fig. 4 upper). When methanol is added, both OH- and carbon centered radicals are generated from the water and methanol (Fig. 4 lower). The radical identities were determined by SpinFit and their concentration by SpinCount. The kinetics are analyzed by the Xenon software.



Mangion I. et. al. (Merck), Using electron paramagnetic resonance spectroscopy to facilitate problem solving in pharmaceutical research and development. *J. Org. Chem.* **(2016)** 81 6937



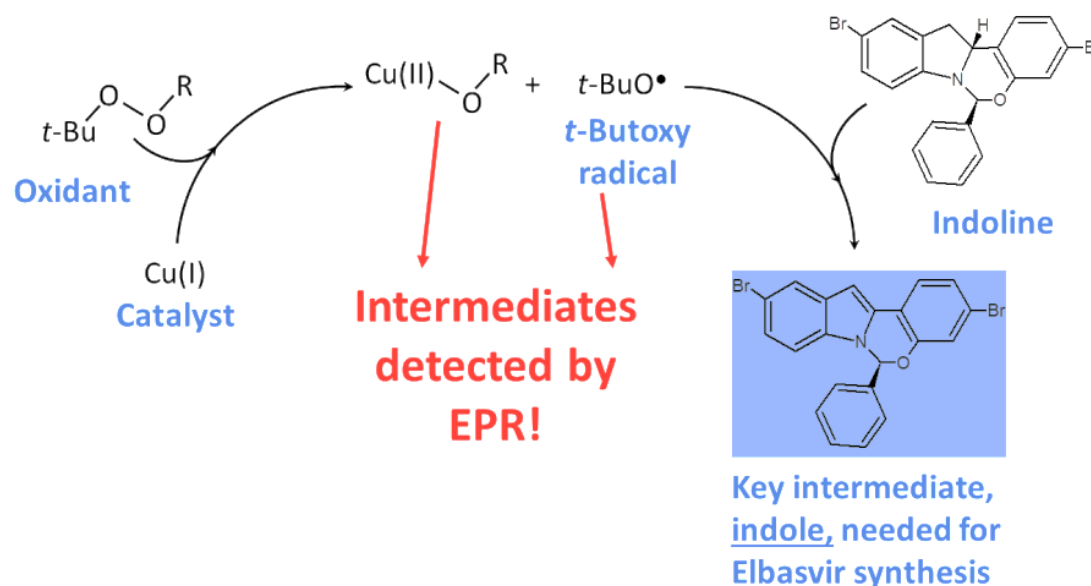
Još neke primene u farmaciji



III. Praćenje toka hemijskih reakcija

Još jedan primer istraživanja kompanije MERCK:

- Praćenje da li se generišu EPR aktivni intermedijeri prilikom proizvodnje novog leka za Hepatitis C (Elbasvir).
- Predloženi mehanizam pretpostavlja da je Cu(I) katalizator, pri čemu se oksiduje u Cu(II) i tert-butoksi radikal.
- Prati se efikasnost sinteze leka koja bi trebala da bude >92%.



Simplified proposed mechanism of indoline oxidation

Peng F. et. al. (Merck), A mild Cu(I)-catalyzed oxidative aromatization of indolines to indoles, *J. Org. Chem.* **(2016)** 81 10009



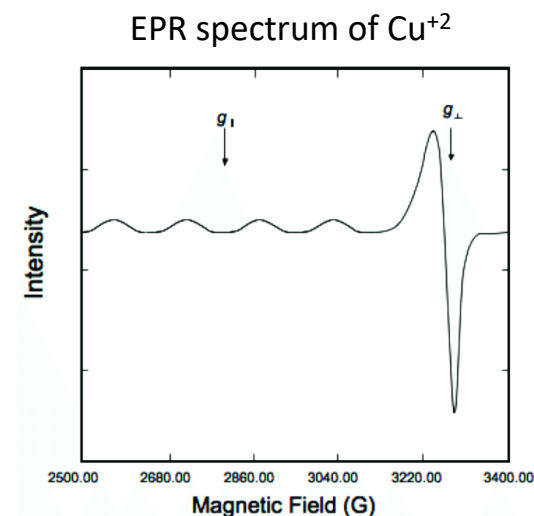
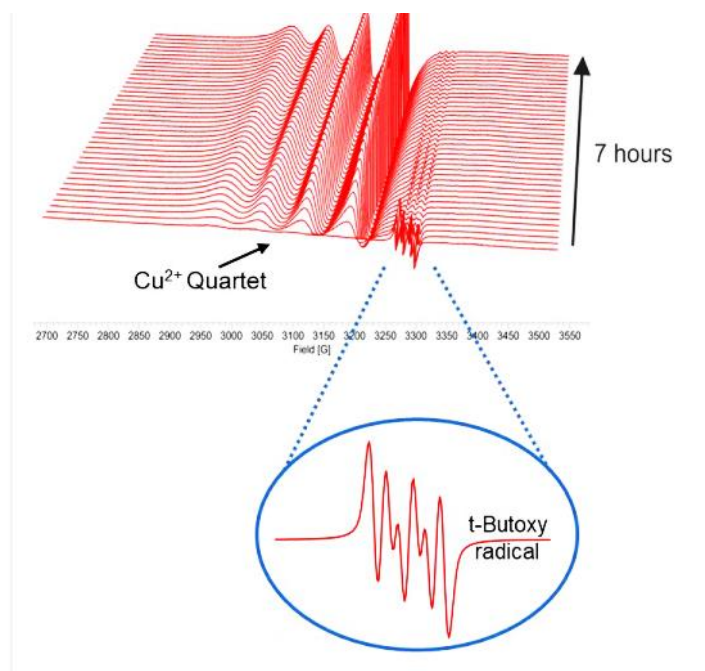
Još neke primene u farmaciji

III. Praćenje toka hemijskih reakcija



Primer kompanije MERCK:

- Praćenje reakcije potvrđuje oksidaciju EPR neaktivnog Cu(I) u EPR aktivni Cu(II).
- EPR signal Cu(II) dostiže plato posle oko 3 sata što ukazuje na kraj reakcije.
- t-Butoksi radikal se takođe detektuje putem EPR spin-trap metode.
- Kvantitativna EPR analiza oba intermedijera daje informaciju o efikasnošću sinteze leka.



Peng F. et. al. (Merck), A mild Cu(I)-catalyzed oxidative aromatization of indolines to indoles, *J. Org. Chem.* **(2016)** 81 10009



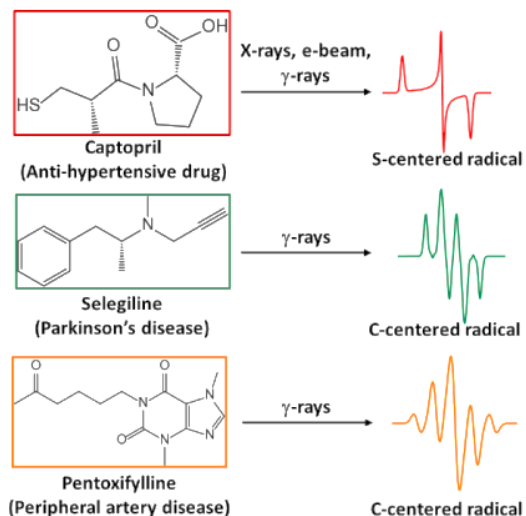
Još neke primene u farmaciji



IV. Praćenje procesa sterilizacije

- Ispravna sterilizacija API-ja, dodataka leku, finalne fomulacije leka, laboratorijske opreme i medicinskih uređaja su veoma važni za proizvođače lekova.
- Međutim, proces sterilizacije može rezultovati stvaranjem radikala koji:
 - Su odgovorni za degradaciju ozračenog materijala
 - Su odgovorni za promenu fizičko-hemijskih osobina sterilisanog proizvoda
 - Smanjuju efikasnost leka zbog njegove delimične degradacije tokom procesa sterilizacije
 - Mogu predstavljati toksikološku opasnost

Examples:



- Ozračivanje leka gama-zracima u čvrstom stanju (Captopril, Selegiline, Pentoxifylline) indukuje generisanje S- ili C-centriranih slobodnih radikala.
- Identifikacija vrste radikala daje uvid u bolje razumevanje mehanizma radiolize.
- Kvantifikacija radikalskog prinosa koristi se za uspostavljanje granične vrednosti doze prilikom radiosterilizacije lekova.

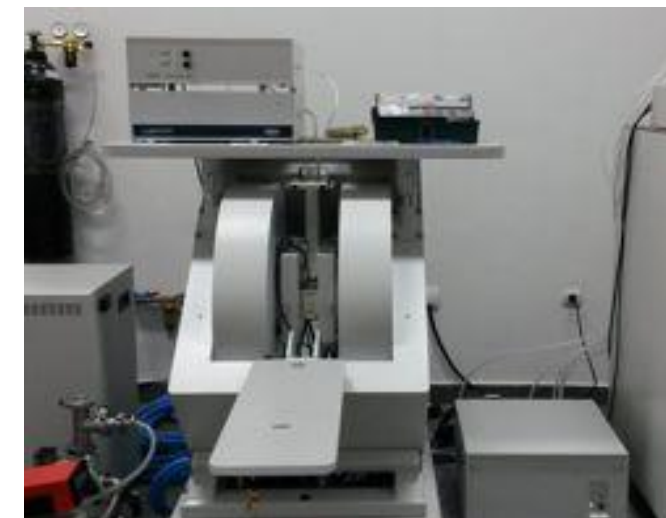
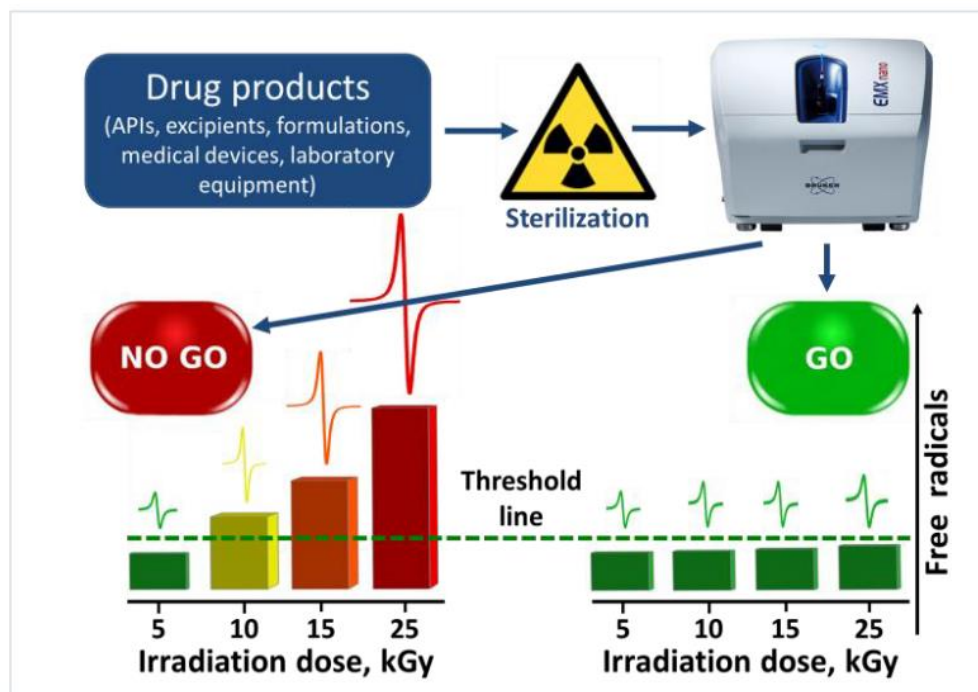


Još neke primene u farmaciji

IV. Praćenje procesa sterilizacije



- **Kako EPR ovde može pomoći?**
- Određuje se stabilnost leka nakon sterilizacije.
- Može se vršiti karakterizacija slobodnih radikala i identifikacija njihovog izvora.
- Omogućava donošenje važnih odluka tokom proizvodnje leka baziranih na kvantifikaciji slobodnih radikala tokom provere kvaliteta leka.



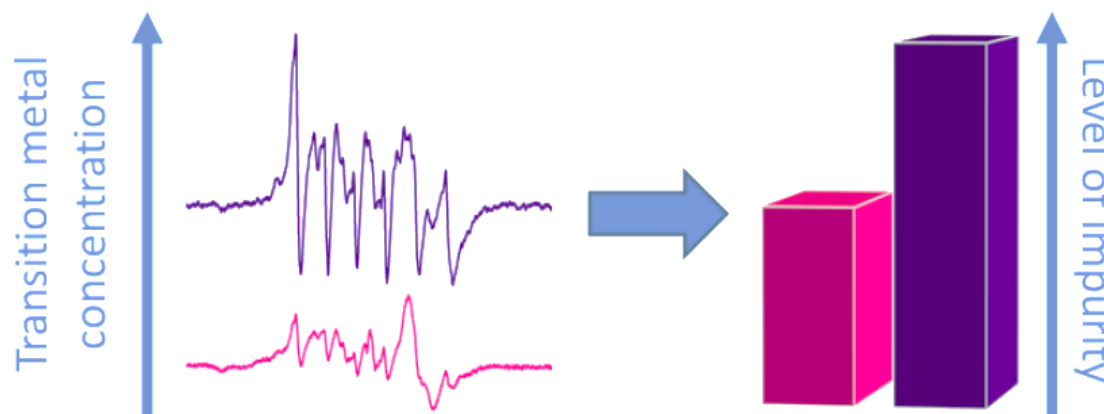


Još neke primene u farmaciji

V. Detekcija farmaceutskih nečistoća



- Nečistoće u leku potiču ili od API-ja, ili dodataka leku, ili od oba od ovih izvora.
- Nečistoće se takođe mogu uneti tokom procesa formulacije leka, tokom pakovanja ili skladištenja.
- Postojanje nečistoća može imati više neželjenih efekata, kao što su:
 - Smanjenje terapeutskog efekta leka
 - Skraćenje roka trajanja
 - Pojave toksičnosti leka



Metal concentration correlates with the EPR signal

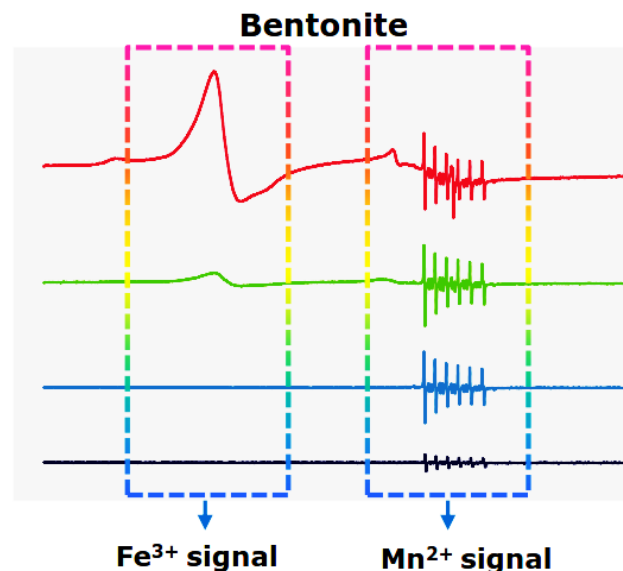


Još neke primene u farmaciji

V. Detekcija farmaceutskih nečistoća



- **Kako EPR ovde može pomoći?**
 - Detektovanje i identifikacija prelaznih metala u tragovima.
 - Praćenje procesa degradacije leka koji uključuju proizvodnju slobodnih radikala.
 - Proučavanje proizvodnje slobodnih radikala, katalisane prelaznim metalima ili nečistoćama.



Analiza tragova nečistoća i kontrola kvaliteta leka:

- Mangan (Mn^{2+}) i gvožđe (Fe^{3+}) su prisutni u tragovima u bentonitu koji se koristi kao aditiv (filer) u tabletama.
- Povećana količina metala ubrzava proces degradacije API-ja, kao i nužnih dodataka leku.



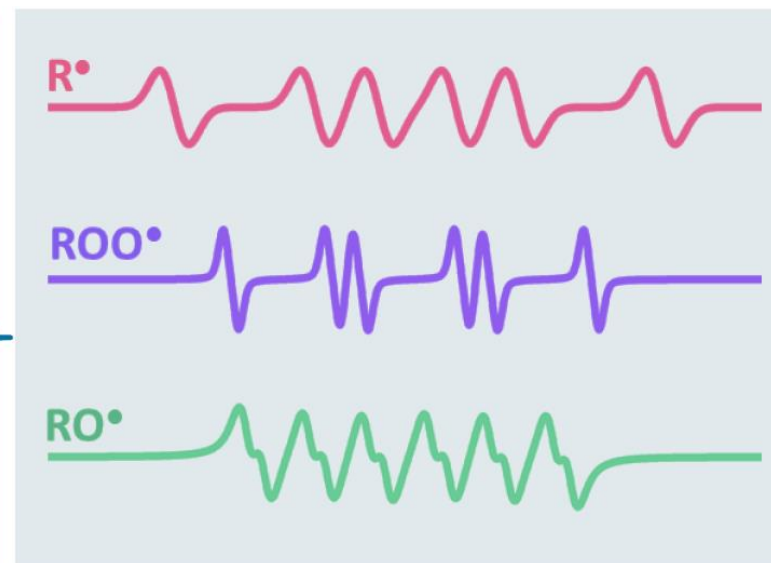
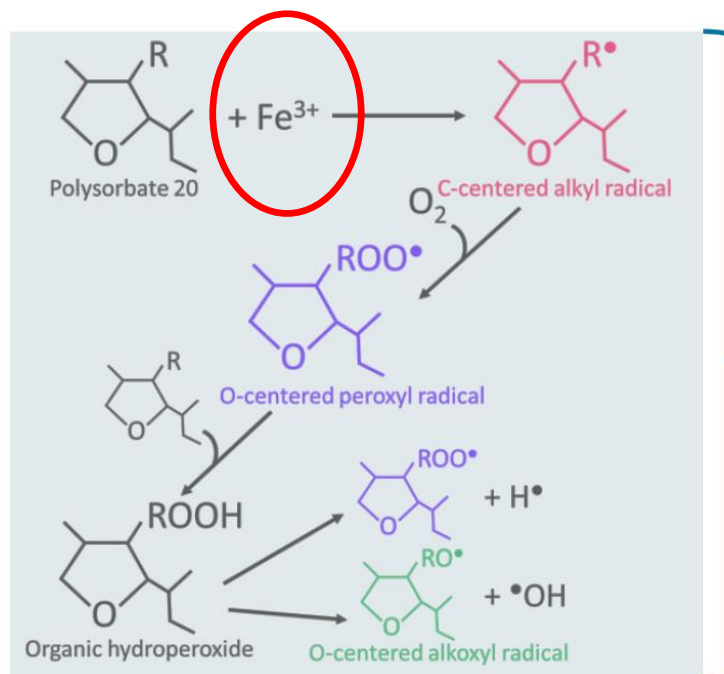
Još neke primene u farmaciji

V. Detekcija farmaceutskih nečistoća



Studija za jednu farmaceutsku kuću:

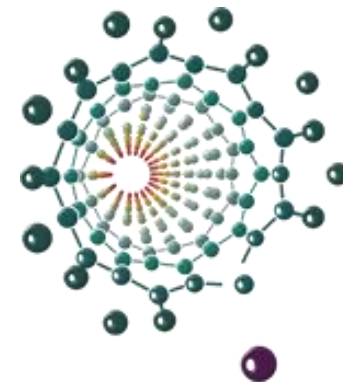
- Polisorbat 20, koji se prilikom formulacije leka koristi kao stabilizator, podleže atooksidaciji.
- Autoooksidacija je katalisana prelaznim metalima što kao rezultat daje sporednu reakciju tokom koje se formiraju slobodni radikali.
- Pomoću EPR-a, mogu se detektovati identifikovati i kvantifikovati slobodnoradikalske nečistoće.



Lam X.E. et al.(Genentech Inc.), Site-specific tryptophan oxidation induced by autocatalytic reaction of polysorbate 20 in protein formulation, *Pharm. Res.* (2011) 28 2543



EPR Lab



- Za više informacija posetite naš sajt:



BioScope Labs

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs