

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU”  
CLUJ-NAPOCA**



**IOANA DANIELA MÎNDRUȚĂU (căs. FELECAN)**

**STUDIU FIZICO-CHIMIC ȘI DE STABILITATE AL  
UNOR HIPOCOLESTEROLEMIANTE DIN CLASA  
STATINELOR**

**Rezumatul tezei de doctorat  
în vederea obținerii titlului științific de  
Doctor în Științe Medicale, domeniul Farmacie**

**Conducător științific  
Prof. Dr. MARIUS BOJIȚĂ**

**2010**

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b> -----	<b>1</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b> -----	<b>3</b>
1. Istoricul apariției statinelor-----	3
2. Hiperlipidemiile – factori de risc pentru bolile coronariene-----	6
2.1. Ateroscleroza și bolile coronariene-----	6
2.2. Colesterolul – biosinteză și metabolism-----	7
2.3. Lipoproteinele – structură și metabolism-----	9
2.4. Profilul lipidelor în sânge-----	11
2.5. Dislipoproteinemiile-----	11
3. Statine utilizate în tratamentul hiperlipidemiilor-----	13
3.1. Reprezentanți-----	13
3.1.1. Statine oficinale-----	14
3.1.2. Relații structură chimică – activitate biologică-----	15
3.1.3. Obținere și proprietăți fizico-chimice-----	18
3.2. Statine – studiu farmacologic-----	20
3.2.1. Farmacocinetică-----	20
3.2.2. Indicații terapeutice-----	22
3.2.3. Reacții adverse, interacțiuni medicamentoase, contraindicații-----	27
3.2.4. Produse farmaceutice comercializate în România-----	28
3.3. Studiul proprietăților analitice ale simvastatinei-----	30
3.3.1. Metode spectrale-----	30
3.3.1.1. Spectrofotometria UV-Vis-----	30
3.3.1.2. Spectrofotometria IR-----	35
3.3.2. Metode cromatografice-----	38
3.3.2.1. Cromatografia de lichide de înaltă performanță-----	38
3.3.2.2. Metode cromatografice bioanalitice - tehnica HPLC cuplată cu spectrometria de masă-----	40
3.3.2.3. Aplicații HPLC în analiza simvastatinei-----	42
3.3.3. Studii de stabilitate-----	47
3.3.3.1. Determinarea impurităților farmaceutice-----	48
3.3.3.2. Legile cineticii de degradare-----	53
<b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b> -----	<b>55</b>
4. Comportamentul spectrofotometric al simvastatinei-----	55
4.1. Dozarea spectrofotometrică UV simultană a simvastatinei și ezetimibului din comprimate prin metoda curbei conținutului aparent-----	55
4.2. Caracterizarea spectrală în infraroșu a simvastatinei-----	69
4.3. Concluziile studiului spectrofotometric-----	76

<b>5. Analiza simvastatinei din forme farmaceutice prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cu detecție UV</b> .....	<b>77</b>
5.1. Dozarea simvastatinei din forme farmaceutice printr-o metodă HPLC-UV .....	77
5.2. Dozarea simultană a simvastatinei și ezetimibului din forme farmaceutice printr-o metodă HPLC-UV .....	87
5.2.1. Validarea metodei de determinare a simvastatinei și ezetimibului din forme farmaceutice .....	87
5.2.2. Aplicarea metodei HPLC-UV validate la determinarea simultană a simvastatinei și ezetimibului din comprimate comerciale .....	97
5.2.3. Compararea rezultatelor dozării simultane a simvastatinei și ezetimibului din comprimate comerciale obținute prin metoda spectrofotometrică CCA și metoda HPLC cu detecție UV .....	99
5.3. Concluziile studiului cromatografic .....	101
<b>6. Analiza simvastatinei din plasma umană prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă</b> .....	<b>102</b>
6.1. Optimizarea unei metode HPLC cuplată cu spectrometrie de masă de dozare a simvastatinei din plasma umană .....	102
6.2. Dozarea simultană a simvastatinei și a metabolitului său - hidroxiacidul simvastatinei, din plasma umană printr-o metodă HPLC-MS-MS .....	109
6.2.1. Alegerea fazei mobile și optimizarea detecției .....	113
6.2.2. Optimizarea extracției .....	114
6.2.3. Alegerea solvenților de aducere la pH a plasmei și a solvenților de reluare .....	116
6.2.4. Validarea metodei de determinare a simvastatinei și a hidroxiacidului simvastatinei din plasma umană .....	118
6.3. Concluziile studiului HPLC cuplat cu spectrometria de masă .....	127
<b>7. Studii de stabilitate a simvastatinei</b> .....	<b>128</b>
7.1. Profilarea impurităților simvastatinei .....	128
7.1.1. Studiu calitativ și de prevalidare .....	131
7.1.2. Determinarea impurităților simvastatinei din forme farmaceutice .....	142
7.2. Studii cinetice de degradare forțată a simvastatinei în soluții .....	144
7.2.1. Influența pH-ului asupra degradării simvastatinei în soluții apoase .....	144
7.2.2. Influența temperaturii asupra degradării simvastatinei în soluții apoase .....	157
7.2.3. Influența luminii UV asupra degradării simvastatinei în mediu neapos .....	159
7.2.4. Concluziile studiilor de stabilitate a simvastatinei .....	167
<b>CONCLUZII GENERALE</b> .....	<b>168</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>173</b>

**CUVINTE CHEIE:** simvastatină, hipocolestrolemiante, metode de analiză din forme farmaceutice și plasmă umană, impurități, cinetici de degradare în condiții forțate.

## I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Statinele au devenit un „fenomen” larg răspândit în lumea întreagă, atât ca beneficiu terapeutic, într-un spectru larg de afecțiuni, cât și ca valoare comercială pe piața farmaceutică. Statinele reprezintă o clasă de medicamente introdusă în terapie în anii 1980-1990 cu scopul de a oferi pacienților cu hipercolesterolemie un tratament eficient și sigur de scădere a nivelurilor de colesterol din sânge [1].

În prezent se comercializează în lume șapte statine: lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina și pitavastatina. Toate acestea prezintă similitudini structurale care determină ca mecanismul lor de acțiune să fie același: inhibarea enzimei hidroximetilglutaril-Coenzima A reductaza, implicată în biosinteza colesterolului la nivel hepatic [2].

Simvastatina este cel mai reprezentativ compus al clasei statinelor, beneficiind de cel mai mare succes de piață. Ea a fost a doua statină introdusă pe piața farmaceutică, la câțiva ani după lovastatină.

La ora actuală există în literatura de specialitate studii de identificare și cuantificare a simvastatinei din materii prime, forme farmaceutice sau medii biologice. Metodele de analiză folosite în aceste scopuri pornesc de la spectrofotometria în ultraviolet [3-5] și ajung la cromatografie de lichide de înaltă performanță cu detecție în ultraviolet [6-7] sau cuplată cu spectrometrie de masă [8-10]. În ceea ce privește studiile de stabilitate a simvastatinei, acestea s-au concentrat pe stabilitatea substanței la extracție din medii biologice [11].

## II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Obiectivul cercetărilor efectuate în cadrul stagiului de doctorat a fost acela de a elabora o metodologie de studiu de control de calitate în clasa statinelor, clasă considerată sensibilă din punct de vedere al stabilității, prin adoptarea simvastatinei ca model de studiu. Pe parcursul efectuării experimentelor, s-au realizat studii și asupra lovastatinei în calitate de impuritate oficială a simvastatinei.

Studiile efectuate au urmărit patru linii de cercetare: (1) elaborarea de metode analitice sensibile și selective pentru determinarea simvastatinei din medii sintetice / forme farmaceutice, (2) elaborarea de metode analitice sensibile și selective pentru determinarea simvastatinei și a metabolitului său activ din medii biologice, (3) separarea cromatografică a impurităților simvastatinei, atât cele de natură cunoscută, cât și cele de natură necunoscută și (4) efectuarea de studii de stabilitate și de degradare în condiții forțate de pH, temperatură și expunere la lumină UV, cu stabilirea cineticilor de degradare.

## **COMPORTAMENTUL SPECTROFOTOMETRIC AL SIMVASTATINEI**

În cadrul studiului spectrofotometric al simvastatinei s-au ales două direcții de cercetare: (1) cuantificarea simultană a simvastatinei și a ezetimibului din comprimate prin spectrofotometrie în ultraviolet și prin aplicarea metodei curbei conținutului aparent și (2) identificarea și aprecierea purității unei probe de simvastatină materie primă prin spectrofotometrie în infraroșu.

Pe piața farmaceutică există comprimate care conțin simvastatină și ezetimib (un hipocolesterolemiant din clasa 2-azetidione) în diverse rapoarte de combinare, comprimatele studiate (produsul original și un produs generic aflat în studiu preliminar de autorizare) având un conținut de 10 mg simvastatină și 10 mg ezetimib. Metoda CCA dezvoltată s-a dovedit a fi simplă, rapidă și cu o acuratețe comparabilă cu aceea a unei metode cromatografice validate. Produsele comerciale studiate prin această metodă au un conținut în substanță activă care se încadrează în intervalul de 92,5% - 107,5%, prevăzut de farmacopeile în vigoare.

Studiul spectral în IR a fost aplicat pe simvastatină materie primă, simvastatină standard de farmacopee și pe două impurități oficiale standarde de producător (simvastatina hidroxiacid și dimerul simvastatinei). Au fost puse în evidență, în spectrul probei de materie primă, benzile de absorbție corespunzătoare vibrațiilor caracteristice principalelor grupe funcționale ale simvastatinei. S-a constatat însă că intensitatea benzilor de absorbție corespunzătoare grupelor carbonil din molecula simvastatinei, din spectrul probei de materie primă, este diferită față de spectrele de referință ale simvastatinei avute la dispoziție. Prin compararea spectrului probă cu spectrele de referință a două dintre impuritățile oficiale ale simvastatinei (hidroxiacidul și dimerul simvastatinei) s-a concluzionat că proba de materie primă

conține simvastatină și un produs de degradare al acesteia, cel mai probabil hidroxiacidul.

### **ANALIZA SIMVASTATINEI DIN FORME FARMACEUTICE PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ CU DETECȚIE UV**

A fost dezvoltată o metodă HPLC-UV cu eluție izocratică, simplă și rapidă, de determinare a simvastatinei din comprimate, cu un timp de analiză cromatografică sub 9 minute. Metoda a fost validată conform prevederilor internaționale specifice și s-a dovedit a fi liniară, exactă și precisă și poate fi aplicată la determinări curente din comprimate [12].

S-a extins determinarea cromatografică a simvastatinei la determinarea simultană a simvastatinei și ezetimibului din comprimate prin dezvoltarea unei metode HPLC-UV. Metoda a trecut toate criteriile de acceptanță din cadrul validării și este considerată liniară, exactă și precisă. Rezultatele acestui studiu au fost folosite și ca date de referință pentru dozarea simvastatinei și ezetimibului din comprimate prin metoda spectrofotometrică a curbei conținutului aparent (prezentată în capitolul anterior), dovedind că aceasta prezintă o exactitate corespunzătoare.

### **ANALIZA SIMVASTATINEI DIN PLASMA UMANĂ PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ CUPLATĂ CU SPECTROMETRIA DE MASĂ**

Analiza simvastatinei din plasma umană se confruntă cu problema realizării unor concentrații plasmatiche foarte mici în urma administrării formelor farmaceutice cu simvastatină (0,2-15 ng/mL). De aceea s-a urmărit elaborarea unei metode suficient de sensibile pentru a detecta concentrații plasmatiche de simvastatină lactonă și simvastatină hidroxiacid (metabolitul activ al simvastatinei) echivalente celor realizate în urma administrării de forme farmaceutice, astfel încât metoda să poată fi aplicată ulterior în studii farmacocinetice și de bioechivalență.

S-au dezvoltat două metode de cuantificare a simvastatinei din plasmă. În prima metodă de detecție s-a recurs la monitorizarea aductului cu sodiu al simvastatinei în variantă SIM („single ion monitoring”) și SRM („single reaction

monitoring”) pe domeniul de concentrații 0,2-6,7 ng/mL. Rezultatele au stabilit că metoda de cuantificare a simvastatinei din plasmă prin LC-MS-MS este de aproximativ 100 de ori mai sensibilă decât metoda LC-MS [13].

S-a trecut apoi la dezvoltarea unei metode HPLC-MS-MS de determinare simultană atât a simvastatinei cât și a metabolitului său (simvastatina acid) din plasma umană. Întrucât formarea aductului cu  $\text{Na}^+$  la simvastatină acid s-a dovedit a fi nesatisfăcătoare, s-a ales ca metodă de detecție simultană o metodă LC-MS-MS cu monitorizare MRM („multiple reaction monitoring”) folosind pentru fragmentare ionul molecular protonat  $[\text{M}+\text{H}^+]$  al fiecărei din cele două substanțe, cu faza mobilă fiind acetonitril/acid trifluoracetic 0,01% pH 4,1 cu amoniac (70/30, v/v). Metoda HPLC-MS-MS elaborată s-a dovedit a îndeplini cerințele impuse validării metodelor bioanalitice și este caracterizată de specificitate, sensibilitate, liniaritate, exactitate și precizie pe domeniul de concentrații de 0,12 – 12,73 ng/mL pentru simvastatină și de 0,12 – 12,61 ng/mL pentru simvastatina acid. Această metodă s-a aplicat ulterior la studiul de bioechivalență al unor produse generice cu simvastatină, studiu efectuat de Laboratorul de Bioechivalență al UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, în cadrul căruia s-au analizat un număr de peste 1000 de probe prin metoda propusă.

## STUDII DE STABILITATE A SIMVASTATINEI

Au fost realizate două tipuri de studii de stabilitate a simvastatinei: (1) separarea și identificarea impurităților simvastatinei ce pot constitui produși de degradare ai acesteia și (2) studii cinetice de degradare a simvastatinei în soluții, în condiții forțate de pH, temperatură și lumină UV.

Separarea și identificarea impurităților simvastatinei s-a realizat prin optimizarea unei metode HPLC-UV. Au fost testați mai mulți factori ce pot influența separarea simvastatinei și a impurităților: tipul de coloană cromatografică, compoziția fazei mobile, lungimea de undă de detecție, temperatura coloanei cromatografice. Au fost alese coloana cromatografică și faza mobilă ce au permis separarea cu rezoluție satisfăcătoare a tuturor impurităților cunoscute și a unor impurități necunoscute și dozarea cu limită de cuantificare acceptabilă (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ).

În timpul dezvoltării metodei de separare a impurităților simvastatinei s-a observat că produsul majoritar de degradare este hidroxiacidul simvastatinei (impuritatea oficială A) și că simvastatina trece într-o proporție semnificativă într-o

impuritate necunoscută care eluează imediat după ea. O a doua impuritate necunoscută se separă între impuritățile oficiale B și C. Pentru aceste impurități necunoscute s-au propus formule de structură în conformitate cu posibilele căi de degradare hidrolitică la grupele funcționale ester ciclic și aciclic din molecula simvastatinei. Această metodă a fost supusă unui studiu de prevalidare prin evaluarea statistică a liniarității celor șase impurități oficiale avute la dispoziție și a simvastatinei, pe domeniul de concentrații 0,1-26  $\mu\text{g/mL}$ . S-au identificat și cuantificat impuritățile simvastatinei din comprimate comerciale, toate impuritățile aflându-se sub limita maximă admisă de farmacopeile în vigoare, în afară de impuritatea A, hidroxiacidul, care a depășit această limită.

Scopul studiului cinetic a fost acela de a evalua cinetica de degradare a simvastatinei în mediu apos, în funcție de condițiile de pH și temperatură, respectiv cinetica de degradare a simvastatinei în mediu neapos prin expunere la lumină UV, folosind metode HPLC cu detecție UV.

Studiile cinetice realizate în condiții forțate de pH, temperatură și lumină UV au relevat un comportament complex la degradare al simvastatinei. Hidroliza simvastatinei s-a dovedit pH-dependentă, fiind mult mai pronunțată la pH alcalin decât la pH acid. După hidroliza acidă sau bazică a simvastatinei s-a identificat în cromatograme hidroxiacidul simvastatinei ca produs de degradare ( $t_R=1,77$  min).

Degradarea simvastatinei la pH bazic este descrisă de legile cinetice de ordin pseudo-unu. La pH acid și neutru cinetica devine foarte complexă, ecuațiile de modelare a datelor experimentale fiind funcții polinomiale de ordin superior (5 și 9). La pH acid și neutru hidroliza simvastatinei se face după o reacție de echilibru, iar zona de stabilitate maximă a simvastatinei s-a stabilit la pH 6-7. Temperatura a favorizat hidroliza bazică a simvastatinei și a indus schimbarea mecanismului de degradare față de hidroliza bazică la temperatura ambientală.

În condiții de stres UV în mediu neapos, simvastatina se degradează după o cinetică de ordinul 1. Una din posibilele căi de degradare în acest caz este o reacție de oxidare, având în vedere că viteza degradării a fost mai mică în cazul soluțiilor metanolice de simvastatină în prezența butil-hidroxitoluenului decât viteza degradării simvastatinei din soluțiile metanolice fără butil-hidroxitoluen.



## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Endo A. The origin of the statins. *International Congress Series*. 2004; 1262: 3 – 8.
2. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004; 19: 117-125.
3. Wang L, Asgharnejad M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. *J Pharm Biomed Anal*. 2000; 21: 1243-1248.
4. Erk N. Rapid spectrophotometric method for quantitative determination of simvastatin and fluvastatin in human serum and pharmaceutical formulations. *Pharmazie*. 2002; 57: 817-819.
5. Arayne MS, Sultana N, Hussain F, Ali SA. Validated Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Simvastatin in Pharmaceutical Formulations and Human Serum. *J Anal Chem*. 2007; 62(6): 536-541.
6. Pasha MK, Muzeeb S, Basha SJS et al. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors- atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis an in vitro metabolism studies. *Biomed Chromatogr*. 2006; 20: 282-93.
7. Kumar V, Shah RP, Singh S. LC and LC-MS methods for the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases. Part 1. Separation of active components and classification of their interaction/degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 47: 508-515.
8. Zhao JJ, Yang A, Rogers JD. Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion spray tandem mass spectrometric determination. *J. Mass Spectrom*. 2002; 37: 421-433.
9. Barret B, Huclova J, Borek-Dohalsky V et al. Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 41: 517-526.
10. Zhang N, Yang A, Rogers JD, Zhao JJ. Quantitative analysis of simvastatin and its  $\beta$ -hydroxy acid in human plasma using automated liquid-liquid extraction based on 96-well plate format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2004; 34: 175-187.
11. Jemal M, Ouyang Z, Powell ML. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2000; 23: 323–340.
12. Mîndruțau I, Iuga C, Bojiță M, Imre S, Kiss B, Făgărășan E. Validation of a RP-HPLC assay for simvastatin in pharmaceutical dosage forms. *Revista de Medicină și Farmacie, Târgu-Mureș University Press*. 2004; 50(II): 235-237.
13. Mîndruțau I, Vlase L, Leucuta S, Bojita M. Optimization of chromatographic and detection parameters for the determination of simvastatin in human plasma. *Timisoara Medical Journal*. 2005; 55(5): 106-109.

# CURRICULUM VITAE

## A. DATE PERSONALE

1. **Nume:** Ioana Daniela Felecan (născută Mîndruțau)
2. **Data și locul nașterii:** 21.06.1977, Arad
3. **Cetățenie:** Română
4. **Stare civilă:** Căsătorită
5. **Email:** ifelecan@umfcluj.ro
6. **Studii:**

Instituția	Liceul	Facultatea	Facultatea	Specialitate
	Liceul Teoretic „Moise Nicoară” Arad	Facultatea de Farmacie, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca	Facultatea de Farmacie, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca	Farmacie Generală/ Laborator Farmaceutic
<b>Perioada</b>	1992-1996	1996-2001	2003-2004	2002-2003/ 2005-2007
<b>Titluri sau diplome obținute</b>	Diplomă de bacalaureat	Licențiat în Farmacie	Masterat în Analiza și Controlul Medicamentelor	Farmacist specialist

## 7. Titlul științific și gradul didactic:

- Doctorand, Șef de lucrări

## 8. Experiență profesională:

Perioada	Instituția	Funcția
2007- prezent	UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca	Șef de lucrări
2004-2007	UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca	Asistent universitar
2002-2004	UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca	Preparator universitar
2002	Spitalul Clinic Municipal Cluj-Napoca	Farmacist rezident

## 9. Cursuri de perfecționare și stagii de cercetare:

- Bursă Erasmus, Facultatea de Farmacie din Valencia, Spania, 2000
- Merck HPLC Course, Bușteni, România, 2005
- Hands-on-Dissolution Workshop, București, România, 2005
- Pathologie et pharmacologie moléculaires: Biotechnologies, Arad, Roumanie, 2005
- PRIME Course “Teaching and Learning, a Course for Medical Educators”, Cluj-Napoca, 2009

## 10. Membru al asociațiilor profesionale:

- Societatea de Științe Farmaceutice din România
- Societatea de Chimie din România
- Colegiul Farmaciștilor din România

## 11. Limbi străine cunoscute și certificate de competență lingvistică:

- Engleză – Certificate in Advanced English CAE, 2005
- Franceză – Diplôme Approfondi de Langue Française DALF - Unités B1, B2, B3, B4, 2002

## **B. CONTRIBUȚII ȘTIINȚIFICE**

### **a. Granturi:**

1. Grant CNCISIS 1511/2004-2005. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea potențialului antiinfecțios al unor derivați heterociclici de acetofenonă. Membru.
2. Grant CEEEX 7/3.10.2005. Forme polimorfice și încapsularea substanțelor bioactive în ciclodextrine privind îmbunătățirea calității medicamentelor. Membru.
3. Grant CEEEX ET nr 5860/18.09.2006. Dezvoltarea și validarea unor metode bioanalitice și implementare-utilizare în monitorizarea concentrațiilor medicamentoase plasmatice și studii farmacocinetice de biodisponibilitate. Membru.
4. Grant CEEEX Modul I, Tip P-CD -2006. Biomateriale compozite pentru radioterapie și hipertermie simultană. Membru.
5. Grant 2 Cex-06-11-55/26.07.2006. Compuși seleniu și telur-organici în chimia coordinativă – COSETEORG. Membru.

### **b. Articole publicate in extenso în țară:**

1. Imre S, Mîndruțau I. Resolution of ternary mixtures. Principles and analytical application. Applied Medical Informatics. 1999; 7 (2): 13-18.
2. Imre S, Marin-Saez R, Bojiță M, Făgărășan E, Mîndruțau I. Aplicarea metodei curbei conținutului aparent la determinarea simultană a ondansetronului și metoclopramidului. Farmacia. 2000; XLVIII (5): 61-69.
3. Imre S, Mîndruțau I, Făgărășan E, Muntean DL, Avrigeanu V. Corelare structură-date spectrale în cazul metoclopramidului și ondansetronului. Farmacia. 2002; L (6): 37-47.
4. Kiss B, Iuga C, Rus LL, Bojiță M, Mîndruțau I. Quantification of Rapamycin in whole blood by HPLC. Method optimization. "Ovidius" University Annals of Medical Science – Pharmacy. 2003; 1(1): 117-122.
5. Rus LL, Kiss B, Iuga C, Bojiță M, Nemeti L, Mîndruțau I. HPLC Analysis of some hydrosoluble vitamins (thiamine, riboflavin, riboflavin-5-phosphate, pyridoxine, cyanocobalamin, nicotinamide). "Ovidius" University Annals of Medical Science – Pharmacy. 2003; 1(1): 103-106.
6. Imre S, Mîndruțau I, Zaharia V, Avrigeanu V, Muntean DL, Făgărășan E. Stabilitatea în soluție a ondansetronului. Clujul Medical. 2004; LXXVII (1): 146-151.
7. Neamțu J, Făgărășan E, Gofița E, Croitoru O, Mîndruțau I. Dozarea spectrofotometrică IR a unor amestecuri de substanțe. Clujul Medical. 2004; LXXVII (3): 597-603.
8. Tămaș M, Făgărășan E, Mîndruțau I, Oprean R. Identification and quantitative determination of aristolochic acid from birthwort (Aristolochia clematitis, Aristolochiaceae). Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca. 2004; 60: 42-47.
9. Mîndruțau I, Iuga C, Bojiță M, Imre S, Kiss B, Făgărășan E. Validation of a RP-HPLC assay for simvastatin in pharmaceutical dosage forms. Revista de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș. 2004; 50(2): 235-237.
10. Imre S, Mîndruțau I, Avrigeanu V, Filip L, Muntean DL, Mircia E. Stabilitatea în soluție a metoclopramidei. Revista de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș. 2004; 50(2): 66-69.
11. Imre S, Mîndruțau I, Marin-Saez R, Muntean DL, Bojiță M, Făgărășan E. Quantitative spectrophotometric determination of mixtures with three components. Perspective în practica farmaceutică: lucrări in extenso prezentate și comunicate în

cadrul simpozionului „Zilele Farmaceutice Orădene” ed. a II-a, Editura Universității din Oradea. 2005: 83-87.

12. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D. Determination of caffeine by LC/MS from beverages. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica, L, 4b. Proceedings of the Fourth Conference “Isotopic and Molecular Processes” Cluj-Napoca.* 2005: 527-531.

13. Vlase L, Filip L, Mîndruțau I, Leucuța S. Determination of nicotine from tobacco by LC-MS-MS. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica, L, 4b. Proceedings of the Fourth Conference “Isotopic and Molecular Processes” Cluj-Napoca.* 2005: 531-535.

14. Mîndruțau I, Vlase L, Leucuța S, Bojiță M. Optimization of chromatographic and detection parameters for the determination of simvastatin in human plasma. *Timisoara Medical Journal.* 2005; 55(5): 106-109.

15. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D. Determinarea cafeinei din bauturi energizante prin LC/MS. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (3): 664-667.

16. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D. Determination of caffeine from different brands of coffee. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (4) supl. 1: 189-192.

17. Vlase L, Mîndruțau I, Filip L, Leucuța S. Determination of xantines from foods by liquid-chromatography-mass spectrometry. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (4) supl. 1: 227-230.

18. Mîndruțau I, Vlase L, Filip L, Leucuța S. Determination of purine alkaloids in green and black tea by liquid chromatography – mass spectrometry. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (4) supl. 1: 231-234.

19. Lazar ED, Oniga O, Crisan O, Mîndruțau I, Alfa Lupea X. Sinteza și activitatea antituberculoasă in vitro a 2-fenil-4-acetamido (tiocarbamido)-tiazolului și 2-(meta-trifluorometil-fenil)-4-hidrazidometil tiazolului. *Clujul Medical.* 2006; LXXIX (2): 238-243.

20. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D, Hanganu D. Determination of caffeine from instant coffee and cappuccino by liquid-chromatography – mass spectrometry. *Clujul Medical.* 2007; LXXX: 190-194.

21. Vlase L, Mîndruțau I, Muntean D, Iacob D, Leucuta S. High throughput quantification of quinidine in human plasma by LC/MS/MS for therapeutic drug monitoring. *Farmacia.* 2010; 58 (2): 184-189.

22. Vlase L, Felecan I, Muntean D, Iacob D. Quantification of phenobarbital in human plasma by LC/MS/MS for therapeutic drug monitoring. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia.* 2010; LV (1): 15-21.

### **c. Articole publicate în rezumat la congrese internaționale:**

1. Mindrutau I, Vlase L, Leucuta S, Bojita M. Validated HPLC/MS/MS method for quantification of simvastatin and simvastatin  $\beta$ -hydroxy acid in human plasma. *International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006, 26-30 June, Moscow, Russia. Book of Abstracts.* 2006; 1: 213.

2. Mindrutau I, Vlase L, Leucuta S, Fagarasan E, Bojita M. A kinetic study on the degradation of simvastatin in aqueous solutions. *Drug Analysis 2006 May 16-19, Namur, Belgium. Abstract Book.* 2006: PK34.

**“IULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
CLUJ-NAPOCA**



**IOANA DANIELA MÎNDRUȚĂU (married FELECAN)**

**PHYSICOCHEMICAL AND STABILITY STUDY  
OF SOME CHOLESTEROL-LOWERING DRUGS  
FROM THE CLASS OF STATINS**

**Summary of the PhD thesis  
In order to acquire the scientific title of PhD in Medical Sciences,  
Field of Pharmacy**

**Scientific Coordinator  
Prof. Dr. MARIUS BOJIȚĂ**

**2010**

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b> -----	<b>1</b>
<b>THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW</b> -----	<b>3</b>
<b>1. History of statins</b> -----	<b>3</b>
<b>2. Hyperlipidaemias – risk factors for coronary diseases</b> -----	<b>6</b>
2.1. Atherosclerosis and coronary diseases -----	6
2.2. Cholesterol – biosynthesis and metabolism -----	7
2.3. Lipoproteins – structure and metabolism -----	9
2.4. Blood lipid profiles -----	11
2.5. Dislipoproteinaemias -----	11
<b>3. Statins used in the treatment of hyperlipidaemias</b> -----	<b>13</b>
3.1. Representatives -----	13
3.1.1. Statins included in Pharmacopoeias -----	14
3.1.2. Chemical structure – biological activity relationship -----	15
3.1.3. Synthesis and physicochemical properties -----	18
3.2. Statins – pharmacological study -----	20
3.2.1. Pharmacokinetics -----	20
3.2.2. Therapeutic indications -----	22
3.2.3. Side effects, drug interactions, contraindications -----	27
3.2.4. Pharmaceutical products marketed in Romania -----	28
3.3. The study of the analytical properties of simvastatin -----	30
3.3.1. Spectral methods -----	30
3.3.1.1. UV-Vis spectrophotometry -----	30
3.3.1.2. IR spectrophotometry -----	35
3.3.2. Chromatographically methods-----	38
3.3.2.1. High performance liquid chromatography -----	38
3.3.2.2. Bioanalytical chromatographically methods - HPLC coupled with mass spectrometry -----	40
3.3.2.3. HPLC applications in simvastatin’s analysis -----	42
3.3.3. Stability studies-----	47
3.3.3.1. Determination of pharmaceutical impurities -----	48
3.3.3.2. Laws of degradation kinetics -----	53
<b>ORIGINAL RESEARCH AND CONTRIBUTIONS</b> -----	<b>55</b>
<b>4. Spectrophotometric behaviour of simvastatin</b> -----	<b>55</b>
4.1. UV spectrophotometric simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe in tablets by apparent content curve method-----	55
4.2. Infrared spectral characterization of simvastatin -----	69
4.3. Conclusions -----	76

<b>5. Analysis of simvastatin from pharmaceutical dosage forms by high performance liquid chromatography with UV detection</b> -----	<b>77</b>
5.1. Quantification of simvastatin from pharmaceutical dosage forms by HPLC-UV method -----	77
5.2. Simultaneous quantification of simvastatin and ezetimibe from pharmaceutical dosage forms by a HPLC-UV method -----	87
5.2.1. Method validation for the determination of simvastatin and ezetimibe from pharmaceutical dosage forms -----	87
5.2.2. Application of the validated HPLC-UV method for the simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe from commercial tablets -----	97
5.2.3. Comparing the simultaneous quantification of simvastatin and ezetimibe from commercial tablets results, obtained by spectrophotometric ACC method and by HPLC-UV method -----	99
5.3. Conclusions -----	101
<b>6. Analysis of simvastatin in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry</b> -----	<b>102</b>
6.1. Optimization of a HPLC coupled with mass spectrometry method for the quantification of simvastatin in human plasma -----	102
6.2. Simultaneous quantification of simvastatin and its metabolite – the hydroxiacid of simvastatin, in human plasma by a HPLC-MS-MS method -----	109
6.2.1. Choice of mobile phase and detection optimization-----	113
6.2.2. Extraction optimization -----	114
6.2.3. Choice of plasma pH additives and reconstitution solvents -----	116
6.2.4. Method validation for the determination of simvastatin and simvastatin’s hydroxiacid in human plasma -----	118
6.3. Conclusions -----	127
<b>7. Stability studies of simvastatin</b> -----	<b>128</b>
7.1. Simvastatin’s impurities profiles -----	128
7.1.1. Qualitative and pre-validation study -----	131
7.1.2. Determination of simvastatin’s impurities from pharmaceutical dosage forms -----	142
7.2. Kinetic studies of simvastatin’s forced degradation in solutions -----	144
7.2.1. pH influence on the degradation of simvastatin in aqueous solutions -----	144
7.2.2. Temperature influence on the degradation of simvastatin in aqueous solutions -----	157
7.2.3. UV light influence on the degradation of simvastatin in non-aqueous solutions -----	159
7.2.4. Conclusions-----	167
<b>GENERAL CONCLUSIONS</b> -----	<b>168</b>
<b>REFERENCES</b> -----	<b>173</b>

**KEYWORDS:** simvastatin, cholesterol-lowering drugs, analytical methods for the determination from pharmaceutical dosage forms and from human plasma, impurities, forced degradation kinetics.

## **I. THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW**

Statins have become a “phenomenon” widespread worldwide, both as a benefit in a wide range of conditions and as a commercial value on the pharmaceutical market. Statins are a class of drugs introduced into therapy in the years 1980-1990 in order to provide patients with hypercholesterolemia an effective and safe treatment for lowering blood cholesterol levels [1].

Currently there are seven statins that are marketed in the world: lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin and pitavastatin. They all have structural similarities that cause their mechanism of action to be the same: inhibiting the hydroxy-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, involved in the biosynthesis of cholesterol in the liver [2].

Simvastatin is the most representative compound of the class of statins, with the most successful market. It was the second statin introduced on the pharmaceutical market, a couple of years after lovastatin

Currently, there are described in the literature several studies for the identification and quantification of simvastatin from raw materials, pharmaceutical dosage forms or biological samples.

Analytical methods used for these purposes range from ultraviolet spectrophotometry [3-5] to high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [6-7] or coupled with mass spectrometry [8-10]. Regarding stability studies of simvastatin, the majority of them focus on the stability of the substance during extraction procedures from biological samples [11].

## **II. ORIGINAL RESEARCH AND CONTRIBUTIONS**

The research objective was to develop a methodology for the quality control study in the class of statins, class that is considered sensitive in terms of stability, by adopting simvastatin as the model of study. While performing experiments, lovastatin was also evaluated as the official impurity of simvastatin.



Studies have pursued four research lines: (1) developing sensitive and selective analytical methods for the determination of simvastatin in synthetic media and pharmaceutical dosage forms (2) developing sensitive and selective analytical methods for determination of simvastatin and its active metabolite in biological samples (3) chromatographic separation of simvastatin's impurities, of known and unknown nature and (4) developing a study of stability under forced degradation conditions of pH, temperature and exposure to UV light, establishing the degradation kinetics.

### **SPECTROPHOTOMETRIC BEHAVIOUR OF SIMVASTATIN**

The spectrophotometric study of simvastatin followed two research directions: (1) simultaneous quantification of simvastatin and ezetimibe in tablets by a UV spectrophotometric method and by the apparent content curve method and (2) identifying and assessing the purity of a sample of simvastatin raw material by infrared spectrophotometry.

There were studied two commercial products containing simvastatin and ezetimibe (a cholesterol-lowering agent from the class 2-azetidione) – the original product and a generic product under preliminary studies, both with a content of 10 mg simvastatin and 10 mg ezetimibe. The developed apparent content curve method (ACC) proved to be simple, fast and with the accuracy comparable to that of a validated chromatographic method. Both commercial products studied by this method contained an amount of substance which falls within the range 92.5% - 107.5%, accepted by the pharmacopoeias.

IR spectral study was applied to simvastatin as raw material, simvastatin as pharmacopoeia standard and two official impurities as manufacturer standards (hydroxyacid simvastatin and simvastatin dimer). There were highlighted in the spectrum of the raw material, the absorption bands corresponding to the vibration of main functional groups of simvastatin. But it was found that the intensity of absorption bands corresponding to carbonyl groups in the molecule of simvastatin, in the IR spectrum of the raw material, is different from intensities in the available reference spectra of simvastatin. By comparing the sample spectrum with reference spectra of the two official impurities simvastatin (simvastatin hydroxyacid and dimer)

it was concluded that the raw material contains simvastatin and a degradation product, most likely the hydroxyacid.

### **ANALYSIS OF SIMVASTATIN FROM PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV DETECTION**

A HPLC-UV method with isocratic elution was developed for the determination of simvastatin in tablets, which proved to be simple and rapid, with a chromatographic analysis run-time under nine minutes. The method was validated according to the specific international guidelines and proved to be linear, accurate and precise and can be used to current determinations of simvastatin from pharmaceutical dosage forms [12].

The chromatographically determination of simvastatin was expanded to simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe from tablets using a HPLC-UV method. The method passed all the validation acceptance criteria and is considered linear, accurate and precise. The results of this study were used as reference data for the determination of simvastatin and ezetimibe in tablets by the ACC spectrophotometric method (presented in the previous chapter), proving that the spectrophotometric method has an appropriate accuracy.

### **ANALYSIS OF SIMVASTATIN IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY**

The analysis of simvastatin in human plasma faces the problem of achieving very low plasma concentrations (0.2 to 15 ng/mL), following oral administration of dosage forms with simvastatin. Therefore, we wanted to develop a sufficiently sensitive method to detect plasma concentrations of simvastatin and simvastatin's hydroxyacid (the active metabolite of simvastatin) equivalent to those achieved following the oral administration of pharmaceuticals, so that this method could be applied in pharmacokinetic and bioequivalence studies.

Two methods have been developed in order to quantify simvastatin in human plasma. The first detection method was used to monitor sodium adduct of simvastatin in SIM (single ion monitoring) mode and SRM mode (single reaction monitoring), in the range of concentrations from 0.2 to 6.7 ng/mL. The results established that the method of quantification of simvastatin in plasma by LC-MS-MS is about 100 times more sensitive than LC-MS method [13].

The next step was to develop a HPLC-MS-MS method for the simultaneous determination of both simvastatin and its metabolite (simvastatin acid) in human plasma. Since the formation of the adduct ion with  $\text{Na}^+$  for the simvastatin acid was unsatisfactory, it was chosen, as the simultaneous detection method, a LC-MS-MS method with MRM (multiple reaction monitoring) detection, using the protonated molecular ion  $[\text{M}+\text{H}^+]$  as the parent ion of each of the two substances. The mobile phase used was acetonitrile / trifluoroacetic acid 0.01% pH 4.1 with ammonia (70/30, v/v). The HPLC-MS-MS method was developed to meet the validation requirements of bioanalytical methods and is characterized by specificity, sensitivity, linearity, accuracy and precision in the range of concentrations from 0.12 to 12.73 ng/mL, for simvastatin, and from 0.12 to 12.61 ng/mL, for simvastatin acid. This method was later applied to analyze more than 1000 plasma samples from healthy volunteers within the bioequivalence study of generic products with the simvastatin, performed by the University's Laboratory of Bioequivalence.

### **STABILITY STUDIES OF SIMVASTATIN**

Two types of stability studies of simvastatin were carried out: (1) the separation and identification of simvastatin's impurities and (2) degradation kinetic studies of simvastatin in solutions, under forced conditions of pH, temperature and UV light.

The separation and the identification of simvastatin's impurities were achieved by optimizing an HPLC-UV method. Several factors that can influence the separation of simvastatin and impurities were tested: the type of chromatographic column, mobile phase composition, detection wavelength, column temperature. The chosen chromatographic column and mobile phase enabled the separation of all known and of some unknown impurities of simvastatin with satisfactory resolution and with an acceptable limit of quantification (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

During method development for the separation of the impurities of simvastatin, it was observed that the major degradation product is the hydroxyacid of simvastatin (the official impurity A). In the same time, a significant amount of simvastatin was degraded to an unknown impurity, which eluted immediately after simvastatin. A second unknown impurity was separated between the official impurities B and C. Several structural formulas were proposed for these unknown impurities, taking into consideration the possible hydrolytic degradations of the cyclic and acyclic ester functional groups in simvastatin's molecule. This method has been subject to a pre-validation study by the statistical evaluation of the linearity of simvastatin and of the six official impurities available. The method proved to be linear in the concentration range from 0.1 to 26 µg/mL for all substances. Simvastatin's impurities were quantified in commercial tablets, all impurities falling below the maximum limit accepted by pharmacopoeias, except from the impurity A – the hydroxyacid, which exceeded that limit.

The purpose of the kinetic studies was to evaluate the kinetics of the degradation of simvastatin in aqueous medium, depending on the pH and temperature conditions, respectively the degradation of simvastatin by exposure to UV light in non-aqueous solutions, using HPLC methods with UV detection.

Kinetic studies performed under forced conditions of pH, temperature and UV light revealed a complex behavior in the degradation of simvastatin. Simvastatin hydrolysis was pH-dependent, being more pronounced at alkaline than acidic pH. After the acidic or basic hydrolysis of simvastatin, simvastatin hydroxyacid was identified in the chromatograms as degradation product ( $t_R = 1.77$  min). Simvastatin's degradation in alkaline pH is described by the laws of the pseudo-first order kinetics. Neutral to acidic pH kinetics becomes very complex and the experimental data modeling equations are polynomial functions of high orders (5 and 9). At neutral and acidic pH, the hydrolysis of simvastatin follows an equilibrium reaction and the maximum stability of simvastatin was determined at pH 6-7. The elevated temperatures favored the alkaline hydrolysis of simvastatin and induced changes in the degradation mechanism.

Under UV stress in non-aqueous medium, simvastatin was degraded after a first order kinetics. One of the possible pathways of degradation in this case is an oxidation reaction, since the degradation rate was lower in methanolic solutions in the

presence of butylhydroxytoluene than the degradation rate in methanol solutions without butylhydroxytoluene.

### SELECTIVE REFERENCES

1. Endo A. The origin of the statins. *International Congress Series*. 2004; 1262: 3 – 8.
2. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004; 19: 117-125.
3. Wang L, Asgharnejad M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. *J Pharm Biomed Anal*. 2000; 21: 1243-1248.
4. Erk N. Rapid spectrophotometric method for quantitative determination of simvastatin and fluvastatin in human serum and pharmaceutical formulations. *Pharmazie*. 2002; 57: 817-819.
5. Arayne MS, Sultana N, Hussain F, Ali SA. Validated Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Simvastatin in Pharmaceutical Formulations and Human Serum. *J Anal Chem*. 2007; 62(6): 536-541.
6. Pasha MK, Muzeeb S, Basha SJS et al. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors- atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis an in vitro metabolism studies. *Biomed Chromatogr*. 2006; 20: 282-93.
7. Kumar V, Shah RP, Singh S. LC and LC-MS methods for the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases. Part 1. Separation of active components and classification of their interaction/degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 47: 508-515.
8. Zhao JJ, Yang A, Rogers JD. Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion spray tandem mass spectrometric determination. *J. Mass Spectrom*. 2002; 37: 421-433.
9. Barret B, Huclova J, Borek-Dohalsky V et al. Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 41: 517-526.
10. Zhang N, Yang A, Rogers JD, Zhao JJ. Quantitative analysis of simvastatin and its  $\beta$ -hydroxy acid in human plasma using automated liquid-liquid extraction based on 96-well plate format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2004; 34: 175-187.
11. Jemal M, Ouyang Z, Powell ML. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2000; 23: 323–340.
12. Mîndruțau I, Iuga C, Bojiță M, Imre S, Kiss B, Făgărășan E. Validation of a RP-HPLC assay for simvastatin in pharmaceutical dosage forms. *Revista de Medicină și Farmacie, Târgu-Mureș University Press*. 2004; 50(II): 235-237.
13. Mîndruțau I, Vlase L, Leucuta S, Bojița M. Optimization of chromatographic and detection parameters for the determination of simvastatin in human plasma. *Timisoara Medical Journal*. 2005; 55(5): 106-109.

# CURRICULUM VITAE

## A. PERSONAL DATA

1. **Name:** Ioana Daniela Felecan (born Mîndruțău)
2. **Date and place of birth:** 21.06.1977, Arad
3. **Nationality:** Romanian
4. **Marital status:** Married
5. **Email:** ifelecan@umfcluj.ro
6. **Educational background:**

Institution	High School	Faculty	Faculty	Specialty
	Moise Nicoara High School from Arad	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy	General Pharmacy / Pharmaceutical Laboratory
<b>Date from-Date to</b>	1992-1996	1996-2001	2003-2004	2002-2003/ 2005-2007
<b>Degrees obtained</b>	A-level	Bachelor of Science in Pharmacy	Master - Drug's Study and Analysis	Specialist Pharmacist

## 7. Scientific title and academic degree:

- PhD Student, Lecturer

## 8. Employment record:

Date from-Date to	Institution	Position
2007- present	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, Department of Physical Chemistry	Lecturer
2002-2007	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, Department of Physical Chemistry	Teaching Assistant
2002	Municipal Clinical Hospital from Cluj-Napoca	Resident Pharmacist

## 9. Professional training courses:

- Erasmus Scholarship - Faculty of Pharmacy, Valencia, Spain, 2000
- Merck HPLC Course, Busteni, 2005
- Hands-on-Dissolution Workshop, Bucharest, 2005
- Pathologie et pharmacologie moléculaire: Biotechnologies, Arad, 2005
- PRIME Course “Teaching and Learning, a Course for Medical Educators”, Cluj-Napoca, 2009

## 10. Member of professional associations:

- member of Pharmaceutical Sciences Society in Romania
- member of Romanian Chemistry Society
- member of College of Pharmacists in Romania

## 11. Language skills:

- English – Certificate in Advanced English CAE, 2005
- French – Diplôme Approfondi de Langue Française DALF - Unités B1, B2, B3, B4, 2002

## B. SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS

### a. Research projects:

1. Research project CNCSIS 1511/2004-2005. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea potențialului antiinfecțios al unor derivați heterociclici de acetofenonă. Member.
2. Research project CEEEX 7/3.10.2005. Forme polimorfice și încapsularea substanțelor bioactive în ciclodextrine privind îmbunătățirea calității medicamentelor. Member.
3. Research project CEEEX ET nr 5860/18.09.2006. Dezvoltarea și validarea unor metode bioanalitice și implementare-utilizare în monitorizarea concentrațiilor medicamentoase plasmatică și studii farmacocinetice de biodisponibilitate. Member.
4. Research project CEEEX Modul I, Tip P-CD -2006. Biomateriale compozite pentru radioterapie și hipertermie simultană. Member.
5. Research project 2 Cex-06-11-55/26.07.2006. Compuși seleniu și telur-organici în chimia coordinativă – COSETEORG. Member.

### b. Scientific papers published in extenso in Romania:

1. Imre S, Mîndruțau I. Resolution of ternary mixtures. Principles and analytical application. Applied Medical Informatics. 1999; 7 (2): 13-18.
2. Imre S, Marin-Saez R, Bojiță M, Făgărășan E, Mîndruțau I. Aplicarea metodei curbei conținutului aparent la determinarea simultană a ondansetronului și metoclopramidului. Farmacia. 2000; XLVIII (5): 61-69.
3. Imre S, Mîndruțau I, Făgărășan E, Muntean DL, Avrigeanu V. Corelare structură-date spectrale în cazul metoclopramidului și ondansetronului. Farmacia. 2002; L (6): 37-47.
4. Kiss B, Iuga C, Rus LL, Bojiță M, Mîndruțau I. Quantification of Rapamycin in whole blood by HPLC. Method optimization. "Ovidius" University Annals of Medical Science – Pharmacy. 2003; 1(1): 117-122.
5. Rus LL, Kiss B, Iuga C, Bojiță M, Nemeti L, Mîndruțau I. HPLC Analysis of some hydrosoluble vitamins (thiamine, riboflavin, riboflavin-5-phosphate, pyridoxine, cyanocobalamin, nicotinamide). "Ovidius" University Annals of Medical Science – Pharmacy. 2003; 1(1): 103-106.
6. Imre S, Mîndruțau I, Zaharia V, Avrigeanu V, Muntean DL, Făgărășan E. Stabilitatea în soluție a ondansetronului. Clujul Medical. 2004; LXXVII (1): 146-151.
7. Neamțu J, Făgărășan E, Gofița E, Croitoru O, Mîndruțau I. Dozarea spectrofotometrică IR a unor amestecuri de substanțe. Clujul Medical. 2004; LXXVII (3): 597-603.
8. Tămaș M, Făgărășan E, Mîndruțau I, Oprean R. Identification and quantitative determination of aristolochic acid from birthwort (Aristolochia clematitis, Aristolochiaceae). Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca. 2004; 60: 42-47.
9. Mîndruțau I, Iuga C, Bojiță M, Imre S, Kiss B, Făgărășan E. Validation of a RP-HPLC assay for simvastatin in pharmaceutical dosage forms. Revista de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș. 2004; 50(2): 235-237.
10. Imre S, Mîndruțau I, Avrigeanu V, Filip L, Muntean DL, Mircia E. Stabilitatea în soluție a metoclopramidei. Revista de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș. 2004; 50(2): 66-69.
11. Imre S, Mîndruțau I, Marin-Saez R, Muntean DL, Bojiță M, Făgărășan E. Quantitative spectrophotometric determination of mixtures with three components. Perspective în practica farmaceutică: lucrări în extenso prezentate și comunicate în

cadrul simpozionului „Zilele Farmaceutice Orădene” ed. a II-a, Editura Universității din Oradea. 2005: 83-87.

12. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D. Determination of caffeine by LC/MS from beverages. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica, L, 4b. Proceedings of the Fourth Conference “Isotopic and Molecular Processes” Cluj-Napoca.* 2005: 527-531.

13. Vlase L, Filip L, Mîndruțau I, Leucuța S. Determination of nicotine from tobacco by LC-MS-MS. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica, L, 4b. Proceedings of the Fourth Conference “Isotopic and Molecular Processes” Cluj-Napoca.* 2005: 531-535.

14. Mîndruțau I, Vlase L, Leucuța S, Bojiță M. Optimization of chromatographic and detection parameters for the determination of simvastatin in human plasma. *Timisoara Medical Journal.* 2005; 55(5): 106-109.

15. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D. Determinarea cafeinei din bauturi energizante prin LC/MS. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (3): 664-667.

16. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D. Determination of caffeine from different brands of coffee. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (4) supl. 1: 189-192.

17. Vlase L, Mîndruțau I, Filip L, Leucuța S. Determination of xantines from foods by liquid-chromatography-mass spectrometry. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (4) supl. 1: 227-230.

18. Mîndruțau I, Vlase L, Filip L, Leucuța S. Determination of purine alkaloids in green and black tea by liquid chromatography – mass spectrometry. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași.* 2005; 109 (4) supl. 1: 231-234.

19. Lazar ED, Oniga O, Crisan O, Mîndruțau I, Alfa Lupea X. Sinteza și activitatea antituberculoasă in vitro a 2-fenil-4-acetamido (tiocarbamido)-tiazolului și 2-(meta-trifluorometil-fenil)-4-hidrazidometil tiazolului. *Clujul Medical.* 2006; LXXIX (2): 238-243.

20. Filip L, Vlase L, Mîndruțau I, Miere D, Hanganu D. Determination of caffeine from instant coffee and cappuccino by liquid-chromatography – mass spectrometry. *Clujul Medical.* 2007; LXXX: 190-194.

21. Vlase L, Mîndruțau I, Muntean D, Iacob D, Leucuta S. High throughput quantification of quinidine in human plasma by LC/MS/MS for therapeutic drug monitoring. *Farmacia.* 2010; 58 (2): 184-189.

22. Vlase L, Felecan I, Muntean D, Iacob D. Quantification of phenobarbital in human plasma by LC/MS/MS for therapeutic drug monitoring. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia.* 2010; LV (1): 15-21.

### **c. Abstracts published at international congresses:**

1. Mindrutau I, Vlase L, Leucuta S, Bojita M. Validated HPLC/MS/MS method for quantification of simvastatin and simvastatin  $\beta$ -hydroxy acid in human plasma. *International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006, 26-30 June, Moscow, Russia. Book of Abstracts.* 2006; 1: 213.

2. Mindrutau I, Vlase L, Leucuta S, Fagarasan E, Bojita M. A kinetic study on the degradation of simvastatin in aqueous solutions. *Drug Analysis 2006 May 16-19, Namur, Belgium. Abstract Book.* 2006: PK34.