

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

**STUDII FIZICO-CHIMICE ȘI ANALITICE ÎN CLASA
INHIBITORILOR SELECTIVI AI CANALELOR DE
CALCIU (DERIVAȚI AI DIHIDROPIRIDINEI)**

- Rezumatul tezei de doctorat -

***Doctorand:*
Farm. Bradea Otilia-Laura**

***Conducător științific:*
Prof. dr. Elena Curea**

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	3
Capitolul I.....	3
ANTIHIPERTENSIVI ANTAGONIȘTI SELECTIVI AI CANALELOR DE CALCIU.GENERALITĂȚI ASUPRA DERIVAȚILOR DIHIDROPIRIDINICI.....	3
1.1. Scurt istoric.....	3
1.2. Clasificarea substanțelor medicamentoase blocante ale canalelor de calciu...4	4
1.3. Structura chimică a 1,4-dihidropiridinelor.....	5
1.4. Proprietățile fizico-chimice ale 1,4-dihidropiridinelor.....	9
1.5. Obținerea derivaților 1,4-dihidropiridinici.....	10
1.6. Proprietățile biologice ale 1,4-dihidropiridinelor.....	12
6.1. Relații structură chimică-acțiune biologică.....	12
6.2. Farmacocinetică.....	15
1.7. Acțiune terapeutică și forme farmaceutice.....	16
7.1. Reacții adverse, interacțiuni și contraindicații.....	18
7.2. Produse farmaceutice comercializate în România.....	20
1.8. Concluzii.....	21
Capitolul II.....	23
METODE ANALITICE INSTRUMENTALE ÎN STUDII FIZICO-CHIMICE DE IDENTITATE, PURITATE, STABILITATE, COMPATIBILITATE ȘI ÎN CUANTIFICAREA DERIVAȚILOR 1,4-DIHIDROPIRIDINICI.....	23
II.1. Metode analitice bazate pe proprietățile spectrale ale 1,4-dihidropiridinelor.....	23
1.1. Spectrofotometria UV-VIS.....	23
1.2. Spectrometria în IR.....	27
II.2. Metode analitice bazate pe proprietățile cromatografice ale 1,4-dihidropiridinelor.....	29
2.1. Cromatografia de lichide pe strat subțire.....	29
2.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță.....	30
II.3. Metode analitice bazate pe proprietățile redox ale 1,4-dihidropiridinelor.....	32
3.1. Voltametria cu baleiaj liniar și voltametria ciclică.....	33
3.2. Metode voltametrice puls diferențiale.....	35
II.4. Metode analitice în studii de stabilitate ale 1,4-dihidropiridinelor.....	37
4.1. Mecanisme de degradare în clasa 1,4-dihidropiridinelor.....	37
4.2. Spectrofotometria derivată în monitorizarea fotodegradării 1,4-dihidropiridinelor.....	39
II.5. Metode analitice de determinare a impurităților din produsul finit Amlodipina.....	40
II.6. Metode analitice utilizate în studiul complexilor de incluziune ai ciclodextrinelor cu diferite substanțe medicamentoase.....	43
6.1. Importanța fenomenului includerii în practică.....	43
6.2. Metode de cercetare a complexilor de incluziune ai amlodipinei în ciclodextrine.....	45
6.3. Validarea metodelor analitice.....	47
II.7. Concluzii.....	49
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	50
Capitolul III.....	50
STUDIUL SPECTRAL ÎN UV-VIS AL AMLODIPINEI BESILAT.....	50
III.1. Aspecte generale.....	50

III.2. Spectrul UV-criteriu de identitate al amlodipinei besilat.....	51
2.1. Validarea metodei de identificare a amlodipinei besilat din forme farmaceutice prin spectrofotometrie UV-VIS	53
III.3. Validarea metodei de dozare a amlodipinei besilat și determinarea uniformității conținutului prin spectrofotometrie în ultraviolet.....	56
3.1. Validarea metodei de dizolvare a amlodipinei besilat din comprimate prin spectrofotometrie în ultraviolet.....	70
III.4. Determinarea spectrofotometrică în vizibil a amlodipinei besilat din comprimate.....	75
III.5. Spectrul IR-criteriu de identitate al amlodipinei besilat.....	78
III.6. Concluziile studiului spectral.....	81
Capitolul IV.....	83
STUDIUL CROMATOGRIFIC (CSS, HPLC) AL AMLODIPINEI BESILAT....	83
IV.1. Analiza calitativă prin cromatografie pe strat subțire a amlodipinei besilat.....	83
1.1. Identificarea amlodipinei besilat prin cromatografie pe strat subțire.....	85
1.2. Determinarea impurităților înrudite chimic prin cromatografie pe strat subțire.....	87
IV.2. Determinarea impurităților înrudite chimic ale amlodipinei besilat prin metoda HPLC.....	89
IV.3. Concluziile studiului cromatografic.....	93
Capitolul V.....	95
STUDII ELECTROANALITICE BAZATE PE PROPRIETĂȚILE REDOX ALE AMLODIPINEI.....	95
V.1. Principiul metodei și aparatura.....	95
V.2. Dozarea amlodipinei besilat prin voltametrie puls diferențială cu electrod de carbon sticlos.....	97
V.3. Validarea metodei de determinare a amlodipinei besilat din forme farmaceutice prin voltametrie puls diferențială cu electrod pastă de carbon.....	100
V.4. Validarea metodei de determinare a amlodipinei besilat din forme farmaceutice prin voltametrie puls diferențială cu electrod pastă de carbon modificat.....	109
V.5. Concluziile studiului electroanalitic.....	116
Capitolul VI.....	118
STUDII FIZICO-CHIMICE ȘI ANALITICE PRIVIND INTERACȚIUNEA AMLODIPINEI BESILAT CU β-CICLODEXTRINA.....	118
VI.1. Ciclodextrine-structură, proprietăți, capacitatea de a interacționa cu substanțe medicamentoase.....	118
1.1. Structură, proprietăți fizico-chimice și toxicologice.....	119
1.2. Condiții structurale în formarea complexilor de incluziune cu substanțe medicamentoase.....	123
VI.2. Metode de obținere a complexilor supramoleculari ai amlodipinei besilat cu β -ciclodextrina.....	125
VI.3. Analiza și caracterizarea complexului de incluziune Amlodipină- β -CD.....	127
3.1. Analiza spectrofluorimetrică.....	127
3.2. Analiza spectrală FTIR.....	131
3.3. Analiza prin difracție cu raze X.....	139
3.4. Analiza termică prin DSC.....	140
3.5. Modelare moleculară asupra complexilor de incluziune ai amlodipinei cu β -	

CD.....	142
3.6. Concluzii privind analiza complexului de incluziune amlodipină- β -ciclodextrină.....	143
CONCLUZII GENERALE.....	145
BIBLIOGRAFIE.....	152

Cuvinte cheie: amlodipina, identificare, dozare, dizolvare, validare, voltametrie, complecși macromoleculari.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În clasa antagoniștilor canalelor de calciu, derivații 1,4-dihidropiridinici ocupă un rol foarte important în tratarea afecțiunilor cardiovasculare. Această clasă cuprinde reprezentanți cu o structură chimică susceptibilă de transformări sub acțiunea factorilor de mediu, de asociere cu alte substanțe auxiliare sau factori tehnologici, ceea ce impune stabilirea unor metode analitice care să evidențieze aceste transformări. S-au preparat și introdus în terapie compuși noi, cu rolul de a împiedica evoluția și de a preveni sau reduce simptomatologia afecțiunilor cardiovasculare. Un astfel de derivat dihidropiridinic este **amlodipina**, un blocant selectiv al canalelor de calciu, un ester asimetric, fiind un amestec de doi enantiomeri, o moleculă lipofilă, care nu este ionizată la pH-ul fiziologic și poate difuza prin membrane.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Controlul calității și purității substanțelor medicamentoase în preparate farmaceutice se realizează prin utilizarea unor metode specifice selective, care să ateste puritatea, identitatea și cantitatea de principiu activ/doză. Ne-am propus elaborarea unor metode spectrale, cromatografice și voltametrice de separare și identificare a **amlodipinei besilat** din produse farmaceutice existente pe piața românească de medicamente, precum și asocierea amlodipinei besilat cu β -ciclodextrina și analiza complecșilor de incluziune rezultați.

Spectrofotometria în UV-VIS-IR se bazează pe proprietățile spectrale de absorbție ale amlodipinei besilat în domeniul lungimilor de undă 200-400 nm (UV) și 500-3600 cm^{-1} (IR) și după o transformare chimică, în domeniul 400-700 nm (VIS). Absorbțiile maxime ale amlodipinei besilat în soluție apoasă (0,01-0,09 mM) se situează la 239 și 366 nm.

Elaborarea metodelor specifice în UV la identificarea amlodipinei besilat, determinarea uniformității conținutului în amlodipină besilat din comprimatele *Tardip* (5 mg amlodipină besilat/comprimat) și a dizolvării acestui principiu activ din comprimate a fost posibilă după un studiu prealabil al condițiilor experimentale optime pentru cazurile menționate. Absorbția amlodipinei besilat după extragerea ei din comprimate în soluție de acid clorhidric în metanol 0,01 mol/l, se situează la lungimea de undă $\lambda = 360 \pm 2$ nm, la care masa de excipienți nu interferează.

Validarea metodei spectrofotometrice în ultraviolet s-a realizat respectând protocolul oficial. Astfel, s-au utilizat: probe de analizat, probe cu forma farmaceutică reconstituită, soluții etalon de amlodipină besilat și probe placebo.

Rezultatele spectrelor de absorbție pentru soluția etalon și soluția conținând forma farmaceutică reconstituită au stat la baza rezultatelor studiului de liniaritate.

- S-au calculat coeficienții de regresie și de corelare (r_{xy}) și s-a atestat **liniaritatea** metodei.
- **Acuratețea** metodei se poate evalua pe baza unor serii de determinări în care se înregistrează rezultate care se încadrează în criteriile de admisibilitate (intervalul de încredere al mediei calculată la un prag de siguranță $\alpha_{95\%}$ se încadrează în intervalul 98-102%, RSD=1,2%).
- **Precizia** metodei a fost validată pentru fiecare set de determinări prin valorile RSD (0,469 și 1,969), testul statistic $Q_{90\%}$ ($< 0,56$), $t_{95\%} = 2,23$.
- Metoda de dozare și de determinare a uniformității conținutului este **specifică** în raport cu excipienții.

Validarea metodei de dizolvare a amlodipinei besilat din comprimate în mediu de acid clorhidric 0,01 mol/l în metanol la 37°C s-a realizat prin reconsiderarea spectrelor de absorbție pentru soluții etalon și probe de Tardip (5 mg amlodipină besilat/comprimit).

Astfel, determinările s-au realizat la lungimea de undă 360 ± 2 nm, la care soluția placebo prezintă o absorbție nesemnificativă – deci metoda este specifică pentru dizolvarea amlodipinei besilat din comprimate.

Metoda spectrofotometrică în vizibil de determinare a amlodipinei besilat ca atare și din comprimate Norvasc (10 mg amlodipină besilat/comprimit) după dizolvarea amlodipinei besilat în DMF a fost pusă la punct după un studiu fizic și chimic a reacției amlodipinei besilat cu ninhidrina 0,06M în același mediu.

Colorația albastră obținută la cald a produsului rezultat prin reacție chimică prezintă o absorbție maximă la $\lambda = 590$ nm. Metoda este simplă, rapidă și selectivă.

Pentru verificarea identității și purității materiilor prime s-a recurs la spectrul IR. S-au identificat benzile de absorbție corespunzătoare elementelor din structura amlodipinei besilat detectabile în IR. S-a confruntat spectrul IR al probei cu spectrul de referință menționat în farmacopei [8].

În realizarea identificării spectrale în IR a **amlodipinei besilat** în condițiile experimentale proprii laboratoarelor noastre, am avut în vedere **perspectiva** pe care această determinare o deschide **interpretării fenomenului de incluziune** dintre **amlodipina besilat și β -ciclodextrină**.

Puritatea substanțelor medicamentoase este un parametru de calitate de care trebuie să se țină seama și în cazul condiționării lor în comprimate.

Cromatografia în strat subțire (Silicagel GF₂₅₄), migrarea pe o distanță de 15 cm a plăcilor, în cuve saturate cu vaporii dezvoltantului (acid acetic glacial: apă: metil izobutil cetonă), încălzire (80 °C, 15 minute) și examinare în lumină ultraviolet (254, 366 nm) evidențiază două impurități la R_f 0,18 și 0,22 în afara petei principale datorată amlodipinei ($R_f = 0,66$).

Specificitatea cromatografiei în strat subțire este dovedită în condițiile date, în raport cu o soluție etalon și o soluție placebo (care conține amestecul de excipienți fără principiul activ). Pata principală ($R_f = 0,66$) corespunzătoare amlodipinei besilat se regăsește în dreptul soluției etalon și lipsește în soluția placebo.

Determinarea impurităților înrudite chimic și a limitei de detecție prin metoda CSS s-a efectuat folosind soluții obținute prin diluări succesive ale soluției etalon de amlodipină besilat cu metanol. Concentrația de 0,04% (raportată la concentrația soluției probă) reprezintă limita de detecție.

HPLC, metodă de înaltă specificitate și cu o limită de detecție optimă, s-a aplicat probelor după extragerea principiului activ în faza mobilă (acetonitril: metanol: trietilamină) și injectarea soluției pe o coloană Zorbax Extend C 18 a unui cromatograf de lichide Agilent.

Raportul de performanță pentru cromatograma soluției de referință prezintă o valoare a rezoluției dintre picurile corespunzătoare impurității D și cel al amlodipinei egală cu 8,84. Timpul de retenție relativ al impurității D este de aproximativ 0,5.

Limita de detecție se determină experimental stabilind concentrația amlodipinei pentru care raportul semnal/zgomot de fond este egal cu 3. Pentru o soluție de amlodipină de concentrație 0,6 μg/ml calculul raportului semnal/zgomot s-a realizat cu softul de prelucrare a datelor Chem Station Rev. A.08.03-A.08.04. Agilent Tehnologies și are valoarea 6,2, iar limita de detecție este egală cu 0,29 μg/ml.

Metodele electroanalitice au devenit competitive cu alte metode de analiză, având ca avantaje sensibilitatea pe un domeniu foarte mare de concentrație (10^{-12} – 10^{-1} mol/l), folosirea unui număr mare de solvenți și electroliți, timpul de analiză scurt.

Voltametria puls diferențială pe un electrod de carbon sticlos, bazată pe oxidarea dihidropiridinelor la suprafața electrodului, folosind ca electrolit tamponul Britton-Robinson (pH= 2), a fost utilizată la determinarea amlodipinei besilat din comprimate *Norvasc* (10 mg amlodipină besilat/comprimat). Prin metoda grafică s-a calculat limita de detecție ca fiind 7,02 mM, iar limita de cuantificare 21,06 mM.

Regăsirea medie a dozării principiului activ (amlodipina besilat) din comprimatele *Norvasc* 10 mg este 98,67%, iar deviația standard 3,88%.

Validarea metodei de determinare a amlodipinei besilat ca atare și din comprimate (*Norvasc*-10 mg amlodipină besilat/comprimat, *Tardip*-10mg amlodipină besilat/comprimat) s-a realizat prin voltametrie puls diferențială cu electrod pastă de carbon.

- **Liniaritatea** rezultatelor analitice a fost evaluată prin calcularea ecuației drepte de regresie și a coeficientului de corelație. Măsurătorile au fost repetate de 3 ori pe același set de soluții, iar valorile înregistrate ale potențialului au fost supuse prelucrării statistice prin metoda celor mai mici pătrate, obținându-se ecuația drepte de regresie $Y = 5E + 0,6x + 3,9868$ și coeficientul de corelație egal cu 0,9898.
- Evaluarea **acurateții** metodei se face prin calcularea procentului de regăsire (cantitatea de substanță cunoscută adăugată în proba de analizat). Regăsirea medie este 91,43 %, iar deviația relativă standard (RSD) în acest caz este de 1,14%.
- **Repetabilitatea** a fost determinată prin dozarea a trei soluții probă de besilat de amlodipină $5,50 \cdot 10^{-8}$ M în aceeași zi. S-au efectuat trei măsurători, s-a calculat abaterea standard (SD = 1,03 %) și abaterea standard relativă (RSD = 1,08 %).
- **Reproductibilitatea** a fost determinată prin analiza a trei soluții probă de besilat de amlodipină $5,50 \cdot 10^{-8}$ M în trei zile consecutive. S-a calculat abaterea standard (SD = 1,66 %) și abaterea relativă standard (RSD = 1,77 %).

- Prin metoda grafică s-a stabilit concentrația minimă detectabilă ca fiind $8,84 \cdot 10^{-8}$ M, iar limita de cuantificare $26,52 \cdot 10^{-8}$ M.
- **Regăsirea medie** a dozării amlodipinei besilat din comprimatele Norvasc 10 mg a fost de 117,91%, iar din comprimatele Tardip 10 mg 63,32%.

Electrozii pastă de carbon pot fi modificați chimic într-un mod avantajos în scopul îmbunătățirii selectivității și sensibilității lor, având ca urmare permiterea desfășurării unor reacții chimice pe suprafața electrodului sau asigurarea transferului electronilor.

Electrodul pastă de carbon modificat a fost utilizat la determinarea cantitativă a besilatului de amlodipină din forme farmaceutice (Norvasc comprimate 10 mg, Tardip comprimate 10 mg) prin voltametrie puls diferențială. Metoda a fost validată, având o regăsire medie a dozării amlodipinei besilat din comprimatele de Norvasc 10 mg de 88,47%, iar din comprimatele Tardip 10 mg 61,58%.

Reproductibilitatea și stabilitatea măsurătorilor efectuate cu acești 3 electrozi oferă o bună posibilitate de extindere a metodelor de analiză a amlodipinei besilat din preparate farmaceutice și din lichide biologice.

Interacțiunea amlodipinei besilat cu β -ciclodextrina în soluție apoasă a fost studiată prin metode spectrale (fluorescență, IR, X) și termice (DSC), pe probe sub formă de sisteme solide (amestec fizic, frământat, coprecipitat, liofilizat).

- Rezultatele experimentale obținute prin fluorescență au demonstrat că intensitatea maximului de emisie al amlodipinei besilat este considerabil modificată în prezența unor concentrații crescânde de β -ciclodextrină. Constanta de stabilitate K a complexului format a fost determinată utilizând ecuația Benesi-Hildebrand, valoarea constantei de asociație obținută la emisia maximă fiind de 210 M^{-1} .
- Au fost urmărite schimbările care apar în spectrul IR al sistemului amlodipină besilat/ β -ciclodextrină, obținut prin amestec fizic, frământare, coprecipitare și liofilizare în raport molar 1:1. Analiza spectrelor amlodipinei besilat și ale complexilor săi confirmă prezența amlodipinei besilat în complecși, prin regăsirea benzilor de absorbție corespunzătoare principalelor legături și funcții chimice. Spectrul FTIR (probe în pastile în KBr) al amestecului fizic conține benzile de absorbție ale fiecărui component în parte; în acest caz complexul de incluziune nu a fost obținut. Pentru complexul frământat, coprecipitat și liofilizat spectrele FTIR corespunzătoare au suferit modificări semnificative. Grupurile moleculare implicate în interacțiune s-au dovedit: **dihidropiridin-carboxilatul** din structura amlodipinei, care este inclusă în interiorul cavității ciclodextrinei și **gruparea OH primară** a torului ciclodextrinic.
- Difractogramele pentru sistemele asociate amlodipină besilat/ β -ciclodextrină obținute prin frământare, coprecipitare și liofilizare în raport molar 1:1 ale celor două componente prezintă mici modificări ale intensităților relative ale maximelor de difracție. Comparând spectrele de difracție a compușilor obținuți cu cel al amlodipinei și al β -ciclodextrinei, se poate observa că s-a format compusul de incluziune, în cazul compusului liofilizat, spectrul de difracție prezintă un halou caracteristic fazei amorfe, deci complexul de incluziune conține ambele faze, cristalină și amorfă.
- Interpretarea comportării termice prin analiza DSC a scos în evidență existența unei interacțiuni între amlodipină și β -ciclodextrină cu formarea unui complex de incluziune în raport molar 1:1.

- Structura complexului de asociație amlodipină besilat/ β -ciclodextrină sugerat de măsurătorile spectrofluorimetrice, IR, X și DSC a fost investigată prin modelare moleculară. Conform modelării moleculare MM+, molecula de amlodipină intră în cavitatea β -ciclodextrinei cu inelul piridinic, gruparea clorfenil se orientează spre marginea β -CD, restul moleculei rămânând în afară, fiind posibilă doar o includere parțială a moleculei oaspete.

Cea mai eficientă metodă de preparare a complexului de incluziune ADB: β -CD a fost prin liofilizare. Rezultatele obținute au arătat că acest tip de formulare al substanței prin complexarea cu β -ciclodextrina poate reprezenta un sistem mai eficient și mai avantajos de prezentare al substanței medicamentoase, determinând creșterea stabilității fizico-chimice, prin protecția față de agenții oxidanți și hidroliză, a biodisponibilității și reducerea efectelor secundare ale substanței medicamentoase.

Cercetările întreprinse în cadrul acestei teze, rezultatele obținute, pot constitui punctul de plecare pentru abordarea unor noi aspecte care să întregască aceste cercetări și să contribuie la atestarea practică a premizelor formulate de noi.

Bibliografie selectivă

1. Aumant Marice – Claude, Coverce I. , Forette F. – *Les inhibiteurs calciques dans le traitement de l'hypertension arterielle*, Edition Medicales, 1990: 125 – 128.
2. Michel Schorderet et colab. – *Pharmacologie – Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, Ediția a II – a, Geneva, 1992: 144 – 150, 167 – 184, 214 – 221.
3. Mureșan A., Palage M. - *Chimie terapeutică - Medicamente utilizate în afecțiuni cardiovasculare*, Editura Accent, Cluj - Napoca, 2000: 16-19.
4. xxx Farmacopeea Română, Ediția a - X - a, Editura Medicală, București, 1993, 695 - 696.
5. Martindale – The Extra Pharmacopoeia, Ed. 31, Ed. J.E.F. Reynolds, Royal Pharmaceutical Society, London, 1996: 916-924.
6. European Pharmacopoeia, 6th Edition, Council of Europe, Strassbourg, 2008, CD-ROM.
7. British Pharmacopoeia, 2008, CD-ROM.
8. Bojiță M., Roman L., Săndulescu R., Oprean R.- *Analiza și controlul medicamentelor*, vol. 1, *Bazele teoretice și practice*, Editura Intelcredo, Deva, 2002.
9. Roman L., Săndulescu R.- *Chimie analitică* ,vol. 3, *Metode de separare și analiză instrumentală*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1999.
10. Făgărășan E., Imre S.- *Chimie Fizică Experimentală*, Editura Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu“ Cluj-Napoca, 2005: 159-165.
11. S.P.Kouvanes - *Handbook of Instrumental Tehniques for Analytical Chemistry*, 1999, 709-725.
12. Klara Toth, Karel Stulik, W.Kutner, Y.Feher, E.Lindner- *Pure and Applied Chemistry*, 2004; 76 (6): 1119-1138.
13. A. B. Baranda, O. Berasaluce, R.M. Jimenez, R.M. Alonso- *LC-DAD Determination of calcium channel blockers by using an experimental design approach*, *Chromatographia*, 2005; 61: 447-453.

14. F.Bănică, M.Bojiță - *Controlul medicamentelor - Metode electrochimice și termice de analiză*, Editura Universității din Oradea, 2009: 72-82, 93-94.
15. Roman L., Săndulescu R.- *Chimie analitică – Analiza chimică cantitativă*, vol 2, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1999: 48-169.
16. Liviu Roman, Marius Bojiță, Robert Săndulescu, Daniela Lucia Muntean - *Validarea metodelor analitice*, Editura Medicală București, 2007.
17. **O.Bradea**, T. Horvath, G. Șerban, E. Curea - *Determinarea spectrofotometrică a amlodipinei din produse farmaceutice bazată pe reacția cu ninhidrina*, Revista de Medicină și Farmacie, 2004; 50: 204-206.
18. **Otilia Bradea**, Florin Bănică - *Dozarea amlodipinei besilat prin voltametrie puls diferențială*, Zilele farmaceutice orădene, Ediția a III-a, Noi provocări în practica farmaceutică, 2009: 201-204.
19. **Otilia Bradea**, Florin Bănică – *Differential pulse adsorbtion voltammetry for determination of amlodipine besylate at carbon paste electrode in pharmaceutical preparations*, Analele Universității Oradea: fascicula Chimie, vol. XVII, 2010: 18-23.
20. **Otilia Bradea**, Iren Kacso, Gh. Borodi, I.Bratu - *Inclusion compound of amlodipine besylate with β -cyclodextrin*, Central European Journal of Chemistry, în curs de publicare, 2011.

CURRICULUM VITAE

Nume, prenume: MUSCAȘ OTILIA-LAURA (căs. BRADEA)

Locul și data nașterii: Oradea, 29.01.1974

Stare civilă: căsătorită

E-mail: otilia_bradea@yahoo.com

Studii: - Liceul Teoretic „Mihai Eminescu“ Oradea, 1988-1992

- Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 1993-1998

- Rezidențiat, specializarea Farmacie Generală, 2000-2002,

- Masterat în pregătirea și perfecționarea personalului didactic, Universitatea din Oradea, 2007-2008

- Doctorand, forma fără frecvență, UMF „Iuliu Hațieganu“ , Cluj-Napoca, Facultatea de Farmacie, 01.11.2002- prezent

Limbi străine: - Engleză: nivel intermediar

- Franceză: nivel intermediar

Activitatea profesională:

- 1999-2000, Farmacist stagiar, Farmacia Marifarm, Oradea

- 2000-2001, Farmacist, Farmacia Calendula, Oradea

- 2001-2002, Farmacist, Farmacia Belladonna, Oradea

- 2002-2005, Farmacist diriginte, Farmacia Esculap, Oradea

- 2005- prezent, Farmacist, Farmacia Vitamina, Oradea

- 2000-2004, Asistent universitar prin concurs la Disciplina Chimie farmaceutică,

- Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie
- 2004-2009, Șef lucrări prin concurs la Disciplina Chimie farmaceutică,
Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie
- 2009-2010. Șef lucrări asociat, la Disciplina Chimie farmaceutică,
Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie

Cursuri postuniversitare:

- Actualități în practica farmaceutică, SSFR, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2001
- Cours de formation post-universitaire dans le domaine des sciences de la vie, L'Université francophone Cefor Paris, Facultatea de Medicină și Farmacie Oradea, 2002
- Farmacistul - furnizor de servicii de sănătate, UMF „Iuliu Hațieganu“, Cluj-Napoca, 2003
- Perspective în practica farmaceutică, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2005
- Tratatamentul hipertensiunii arteriale. Diuretice de actualitate, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2006
- Diuretice și β -blocante în tratamentul HTA și a insuficienței cardiace, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2007
- Boala de reflux gastro - esofagian și complicațiile ei; Actualități în managementul gripei și răcelii la copii; Vitaminele între mit și realitate, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2008
- Noi provocări în practica farmaceutică, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2009
- Pharma forum, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicină și Farmacie, 2010

Apartenența la societăți științifice sau profesionale de prestigiu:

- 1999 – Membru în Colegiul Farmaciștilor Bihor
- 2000 – Membru în Societatea de Științe Farmaceutice din România
- 2002 – Membru în Societatea de Chimie din România

Contracte de cercetare:

- „Influența tratamentului cu glucocorticoizi la pacienții cu dermatomicoze“, proiect încheiat între Universitatea Oradea și A&G MED TRADING, membru, Nr. contract 11/2008

Lucrări publicate în extenso în revistele din țară: (5 ca prim autor și 3 coautor)

1. **Otilia Bradea**, Florin Bănică – *Differential pulse adsorbtion voltammetry for determination of amlodipine besylate at carbon paste electrode in pharmaceutical preparations*, Analele Universității Oradea: fascicula Chimie, vol. XVII, 2010: 18-23.

2. **Otilia Bradea**, Florin Bănică - *Dozarea amlodipinei besilat prin voltametrie puls diferențială*, Zilele farmaceutice orădene, Ediția a III-a, Noi provocări în practica farmaceutică, 2009: 201-204.
3. **Otilia Bradea**, Manuela-Bianca Pașca, Daniela Gîtea, „Alternative în igiena intimă feminină“, Controverse actuale în obstetrică și ginecologie, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-776-2, Al VIII-lea Congres Româno-German de Obstetrică-Ginecologie, 14-16 mai 2009: 502-506.
4. Bianca Pașca, **Otilia Bradea**, Daniela Gîtea, Mihaela Zdrâncă,, *Automedicația cu antibiotice*“, *Educația omului de azi pentru lumea de mâine*, ediția a VI-a, coordonatori: prof.dr.Vasile Marcu, conf.dr. Mariana Marinescu, Editura Universității din Oradea, ISSN 1843-9985, 2009: 106-107.
5. Georgeta Șerban, Doina Matinca, **Otilia Bradea**, Lavinia Gherman, Mioara Coman, Elena Curea, „*Studiul activității biologice a unor cumarine heterociclice*“, Farmacia, 2005, 53 (2): 91-99.
6. Tunde Horvath, **Otilia Bradea**, Elena Curea „*Spectroscopie atomică de absorbție în analiza unor oligoelemente din produse vegetale*“, Perspective în practica farmaceutică, 2005, Editura Universității Oradea, ISBN 973-613-780-5, 2005: 79-82 .
7. **Otilia Bradea**, Georgeta Șerban, Stela Cuc, „*Reacții de transpoziție a unor compuși 1,3,4-oxadiazolici*“, Perspective în practica farmaceutică, 2005, Editura Universității Oradea, ISBN 973-613-780-5, 2005: 143-147.
8. **Otilia Bradea**, Tunde Horvath, Georgeta Șerban, Elena Curea - *Determinarea spectrofotometrică a amlodipinei din produse farmaceutice bazată pe reacția cu ninhidrina*, Revista de Medicină și Farmacie, Târgu-Mureș, 2004; 50: 204-206.

Lucrări publicate în extenso în revistele din străinătate: (1 ca prim autor)

1. **Otilia Bradea**, Iren Kacso, Gheorghe Borodi, Ioan Bratu - *Inclusion compound of amlodipine besylate with β -cyclodextrin*, Acta Chimica Slovenica, în curs de publicare, 2011.

Lucrări comunicate și publicate în reviste în rezumat:

1. **Otilia Bradea**. Florin Bănică - „*Determination of amlodipine besylate by differential pulse adsorption voltammetry with carbon paste electrode in pharmaceutical preparations*“, Congresul Național de Farmacie, Ediția a XIV-a, Târgu-Mureș, 13-16 octombrie 2010, - *Acta medica marisiensis* - vol. 56, supl. 2/2010, 29 pp.
2. Florin Bănică, Simona Cavalu, Eleonora Marian, Jurca Tunde, Laura Vicaș, **Otilia Bradea** - „*Adsorptive stripping voltammetric determination of tetracycline hydrochloride in pharmaceutical preparation*“, Congresul Național de Farmacie, Ediția a XIV-a, Târgu-Mureș, 13-16 octombrie 2010, - *Acta medica marisiensis* - vol. 56, supl. 2/2010, 33 pp.
3. **Otilia Bradea**, Elena Curea, Tunde Horvath - „*Spectrophotometric method for determination of amlodipine besylate based on Fe(III) ions reduction*“

- properties*“, Congresul Național de Farmacie, Ediția a XIII-a, Cluj-Napoca, 28-30 sept. 2006, 98 pp.
4. Horvath Tunde, Curea Elena, **Bradea Otilia** - „Spectrophotometry of atomic absorption in the analysis of some oligoelements on airy parts of *Aesculus hippocastanum*“, Congresul Național de Farmacie, Ediția a XIII-a, Cluj-Napoca, 28-30 sept. 2006, 111 pp.
 5. Lavinia Gherman, **Otilia Bradea**, Georgeta Șerban, Elena Curea - „*Metode analitice în studii de stabilitate și compatibilitate a diclofenacului în dispersii moleculare*“, Congresul Național de Farmacie, Ediția a XII-a, București, 2002, ISBN -973-85885-2-9, 297 pp.
 6. G. Șerban, M. Coman, **O. Bradea**, L. Gherman - „*New heterocyclic coumarins antimicrobial and mitodepressive activity*“, Drug analysis 2002 symposium, Bruges, Belgium, pp.115, 21-25 april, 2002.
 7. Georgeta Șerban, Elena Curea, **Otilia Bradea**, Lavinia Gherman - „Studiul activității biologice a unor cumarine heterociclice“, Sesiunea de Comunicări Științifice a Facultății de Medicină și Farmacie din Oradea, 2001.
 8. **Otilia Bradea**, Georgeta Șerban, Stela Cuc. Lidia Proinov - „Studiul obținerii și comportării unor compuși 1,3,4-oxadiazolici“, Sesiunea de Comunicări Științifice a Facultății de Medicină și Farmacie din Oradea, 2000.

Cărți publicate:

1. **Otilia Bradea**, Bianca Pașca, „*Recepția calitativă a substanțelor farmaceutice*“, *Îndrumător de practică în farmacie pentru studenții anului V*, coordonator prof.dr. farm. Laura Vicaș, suport CD, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-735-9, pp 17-20, 2009.

**„IULIU HAȚIEGANU“ UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY, CLUJ-NAPOCA
FACULTY OF PHARMACY**

**ANALYTICAL AND PHYSICO – CHEMICAL STUDIES IN THE
CLASS OF SELECTIVE INHIBITORS OF CALCIUM CHANNELS
(DIHYDROPYRIDINE DERIVATIVES)**

- Doctoral thesis abstract-

**PhD Student:
Bradea Otilia Laura**

**Scientific Coordinator:
Prof. Dr. Elena Curea**

CONTENT

INTRODUCTION.....	1
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE.....	3
Chapter I.....	3
CALCIUM CHANNEL ANTAGONISTS ANTIHYPERTENSIVES. GENERALITIES OF DIHYDROPYRIDINE DERIVATIVES.....	3
I.1.Short history	3
I.2. Clasification of calcium blockers.....	4
I.3. Chemical structure of 1,4-dihydropyridines.....	5
I.4. Physicochemical characterization of 1,4-dihydropyridines.....	9
I.5. Synthesis of 1,4-dihydropyridine-derivatives.....	10
I.6. Biological properties of dihydropyridines.....	12
6.1. Relation chemical structure-biological activity.....	12
6.2. Pharmacokinetic properties.....	15
I.7. Therapeutic activity and pharmaceutical formulations.....	16
7.1. Side effects. Contraindications.....	18
7.2.Pharmaceutical formulations in Romania.....	20
I.8. Conclusions.....	21
Chapter II.....	23
INSTRUMENTAL ANALYTICAL METHODS OF PHYSICO-CHEMICALS STUDIES FOR IDENTITY, PURITY, STABILITY, COMPATIBILITY AND QUANTIFYING OF 1,4-DIHYDROPYRIDINES.....	23
II.1. Analytical methods based on spectral properties of 1,4-dihydropyridines.....	23
1.1. UV-VIS spectrophotometric method.....	23
1.2. IR spectrometric method.....	27
II.2. Analytical methods based on chromatography of 1,4-dihydropyridines.....	29
2.1. Thin layer chromatography (TLC).....	29
2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	30
II.3. Analytical methods based on redox properties of 1,4-dihydropyridines.....	32
3.1. Voltammetry with scanning linearly and cyclic voltammetry.....	33
3.2. Pulse Voltammetry methods.....	35
II.4. Analytical methods of stability studies of 1,4-dihydropyridines.....	37
4.1. Mechanism of degradation of 1,4-dihydropyridines.....	37
4.2. Photodegradation monitoring of 1,4-dihydropyridines by derivative spectrophotometry.....	39
II.5. Analytical methods of identification impurities of Amlodipine tablets.....	40
II.6. Analytical methods in study of inclusion compounds of cyclodextrins with drugs..	43
6.1. Importance of inclusion phenomena in practices.....	43
6.2. Research methods of inclusion compounds of amlodipine with cyclodextrins...	45
6.3. Validation of the analytical methods.....	47
II.7. Conclusions.....	49
PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	50
Chapter III.....	50
UV-VIS-IR SPECTRAL STUDY OF AMLODIPINE BESYLATE.....	50

III.1. General facts.....	50
III.2. UV spectra identity of amlodipine.....	51
2.1. Validation of the method of identification amlodipine besylate in tablets by UV-VIS spectrophotometry.....	53
III.3. Validation of the method of quantitative determination of amlodipine besylate and determination of uniformity of content by UV spectrophotometry.....	56
3.1. Validation of the method of dissolution amlodipine besylate in tablets by spectrophotometry.....	70
III.4. Visible spectrophotometric method for determination of amlodipine besylate in tablets.....	75
III.5. IR spectra – identity of amlodipine besylate.....	78
III.6. Conclusions of spectral study.....	81
Chapter IV.....	83
CHROMATOGRAPHIC STUDY (CSS, HPLC) OF AMLODIPINE BESYLATE	
IV.1. Analysis by thin layer chromatography (TLC) of amlodipine besylate.....	83
1.1. Identifying of amlodipine besylate by thin layer chromatography.....	85
1.2. Determination of amlodipine impurities by thin layer chromatography.....	87
IV.2. Determination of amlodipine impurities by High Performance Liquid Chromatography.....	89
IV.3. Conclusions of chromatographic study.....	93
Chapter V.....	95
ELECTROANALYTICAL STUDIES BASED OF REDOX PROPERTIES OF AMLODIPINE BESYLATE.....	95
V.1. Materials and method.....	95
V.2. Determination of amlodipine besylate by differential pulse voltammetry on glassy carbon electrode.....	97
V.3. Validation of the method of determination of amlodipine besylate by differential pulse voltammetry on carbon paste electrode in tablets.....	100
V.4. Validation of the method of determination of amlodipine besylate by differential pulse voltammetry on modified carbon paste electrode in tablets.....	109
V.5. Conclusions of electroanalytical study.....	116
Chapter VI.....	118
ANALYTICAL AND PHYSICO-CHEMICAL STUDIES REGARDING INCLUSION OF AMLODIPINE BESYLATE WITH β-CYCLODEXTRIN.....	118
VI.1. Cyclodextrins: structure, properties, capacity of interaction with drugs.....	118
1.1. Structure, physico-chemical and toxicological characterization.....	119
1.2. Structural conditions of inclusion complex with drugs.....	123
VI.2. Methods of obtaining of inclusion complexes of amlodipine besylate with β -cyclodextrin.....	125
VI.3. Analysis and characterization of inclusion complex Amlodipine - β -CD.....	127
3.1. Spectrofluorimetry.....	127
3.2. FTIR spectroscopy.....	131
3.3. X-ray diffraction.....	139
3.4. DSC thermal analysis.....	140
3.5. Molecular modelling of inclusion compound of amlodipine besylate with β -CD.....	142

3.6. Conclusions regarding of inclusion compound of amlodipine besylate with β -CD	143
GENERAL CONCLUSIONS.....	145
BIBLIOGRAPHY.....	152

Keywords: amlodipine, identification, dosage, dissolution, validation, voltammetry, inclusion compounds.

CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

In the antagonists class of calcium channel, the derivatives 1,4- dihydropyridine occupy an important place in treating cardiovascular diseases. This class includes representatives with a chemical structure susceptible to changes under the influence of environmental factors, association with other auxiliary substances or technological factors, which requires the establishment of analytical methods to highlight these changes.

New compounds were prepared and introduced in therapy, in order to stop the evolution and to prevent or reduce symptoms of heart disease. Such a dihydropyridine derivative is **amlodipine**, a selective calcium channel blocker, an asymmetric ester, being a mixture of two enantiomers, a lipophilic molecule that is not ionized at physiological pH and can diffuse across membranes.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Quality and purity control of drug substances in pharmaceutical preparations is achieved by selective use of specific methods, which prove the purity, identity and quantity of active ingredient per dose. We intend to develop methods of spectral, chromatographic and voltammetric separation of **amlodipine besylate** and identification of existing pharmaceutical drugs on the Romanian market, as well as the combination of amlodipine besylate and analysis of β -cyclodextrin inclusion complexes resulted.

UV-VIS-IR spectrophotometry is based on spectral absorption properties of amlodipine besylate in the 200-400 nm wavelength (UV) and 500-3600 cm^{-1} (IR) and after a chemical transformation in the 400-700 nm (VIS). Maximum absorption in aqueous solution of amlodipine besylate (0,01 to 0,09 mM) is situated at 239 and 366nm. Developing methods to identify specific UV amlodipine besylate, in determining content uniformity of amlodipine besylate in Tardip tablets (amlodipine besylate 5 mg / tablet) and the dissolution of the active principle from the tablets was possible after a preliminary study of optimal experimental conditions for the cases mentioned. The absorption of amlodipine besylate after extracting it from tablets of hydrochloric acid solution in methanol 0,01 mol / l, is situated at a wavelength of $\lambda = 360 \pm 2nm$ at which the mass of the excipients do not interfere.

Validation of the UV spectrophotometric method was done respecting the official protocol. Thus, were used: analyzed samples with reconstituted dosage form samples,

amlodipine besylate standard solutions and placebo samples. The results of absorption spectra for standard solution and solution containing reconstituted dosage form the basis for the linearity study results.

- regression and correlation coefficients (r_{xy}) were calculated and **linearity method** was certified
- **the accuracy** of the method can be assessed on the basis of a series of measurements in which are recorded the results that fit the eligibility criteria (confidence interval of the average over the safety threshold $a_{95\%}$ is within the range 98-102%, RSD = 1.2%)
- **the precision** of the method was validated for each set of determinations by RSD values (0,469 and 1, 969), the statistic test $Q_{90\%}$ (<0,56), $t_{95\%}=2,23\%$
- the dosage and determining method of the uniformity of content is **specified** in relation to excipients

Validation of the dissolution of amlodipine besylate tablets in the environment of hydrochloric acid 0,01 mol/l in methanol at 37⁰ C was achieved by reconsideration of absorption spectra of standard solutions and Tardip samples (5mg amlodipine besylate / tablet).

The measurements were made at a wavelength of $360 \pm 2nm$ at which the placebo solution shows insignificant absorption - so the method is specific for the dissolution of amlodipine besylate tablets.

Visible spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate itself and from Norvasc tablets (amlodipine besylate 10 mg / tablet) after dissolving in DMF besylate amlodipine was set up after a physical and chemical survey of the reaction of amlodipine besylate with nihidrina 0,06 M in the same environment. The product blue coloration obtained at heat resulted by chemical reaction shows a maximal absorption of $\lambda = 590nm$. The method is simple, fast and selective.

In order to verify the identity and purity of raw materials it was appealed to the IR spectrum. It was identified the absorption bands corresponding to the elements of the structure of amlodipine besylate detectable in IR. IR spectrum of the sample was confronted with the specter of reference mentioned in the Pharmacopoeia [8].

In achieving IR spectral identification of **amlodipine besylate** in the experimental conditions of our own laboratories, we had the **perspective** that **this interpretation** opens **the determination of amlodipine besylate phenomenon and β cyclodextrin inclusion**.

The purity of drug substances is a parameter quality that should be taken into account even in the case of their conditioning in tablets.

Thin layer chromatography (Silica gel GF₂₅₄), the migration of plates to a distance of 15 cm in saturated vapor of development vats (Glacial acetic acid: water, methyl isobutyl ketone), heating (80⁰ C, 15 min) and examination in the ultraviolet light (254, 366 nm) reveal two impurities at R_f 0,18 and 0,22 outside the main spot due to amlodipine (R_f = 0,66).

The specificity of thin layer chromatography is proven in the given conditions, compared with a standard solution and a placebo solution (containing the mixture of excipients

without active ingredient). Main spot ($R_f = 0,66$) corresponding to amlodipine besylate is found at the right of the standard solution and is missing in the placebo.

The determination of related impurities and chemical detection limit through CSS method was performed using solutions obtained by successive dilution of standard solution of amlodipine besylate with methanol. The concentration of 0,04% (based on concentration of sample solution) is the detection limit.

HPLC method with high specificity and an optimal detection limit was applied to samples after extracting the active principle in the mobile phase (acetonitrile: methanol: triethylamine) and injecting the solution on a Zorbax Extend C 18 column of an Agilent chromatograf liquid.

The performance report for the chromatogram reference solution presents a value of peaks resolution corresponding to impurity D and that of amlodipine equal to 8,84. The relative retention time of impurity D is approximately 0,5.

The detection limit is experimental determined by setting the amlodipine concentration where the signal / noise proportion is 3. An amlodipine solution for a concentration of 0,6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ calculation of signal to noise ratio was achieved with Chem Station Rev data processing software..A.08.03-A.08.04. Agilent Technologies and has the value 6.2, and the detection limit is 0,29 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Electroanalytical methods have become competitive with other methods of analysis, having the advantages of a very high sensitivity of concentration (10^{-12} - 10^{-1} mol/l), using a large number of solvents and electrolysis, short analysis time.

Differential pulse voltammetry on a glassy carbon electrode based on electrode surface dihydropyridine oxidation, using as electrolyte Britton-Robinson buffer (pH = 2) was used in the determination of amlodipine besylate from Norvasc tablets (amlodipine besylate 10 mg / tablet). The detection limit was calculated by graphical method as 7,02 mM, and the limit of quantification 21,06 mM.

Finding average dosage of the active principle (amlodipine besylate) from Norvasc tablets 10 mg is 98,67% and standard deviation is 3,88%.

Validation method for determining the amlodipine besylate and the tablets (Norvasc-amlodipine besylate 10 mg / tablet, Tardip- 10 mg amlodipine bensilat / tablet) was achieved by further differential voltammetry of carbon paste electrode.

- **Linearity** of the analytical results was evaluated by calculating the regression line equation and correlation coefficient. Measurements were repeated three times on the same set of solutions and the potential values were recorded under statistical processing by the method of least squares, obtaining the regression line equation $Y = 5E + 0,6 \times 3,9868$ and the coefficient correlation equal to 0,9898.
- **Accuracy** assessment is done by calculating the percentage of retrieval (the amount of known substance added to the sample). Finding average is 91,43% and relative standard deviation (RSD) in this case is 1,14%.
- **Repeatability** was determined by dosing three test solutions of amlodipine besylate $5,50 \times 10^{-8}\text{M}$ on the same day. There have been three measurements, it was calculated standard deviation (SD = 1,03%) and relative standard deviation (RSD = 1,08%).
- **Reproducibility** was determined by analysis of three sample solutions of amlodipine besylate $5,50 \times 10^{-8}\text{M}$ in three consecutive days. It was calculated the standard deviation (SD = 1,66%) and relative standard deviation (RSD = 1,77%).

- The graphical method set the minimum detectable concentration as $8,84 \times 10^{-8} \text{M}$, and the limit of quantification $26,52 \times 10^{-8} \text{M}$.
- The **average dosage** of amlodipine besylate Norvasc 10 mg tablets was 117,91% and 63,32% for Tardip 10mg tablets.

Carbon paste electrodes can be chemically modified in an advantageous way in order to improve their selectivity and sensitivity, causing chemical reactions to allow exhibition of the electrode surface or ensure the transfer of electrons.

Modified carbon paste electrode was used for the quantitative determination of amlodipine besylate in pharmaceutical formulations (Norvasc 10 mg tablets, Tardip 10 mg tablets) by further differential voltammetry. The method has been validated, with an average dosing recovery of amlodipine besylate from Norvasc tablets 10 mg of 88,47%, and 10 mg Tardip tablets 61,58%.

Reproducibility and stability measurements made with these three electrodes provide a good opportunity of extending the methods of analysis of amlodipine besylate in pharmaceutical preparations and in biological fluids.

Amlodipine besylate interaction with β cyclodextrin in aqueous solution was studied by spectral methods (fluorescence, IR, X) and thermal (DSC) on samples in the form of solid systems (physical mixture, kneading, coprecipitat, freeze-drying).

- The experimental results obtained showed that the maximum intensity of fluorescence emission of amlodipine besylate is considerably modified in the presence of increasing concentrations of β cyclodextrin. Stability constant K of the complex formed was determined using Benes-Hildebrand equation, the association constant value is obtained from the maximum emission of 210M^{-1} .
- There have been tracked the changes that occurred in the IR spectrum of the amlodipine besylate / β cyclodextrin system, obtained by physical mixture, kneading, coprecipitation and freeze-drying in a molar ratio of 1:1. The analysis of amlodipine besylate and of complex spectra confirms the presence of amlodipine besylate in the complex by finding the absorption bands corresponding to the key finding connections and chemical functions. FTIR spectra (samples in KBr pellets) of the physical mixture contains absorption bands of each component separately, in this case the inclusion complex was not obtained. For the kneaded, freeze-dried and coprecipitated the FTIR spectra corresponding underwent significant changes. Molecular groups involved in interaction proved: **dihydropyridine-carboxylate** of amlodipine structure, which is included inside the cyclodextrin cavity and the **primary OH group** cyclodextrin torus.
- The associated diffractograms for amlodipine besylate / β cyclodextrin associate systems obtained by kneading, coprecipitated and freeze-drying in 1:1 molar ratio of the two components shows small changes in the relative intensities of diffraction peaks. Comparing the diffraction spectra obtained with the compounds of amlodipine and β cyclodextrin can be seen that the inclusion compound formed, in the case of freeze-dried compound, the diffraction spectrum shows a typical halo of amorphous phase, so the inclusion complex contains both phases, crystalline and amorphous.

- Interpretation of the thermal behavior by DSC analysis revealed an interaction between amlodipine and β cyclodextrin forming an inclusion complex in 1:1 molar ratio.
- The complex association structure of amlodipine besylate / β cyclodextrin suggested by spectrofluorimetric measurements, IR, DSC and X was investigated by molecular modeling. According to MM + molecular modeling, the amlodipine molecule enters the β cyclodextrin cavity with the pyridine ring, the chlorophenyl group is focused on the β -CD side, the rest of the molecule remains outside, only partial inclusion of the guest molecule is possible.

The most effective method of ADB: β - CD inclusion complex preparation was by lyophilization. The results showed that this form of substance by complexation with β cyclodextrin can represent a more efficient and convenient system of presentation of the medicinal substance, causing the increase of physical and chemical stability by protection against oxidizing agents and hydrolysis, bioavailability and reduction of side effects of drug substance.

The research undertaken within this thesis, the results obtained, can be the starting point for addressing new issues that will complete this research and contribute to the certification practice of the premises made by us.

CURRICULUM VITAE

Name: MUSCAȘ OTILIA-LAURA (married BRADEA)

Date and place of birth: January 29 th 1974, Oradea

Marital status: married

E-mail: otilia_bradea@yahoo.com

Education and training sessions:

- „Mihai Eminescu“ High school Oradea, 1988-1992
- University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 1993-1998
- Pharmacist specialist, field: General Pharmacy- confirmed by Decree no 256/2002 issued by the Ministry of Health
- Master studies in Teaching Staff Professional Training, University of Oradea, 2007-2008
- Ph D student, distant learning education, „Iuliu Hațieganu“ University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy, 11.2002- present day.

Foreign languages:

- English: intermediate level
- French: intermediate level

Professional career:

- 1999-2000, Pharmacist intern, SC. Marifarm, Oradea
- 2000-2001, Pharmacist, SC. Calendula, Oradea
- 2001-2002, Pharmacist, SC. Belladonna SRL, Oradea
- 2002-2005, Pharmacist diriginte, SC. Esculap SRL, Oradea
- 2005- prezent, Pharmacist, SC. Vitamina SRL, Oradea
- 2000-2004, Junior Teaching Assistant, Chair of Pharmaceutical Chemistry, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy
- 2004-2009, Lecturer, Chair of Pharmaceutical Chemistry, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy
- 2009-2010, Asociated Lecturer, Chair of Pharmaceutical Chemistry, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy

Postgraduate courses:

- Actualities in Pharmaceutical Practice, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2001
- Cours de formation post-universitaire dans le domaine des sciences de la vie, L'Universite francophone Cefor Paris, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2002
- Farmacistul - furnizor de servicii de sănătate, „Iuliu Hațieganu“ University of Medicine and Pharmacy, Cluj- Napoca, 2003
- Perspectives in Pharmaceutical Practice, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2005
- High blood pressure treatment. Present-day, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2006
- Diuretice și β -blocante în tratamentul HTA și a insuficienței cardiace, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2007
- Farmacotherapy in GERD and peptic ulcer, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2008
- Noi provocări în practica farmaceutică, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2009
- Pharma forum, University of Oradea, Faculty of Medicine and Pharmacy, 2010

Membership in prestigious professional and scientific associations:

- 1999 – Member of Bihor College of Pharmacists
- 2000 – Member of the Romanian Society of Chemistry
- 2002 – Member of the Romanian Society of Pharmaceutical Sciences

Research contracts:

- „Influența tratamentului cu glucocorticoizi la pacienții cu dermatomicoze“, member, Contract no. 11/2008

Scientific papers published in extenso in national magazines: (5 as first author and 3 as co-author):

1. **Otilia Bradea**, Florin Bănică – *Differential pulse adsorbtion voltammetry for determination of amlodipine besylate at carbon paste electrode in pharmaceutical preparations*, Analele Universității Oradea: fascicula Chimie, vol. XVII, 2010: 18-23.
2. **Otilia Bradea**, Florin Bănică - *Dozarea amlodipinei besilat prin voltametrie puls diferențială*, Zilele farmaceutice orădene, Ediția a III-a, Noi provocări în practica farmaceutică, 2009: 201-204.
3. **Otilia Bradea**, Manuela-Bianca Pașca, Daniela Gîtea, „Alternative în igiena intimă feminină“, Controverse actuale în obstetrică și ginecologie, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-776-2, Al VIII-lea Congres Româno-German de Obstetrică-Ginecologie, 14-16 mai 2009: 502-506.
4. Bianca Pașca, **Otilia Bradea**, Daniela Gîtea, Mihaela Zdrâncă,, *Automedicația cu antibiotice*“, *Educația omului de azi pentru lumea de mâine*, ediția a VI-a, coordonatori: prof.dr.Vasile Marcu, conf.dr. Mariana Marinescu, Editura Universității din Oradea, ISSN 1843-9985, 2009:106-107.
5. Georgeta Șerban, Doina Matinca, **Otilia Bradea**, Lavinia Gherman, Mioara Coman, Elena Curea, „*Studiul activității biologice a unor cumarine heterociclice*“, Farmacia, 2005, 53 (2): 91-99.
6. Tunde Horvath, **Otilia Bradea**, Elena Curea „*Spectroscopie atomică de absorbție în analiza unor oligoelemente din produse vegetale*“, Perspective în practica farmaceutică, 2005, Editura Universității Oradea, ISBN 973-613-780-5, 2005: 79-82.
7. **Otilia Bradea**, Georgeta Șerban, Stela Cuc, „*Reacții de transpoziție a unor compuși 1,3,4-oxadiazolici*“, Perspective în practica farmaceutică, 2005, Editura Universității Oradea, ISBN 973-613-780-5, 2005: 143-147.
8. **Otilia Bradea**, Tunde Horvath, Georgeta Șerban, Elena Curea - *Determinarea spectrofotometrică a amlodipinei din produse farmaceutice bazată pe reacția cu ninhidrina*, Revista de Medicină și Farmacie, Târgu-Mureș, 2004; 50: 204-206.

Scientific papers published in extenso in international magazines : (1 as first author)

1. **Otilia Bradea**, Iren Kacso, Gheorghe Borodi, Ioan Bratu - *Inclusion compound of amlodipine besylate with β -cyclodextrin*, Acta Chimica Slovenica, în curs de publicare, 2011.

Scientific papers submitted and published in abstract in magazines:

1. **Otilia Bradea**. Florin Bănică - „*Determination of amlodipine besylate by differential pulse adsorption voltammetry with carbon paste electrode in pharmaceutical preparations*“, The 14th National Congress of Pharmacy, Târgu-Mureș, 13-16 oct. 2010, - *Acta medica marisiensis* - vol. 56, supl. 2/2010, 29 pp.
2. Florin Bănică, Simona Cavalu, Eleonora Marian, Jurca Tunde, Laura Vicaș, **Otilia Bradea** - „*Adsorptive stripping voltammetric determination of tetracycline*

- hydrochloride in pharmaceutical preparation*“, The 14th National Congress of Pharmacy, Târgu-Mureș, 13-16 oct. 2010, - *Acta medica marisiensis* - vol. 56, supl. 2/2010, 33 pp.
3. **Otilia Bradea**, Elena Curea, Tunde Horvath - „*Spectrophotometric method for determination of amlodipine besylate based on Fe(III) ions reduction properties*“, The 13th National Congress of Pharmacy, Cluj-Napoca, 28-30 sept. 2006, 98 pp.
 4. Horvath Tunde, Curea Elena, **Bradea Otilia** - „Spectrophotometry of atomic absorption in the analysis of some oligoelements on airy parts of *Aesculus hippocastanum*“, The 13th National Congress of Pharmacy, Cluj-Napoca, 28-30 sept. 2006, 111 pp.
 5. Lavinia Gherman, **Otilia Bradea**, Georgeta Șerban, Elena Curea - „*Metode analitice în studii de stabilitate și compatibilitate a diclofenacului în dispersii moleculare*“, The 12th National Congress of Pharmacy, Bucharest, 28-30 sept. 2002, ISBN -973-85885-2-9, 297 pp.
 6. G. Șerban, M. Coman, **O. Bradea**, L. Gherman - „*New heterocyclic coumarins antimicrobial and mitodepressive activity*“, Drug analysis 2002 symposium, Bruges, Belgium, pp.115, 21-25 april, 2002.
 7. Georgeta Șerban, Elena Curea, **Otilia Bradea**, Lavinia Gherman - „*Studiul activității biologice a unor cumarine heterociclice*“, Scientific Communications Session Faculty of Medicine and Pharmacy of Oradea, 2001.
 8. **Otilia Bradea**, Georgeta Șerban, Stela Cuc. Lidia Proinov - „*Studiul obținerii și comportării unor compuși 1,3,4-oxadiazolici*“, Scientific Communications Session Faculty of Medicine and Pharmacy of Oradea, 2000.

Published books:

1. **Otilia Bradea**, Bianca Pașca, „*Recepția calitativă a substanțelor farmaceutice*“, *Îndrumător de practică în farmacie pentru studenții anului V*, coordonator prof.dr. farm. Laura Vicaș, suport CD, Editura Universității din Oradea, ISBN 978-973-759-735-9, pp 17-20, 2009.