

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU”

CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FARMACIE



LAURA SBÂRCEA

**STUDII ANALITICE ȘI DE STABILITATE ALE UNOR
INHIBITORI AI ENZIMEI DE CONVERSIE A
ANGIOTENSINEI**

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

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

2011

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
I. SISTEMUL RENINĂ-ANGIOTENSINĂ-ALDOSTERON	3
I.1. Componentele sistemului renină-angiotensină-aldosteron.....	3
I.2. Rolul sistemului renină-angiotensină în bolile cardiovasculare.....	5
I.3. Agenți farmacoterapici care acționează asupra sistemului renină-angiotensină	6
II. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA INHIBITORILOR ENZIMEI DE CONVERSIE A ANGIOTENSINEI (IECA)	7
II.1. Descoperirea și dezvoltarea IECA	7
II.2. Relații structură chimică – activitate biologică în seria IECA.....	9
II.3. Structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale unor IECA: lisinopril, fosinopril, zofenopril.....	12
II.4. Proprietăți farmacologice ale lisinoprilului, fosinoprilului și zofenoprilului	15
III. METODE ANALITICE UTILIZATE ÎN STUDIUL UNOR IECA	20
III.1. Metode spectrale	20
1.1. Spectrofotometria UV-VIS	20
1.1.1. Spectrofotometria UV-VIS în studiul lisinoprilului	21
1.1.2. Spectrofotometria UV-VIS în studiul fosinoprilului	23
1.1.3. Spectrofotometria UV-VIS în studiul zofenoprilului	25
1.2. Spectrofotometria IR	26
III.2. Metode cromatografice.....	29
2.1. Cromatografia de lichide de înaltă performanță	30
2.1.1. Aplicații HPLC în studiul lisinoprilului	30
2.1.2. Aplicații HPLC în studiul fosinoprilului	32
2.1.3. Aplicații HPLC în studiul zofenoprilului	35
III.3. Metode analitice utilizate în studiul complexilor de incluziune ai IECA cu ciclodextrinele.....	37
III.4. Metode analitice în studii de stabilitate	39
4.1. Mecanisme de degradare a unor inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei: lisinopril, fosinopril	39
4.2. Interacțiuni ale lisinoprilului și fosinoprilului cu substanțe medicamentoase și auxiliare	42
4.3. Legile cineticii de degradare.....	46
III.5. Validarea metodelor analitice	48
CONTRIBUȚII PERSONALE	
IV. ANALIZA PRIN METODE SPECTRALE A UNOR IECA	51
IV.1. Determinarea spectrofotometrică în VIS a lisinoprilului prin derivatizare cu ninhidrină.....	51
1.1. Principiul metodei.....	51
1.2. Descrierea metodei	52

1.3. Rezultate și discuții.....	53
1.3.1. Optimizarea condițiilor de reacție	53
1.3.2. Validarea metodei	55
1.4. Aplicații analitice.....	59
1.5. Compararea metodei elaborate cu alte metode spectrofotometrice pentru determinarea lisinoprilului din literatură	60
1.6. Concluzii.....	62
IV.2. Determinarea spectrofotometrică în VIS a lisinoprilului prin complexare cu sulfat de cupru	62
2.1. Principiul metodei.....	62
2.2. Descrierea metodei	63
2.3. Rezultate și discuții.....	63
2.3.1. Concentrația optimă a sulfatului de cupru	64
2.3.2. Evaluarea numărului de produși de reacție obținuți	64
2.3.3. Validarea metodei.....	65
2.4. Aplicații analitice.....	69
2.5. Compararea rezultatelor obținute prin metoda spectrofotometrică cu ninhidrină și cea cu sulfat de cupru la dozarea lisinoprilului din comprimate comerciale	70
2.6. Concluzii.....	71
IV.3. Determinarea spectrofotometrică în UV a zofenoprilului	71
3.1. Principiul metodei.....	71
3.2. Descrierea metodei	72
3.3. Rezultate și discuții.....	72
3.3.1. Validarea metodei.....	73
3.4. Aplicații analitice.....	77
IV.4. Spectrul IR- criteriu de identitate	79
4.1. Prelucrarea probelor.....	79
4.2. Spectrul IR al lisinoprilului	79
4.3. Spectrul IR al fosinoprilului	81
4.4. Spectrul IR al zofenoprilului	82
IV.5. Concluziile studiilor spectrofotometrice	83

V. ANALIZA FOSINOPRILULUI PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ

V.1. Ipoteza de lucru.....	85
V.2. Material și metodă	85
V.3. Rezultate și discuții.....	86
3.1. Optimizarea condițiilor cromatografice.....	88
3.2. Validarea metodei.....	88
V.4. Aplicații analitice	94
4.1. Aplicarea metodei pe comprimate	94
4.2. Studiul acurateții și selectivității metodei pe forma farmaceutică.....	95
V.5. Concluzii.....	95

VI. STUDIUL INTERACȚIUNII UNOR IECA CU CICLODEXTRINE.....

VI.1. Ciclodextrine (CD) - structură, proprietăți, utilizări.....	97
1.1. Scurt istoric.....	97
1.2. Structura, proprietățile fizico-chimice și toxicologice ale ciclodextrinelor.....	97

1.3. Condiții structurale de formare a complexșilor de incluziune	100
1.4. Utilizările ciclodextrinelor	101
VI.2. Metode de obținere a complexșilor de incluziune	102
2.1. Metode generale de obținere.....	102
2.2. Obținerea complexșilor de incluziune IECA/ciclodextrine	104
VI.3. Metode de analiză a compușilor supramoleculari IECA/ciclodextrine	104
3.1. Cromatografia pe strat subțire	104
3.2. Metode termice de analiză	111
3.3. Analiza prin difracție de raze X.....	120
3.4. Analiza spectrală FTIR	126
3.5. Metoda solubilității de fază	134
3.6. Concluzii privind analiza complexșilor de incluziune.....	139
VII. STUDII DE STABILITATE	141
VII.1. Studiul stabilității fosinoprilului în condiții de testare accelerată	141
1.1. Ipoteza de lucru.....	141
1.2. Material și metodă	141
1.3. Rezultate și discuții.....	142
VII.2. Studiul stabilității fosinoprilului sub influența ambalajului primar	146
2.1. Ipoteza de lucru.....	146
2.2. Material și metodă	146
2.3. Rezultate și discuții.....	146
VII.3. Studiul stabilității sistemelor binare IECA/ciclodextrine în prezența excipienților....	148
3.1. Evaluarea comparativă a stabilității lisinoprilului și a complexului de incluziune lisinopril/ β -ciclodextrină în prezența lactozei	148
3.2. Studiul stabilității sistemului binar fosinopril/hidroxipropil- β -ciclodextrină în prezența excipienților.....	153
VII.4. Concluziile studiilor de stabilitate.....	167
CONCLUZII GENERALE.....	169
BIBLIOGRAFIE	176

Cuvinte cheie: lisinopril, fosinopril, zofenopril, dozare, validare, complexși de incluziune cu ciclodextrine, studii cinetice în condiții neizoterme.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (ECA) reprezintă, fără dubiu, o piatră de hotar în terapia patologiei cardiovasculare. Acești compuși acționează asupra sistemului renină-angiotensină-aldosteron, element cu rol-cheie în reglarea presiunii arteriale și în homeostazia hidroelectrolitică [1].

Inhibitorii ECA s-au dezvoltat ca substanțe medicamentoase antihipertensive, însă, în prezent, și-au dovedit eficacitatea și în alte afecțiuni precum: insuficiența cardiacă congestivă, infarctul miocardic, boala vasculară aterosclerotică, nefropatia diabetică [1,2].

Prima parte a lucrării cuprinde trei capitole. În *primul capitol* se realizează o prezentare succintă a sistemului renină-angiotensină-aldosteron, a rolului acestuia în patologia cardiovasculară

și se menționează clasele de substanțe medicamentoase care acționează la acest nivel.

Studiul bibliografic, prezentat în următoarele două capitole ale lucrării, *capitolul II și III* s-a realizat asupra a trei substanțe reprezentative din această clasă: lisinopril (LIS), fosinopril (FOS) și zofenopril (ZOF), prezentând în structura lor, ca și grupări farmacofore care realizează legături cu Zn^{2+} din structura ECA, restul carboxil, fosfinic și sulfhidril. Studiul reprezintă o sinteză a datelor din literatură referitoare la caracteristicile fizico-chimice, profilul farmacologic, proprietățile analitice, factorii care influențează stabilitatea acestor substanțe, precum și metodele utilizate în evaluarea stabilității și compatibilității lor cu alte substanțe medicamentoase sau cu substanțe auxiliare utilizate în procesul de condiționare.

Cercetarea substanțelor acestei clase este în plină desfășurare și acest lucru este evidențiat de numărul mare de studii de identificare, de cuantificare a acestora din materii prime, forme farmaceutice sau medii biologice, de stabilitate și de compatibilitate menționate în literatura de specialitate. Tehnicile analitice utilizate în aceste scopuri pornesc de la spectrofotometria în UV [3,4] și ajung la cromatografia de lichide de înaltă performanță cu detecție în UV [5-8] sau cuplată cu spectrometrie de masă [9-11]. Studiile de stabilitate ale acestor substanțe se axează pe mecanismele degradării lor [12] și interacțiunea lor cu substanțe medicamentoase și excipienți [13,14].

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiile efectuate în cadrul stagiului de doctorat, inserate de-a lungul a patru capitole, au urmărit patru direcții de cercetare: (1) elaborarea de metode analitice pentru determinarea substanțelor studiate din forma farmaceutică, (2) caracterizarea complexilor de incluziune ai celor trei substanțe cu β -ciclodextrina și cu derivații acesteia: hidroxipropil- β -ciclodextrina și β -ciclodextrina metilată aleator, (3) efectuarea de studii privind stabilitatea fosinoprilului în condiții de testare accelerată și (4) efectuarea de studii de compatibilitate ale sistemelor binare lisinopril/ β -ciclodextrină cu lactoza și fosinopril/hidroxipropil- β -ciclodextrina cu trei excipienți.

1. ANALIZA PRIN METODE SPECTRALE A UNOR IECA

În *capitolul IV* al prezentei lucrări s-au dezvoltat și validat, conform ghidurilor ICH, două metode spectrofotometrice în VIS pentru cuantificarea lisinoprilului ca atare și din forma farmaceutică și o metodă spectrofotometrică în UV pentru determinarea zofenoprilului substanță pură și din comprimate.

Metoda spectrofotometrică în VIS prezentată în *subcapitolul IV.1.* are la bază reacția chimică dintre lisinopril și ninhidrină, în prezența hidroxidului de potasiu în mediu alcoolic, prin încălzire la 95 ± 2 °C timp de 10 minute, condiții în care se formează un compus îndaminic colorat violet, care prezintă absorbantă maximă la 567 nm. Metoda prezintă liniaritate în domeniul de concentrații 10-30 $\mu\text{g/ml}$, este selectivă în prezența matricei forme farmaceutice, iar sensibilitatea ei e certificată de valoarea absorbivității molare 7.98×10^3 l/(mol·cm). Acuratețea și precizia metodei sunt atestate de valoarea erorii relative a mediei regăsirilor situată în intervalul 0.269% - 1.126% și de valoarea coeficientului de variație mai mică de 1.982%. Aplicarea acestei metode la cuantificarea lisinoprilului din comprimatele a 4 specialități comerciale a relevat un conținut de substanță activă care se încadrează în intervalul 99.306% - 106.535%, în acord cu prevederile farmacopeilor în vigoare.

Cea de-a doua metodă spectrofotometrică în VIS, prezentată în *subcapitolul IV.2.*, vizează derivatizarea lisinoprilului cu sulfat de cupru, când se formează un complex colorat albastru, care prezintă absorbantă maximă la 740 nm. Răspunsul analitic al dependenței absorbantei de

concentrația analitică a lisinoprilului corespunde unei ecuații polinomiale de ordin 2 și este expresia caracterului reversibil al procesului de complexare. Analiza datelor spectrofotometrice prin procedee matriceale relevă formarea unui singur produs de reacție cu manifestare dominantă în domeniul spectral vizibil. Metoda a fost aplicată cu succes la determinarea lisinoprilului din comprimate, iar rezultatele obținute sunt în concordanță cu prevederile farmacopeilor în vigoare.

În scopul determinării cantitative a zofenoprilului din comprimate s-a elaborat și validat o metodă spectrofotometrică în UV, bazată pe absorbanta maximă, la lungimea de undă 248 nm, a soluției apoase de zofenopril calcic, care este prezentată în *subcapitolul IV.3*. Intervalul de liniaritate al metodei este reprezentat de domeniul de concentrații 2-70 μg/ml, iar acuratețea și precizia sunt atestate de intervalul de încredere al mediei calculat la un grad de siguranță $\alpha_{95\%}$ cuprins în domeniul 98.811 – 101.005% (RSD 1.046) și de valoarea coeficientului de variație mai mică de 1.762%. Selectivitatea metodei, evaluată prin metoda adității standard, este confirmată de regăsirea procentuală a substanței pure cuprinsă în intervalul 98.088% - 101.988%, iar aplicarea metodei la cuantificarea zofenoprilului din produsele comerciale existente a avut ca rezultat un conținut în substanță activă care se încadrează în intervalul 98.987% - 100.003%, în concordanță cu prevederile farmacopeilor în vigoare.

Pentru verificarea identității și purității materiilor prime, în *subcapitolul IV.4*, s-a recurs la spectrul IR. Au fost puse în evidență benzile de absorbție corespunzătoare vibrațiilor caracteristice principalelor grupări funcționale ale fiecărei substanțe studiate și s-au comparat spectrele lisinoprilului și fosinoprilului obținute în condițiile proprii laboratoarelor noastre cu cele existente în literatură.

2. ANALIZA FOSINOPRILULUI PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ

Capitolul V prezintă o metodă HPLC-UV pe fază inversă, cu eluție izocratică, de cuantificare a fosinoprilului sodic din materia primă și din forma farmaceutică, cu un timp de analiză sub 15 minute. Faza mobilă este reprezentată de amestecul metanol:apă (80:20 v/v) cu pH-ul 3.4 adus la această valoare cu acid formic 80%. Metoda elaborată s-a dovedit a îndeplini cerințele impuse validării metodelor analitice și este caracterizată de selectivitate, liniaritate, precizie și acuratețe pe domeniul de concentrații 200-1000 μg/ml. La analiza a două produse comerciale prin această metodă, s-a obținut un conținut în substanță activă care se încadrează în intervalul 100.733% - 101.020%, respectând prevederile farmacopeilor în vigoare. Metoda a fost de asemenea aplicată la studiul stabilității substanței medicamentoase, în condiții de testare accelerată, ca atare și sub influența ambalajului primar.

3. STUDIUL INTERACȚIUNII UNOR IECA CU CICLODEXTRINE

În scopul îmbunătățirii unor proprietăți fizico-chimice și biofarmaceutice ale substanțelor studiate s-au obținut complecși de incluziune ai acestora cu β-ciclodextrina (β-CD), iar în cazul fosinoprilului și cu hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPBCD) și β-ciclodextrina metilată aleator (RAMEB). Complecșii de incluziune au fost obținuți folosind metoda pastei, în raport molar al componentelor de 1:1 și au fost analizați, în fază solidă, utilizând cromatografia pe strat subțire, metodele termice de analiză, difracția de raze X pe pulbere, spectrofotometria FTIR și în fază lichidă, prin metoda solubilității de fază. Caracterizarea complecșilor de incluziune obținuți este prezentată în *capitolul VI* al lucrării.

Studiile cromatografice relevă faptul că sistemele binare prezintă un comportament cromatografic diferit de cel al substanțelor individuale, valoarea hR_f a complexșilor de incluziune fiind mai mică comparativ cu cea a substanțelor active oaspete.

Evaluarea complexșilor de incluziune prin tehnicile termoanalitice a evidențiat deplasarea către alte valori de temperatură a fenomenelor termice caracteristice substanțelor active, precum și reducerea ariei picurilor lor și/sau dispariția lor în sistemele binare, comparativ cu substanțele pure. De asemenea, pentru toți compușii de incluziune, se notează și deplasări ale picurilor corespunzătoare deshidratării ciclodextrinelor spre valori mai mici de temperatură.

Analiza complexșilor de incluziune prin difracție de raze X indică, în situația complexșilor de incluziune ai β -CD, o reducere a gradului de cristalinitate a sistemelor binare comparativ cu substanțele oaspete (cristaline), în timp ce compușii binari ai HPBCD și RAMEB evidențiază o structură amorfă, similară ciclodextrinei. Acest fenomen demonstrează formarea unei noi stări solide și atestă existența interacțiunii dintre substanțele medicamentoase și ciclodextrine.

Analiza prin spectrofotometrie FTIR a substanțelor medicamentoase studiate, a ciclodextrinelor și a produșilor binari inhibitori ECA/CD evidențiază diferențe semnificative în spectrele IR ale compușilor binari în comparație cu cele ale substanțelor pure: (1) reducerea marcată a intensității benzilor caracteristice substanțelor medicamentoase în spectrele compușilor binari, (2) dispariția unora dintre benzile caracteristice substanțelor active în spectrele compușilor binari și (3) deplasări ale benzilor de absorbție ale substanțelor active spre frecvențe diferite în spectrele compușilor supramoleculari. Aceste rezultate susțin ipoteza formării de noi compuși, cu benzi de absorbție diferite și demonstrează formarea complexșilor de incluziune între substanțele active și ciclodextrine.

Studiul solubilității de fază, realizat conform metodei descrise de Higuchi și Connors [14], evidențiază o creștere a solubilității fosinoprilului și zofenoprilului în prezența ciclodextrinelor studiate, diagramele solubilității de fază fiind de tip B_S pentru complexșii fosinoprilului și zofenoprilului cu β -CD și de tip A_L în cazul complexșilor fosinoprilului cu HPBCD și RAMEB.

Rezultatele obținute, prin tehnicile analitice utilizate pentru caracterizarea sistemelor binare, demonstrează cu claritate faptul că proprietățile fizico-chimice ale produșilor binari sunt diferite în raport cu substanțele active constitutive și confirmă formarea complexșilor de incluziune atât în fază solidă cât și în fază lichidă.

4. STUDII DE STABILITATE

În cadrul studiilor de stabilitate, prezentate în *capitolul VII* al prezentei lucrări, s-a analizat comportamentul fosinoprilului în condiții de testare accelerată și stabilitatea acestuia sub influența ambalajului primar. S-a evaluat, de asemenea, comportamentul termic al fosinoprilului, al complexului de incluziune al acestuia cu HPBCD, compatibilitatea sistemului binar FOS/HPBCD cu excipienți, și s-a testat stabilitatea complexului de incluziune al lisinoprilului cu β -ciclodextrina în prezența lactozei.

Studiul fosinoprilului sodic în condiții de testare accelerată (temperatură 40 ± 2 °C și UR $75 \pm 2\%$) evidențiază o reacție de degradare a acestuia de ordin aparent zero, atât în cazul expunerii la lumină cât și în absența ei și constituie subiectul *subcapitolului VII.1*. Procentul substanței degradate, după 6 luni de păstrare în condițiile menționate, a fost de 21.901% și de 22.289% în absența, respectiv prezența luminii.

Rezultatele studiului stabilității fosinoprilului sodic sub influența ambalajului primar aluminiu/policlorură de vinil-strat dublu de policlorură de vinil (Al/PVC-PVDC) și aluminiu/policlorură de vinil-poliamidă/aluminiu (Al/PVC-PA/Al), în condiții de testare accelerată,

în absența luminii, pe o perioadă de 6 luni, au evidențiat o stabilitate mai bună a comprimatelor în ambalajul primar Al-PVC-PA/Al, în condițiile experimentale date (*subcapitolul VII.2*).

Studiile termoanalitice și spectrofotometrice FTIR ale complexului de incluziune LIS/ β -CD în prezența lactozei, expuse în *subcapitolul VII.3*, au evidențiat lipsa incompatibilităților dintre sistemul binar și excipient. Includerea lisonoprilului în cavitatea β -CD are ca rezultat împiedicarea interacțiunii chimice dintre substanța medicamentoasă și excipient și permite folosirea lactozei ca și excipient în formulările conținând această substanță activă. Acest studiu evidențiază stabilizarea lisonoprilului în raport cu lactoza prin formarea sistemului de tip gazdă-oaspete.

Studiile cinetice în condiții neizoterme, prin metodele izoconversionale integrale Kissinger-Akahira-Sunose și Flynn-Wall-Ozawa, au fost utilizate pentru calcularea energiei de activare a procesului de descompunere a fosinoprilului din intervalul de temperatură 120-250 °C. De asemenea, analiza cinetică în condițiile menționate s-a utilizat și pentru studiile de compatibilitate ale sistemului binar FOS/HPBCD cu excipienți, sistematizate în *subcapitolul VII.4*.

Analiza cinetică a amestecului FOS-stearat de magneziu relevă o valoare a energiei de activare (E_a) semnificativ mai mică în comparație cu cea a fosinoprilului. Incompatibilitatea dintre cele două substanțe, raportată în literatură și confirmată de valoarea E_a a amestecului, este înlăturată prin includerea FOS în cavitatea HPBCD, fapt susținut de analiza spectroscopică FTIR și de studiile cinetice, care relevă o valoare a E_a a amestecului FOS/HPBCD-stearat de magneziu foarte apropiată de cea a sistemului binar FOS/HPBCD. Prin urmare, studiul cinetic demonstrează stabilizarea fosinoprilului în prezența stearatului de magneziu prin includerea lui în cavitatea ciclodextrinei. Evaluarea stabilității complexului de incluziune FOS/HPBCD în prezența talcului și amidonului a indicat, prin rezultatele studiilor cinetice, lipsa incompatibilităților dintre excipienți și sistemul binar.

CONCLUZII GENERALE

1. În lucrarea de față s-au elaborat și validat, conform ghidurilor ICH, două metode spectrofotometrice în VIS exacte, precise și selective pentru cuantificarea lisonoprilului din forma farmaceutică.
2. S-a dezvoltat o metodă spectrofotometrică în UV simplă, rapidă și necostisitoare pentru determinarea zofenoprilului ca atare și din comprimate, caracterizată de liniaritate, acuratețe, precizie, sensibilitate și selectivitate pe domeniul de concentrații 2-70 $\mu\text{g/ml}$.
3. S-a efectuat studiul spectral în domeniul IR al celor trei substanțe studiate și s-au pus în evidență benzile de absorbție corespunzătoare vibrațiilor caracteristice principalelor grupări funcționale.
4. În stabilirea identității substanțelor prin spectrofotometrie IR s-a avut în vedere perspectiva pe care această tehnică o deschide asupra caracterizării și interpretării fenomenului de interacțiune prin incluziunea substanțelor medicamentoase în cavitatea ciclodextrinelor.
5. S-a dezvoltat o metodă HPLC-UV pe fază inversă, cu eluție izocratică, de cuantificare a fosinoprilului sodic din materia primă și din forma farmaceutică, cu un timp de analiză sub 15 minute, metodă caracterizată de selectivitate, liniaritate, precizie și acuratețe pe domeniul de concentrații 200-1000 $\mu\text{g/ml}$.
6. S-au obținut și caracterizat, prin cromatografie pe strat subțire, metode termoanalitice, difracție de raze X, spectroscopie FTIR și metoda solubilității de fază, complexii de incluziune ai substanțelor studiate cu β -CD și ai FOS cu HPBCD și RAMEB.
7. Obținerea sistemelor binare inhibitor ECA/ciclodextrine a determinat creșterea solubilității, cu consecințe favorabile asupra biodisponibilității, și a stabilității substanțelor medicamentoase incluse în cavitatea ciclodextrinelor.

8. Studiul fosinoprilului sodic în condiții de testare accelerată (temperatură 40 ± 2 °C și UR $75 \pm 2\%$) evidențiază o reacție de degradare a acestuia de ordin aparent zero, atât în cazul expunerii la lumină cât și în absența ei.
9. Studiile cinetice în condiții neizoterme, prin metodele izoconversionale integrale Kissinger-Akahira-Sunose și Flynn-Wall-Ozawa indică o energie de activare (E_a) a procesului de descompunere a fosinoprilului din intervalul de temperatură 120-250 °C în valoare medie de 206.433 kJ/mol.
10. Evaluarea, prin studii cinetice, a stabilității complexului de incluziune FOS/HPBCD în prezența excipienților a indicat lipsa incompatibilităților dintre excipienți și sistemul binar.
11. Studiile întreprinse în cadrul acestei teze și rezultatele obținute pot constitui punctul de plecare al cercetărilor în direcția dezvoltării unor noi formulări ale fosinoprilului, cu biodisponibilitate superioară.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Brown, J. N. and Vaughan, E. D. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, *Circulation*, 1998; 97: 1411-1420.
2. Ferrar, R., Guardigli, G., Mele, D., Valgimigli, M., and Ceconi, C. Myocardial ischemia: new evidence for angiotensin - converting enzyme inhibition, *European Heart Journal Supplements*, 2003; 5 (Supplement E), E11–E17.
3. El Kawy, M. Abd., El Gindy, A.E., Hegazy, M., Shokry, E.S. Novel Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Two Binary Mixtures Containing Hydrochlorothiazide by Ratio Subtraction, *Journal of Applied Sciences Research*, 2010; 6(8): 918-926.
4. Carlucci, G., Di Federico, L., Iuliani, P. Simultaneous determination of zofenopril and hydrochlorothiazide in tablets using derivative UV spectrophotometry. *Analytical Letters*, 2010; 439 (16) : 2609-2617.
5. Ivanovic, D., Medenica, M., Jancic, B., Knezevic, N. Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril and their impurities, *Acta Chromatogr.*, 2007; 18: 143-156.
6. Ivanovic, D., Medenica, M., Jancic, B., Malenovic, A., Markovic, S. Chemometrical approach in fosinopril sodium and its degradation product fosinoprilat analysis, *Chromatographia*, 2004; Suppl. 60: S87 – S92.
7. Saglik, A.S. Validated RP-LC method for simultaneous determination of of zofenopril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparation. *Journal of Chromatographic Science*, 2011; 49: 259-263.
8. Qin, W., Zhang, Z., Tian, Y., Xu, F., Wang N. and Chen, Y. Rapid quantification of lisinopril in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.*, 2007; 21: 415-421.
9. Shuangjin, C., Fang, F., Ming, M., Han, L., Yun, C. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of fosinopril and its active metabolite in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 2007; 854: 143–151.
10. Jiang, Y., Yan, F., Di B., Feng, F., You, L., Huang, L., Lu J. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of zofenopril and its active metabolite zofenoprilate in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011; doi:10.1016/j.jpba.2011.02.010.
11. Hinojosa-Torres, J., Aceves-Hernandez, J. M., Hinojosa-Torres, J., Paz, M., Castano, V.M., Agacino-Valdes, E. Degradation of lisinopril: A physico-chemical study, *Journal of Molecular Structure*, 2008; 886: 51-58.
12. Kumar, V., Malik, S., Singh, S. Polypills for the treatment of cardiovascular diseases. Part 2. LC-MS/TOF characterisation of interaction/degradation products of atenolol/lisinopril

- and aspirin, and mechanism of formation thereof, *J Pharm Biomed Anal*, 2008; 48: 619–628.
13. Bharate, S.S., Bharate, S.B., Bajaj, A.N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J. Excipients and Food Chem.*, 2010; 1 (3): 3-26.
 14. Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility technique. *Adv Anal Chem Instrum*, 1965; 4: 117–212.
 15. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Fosinopril – cyclodextrin inclusion complexes: phase solubility and physicochemical analysis, *Pharmazie*, 2011; 66: 584-589.
 16. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Sasca, V., Barvinschi, P., Bojiță, M. Characterization of fosinopril natrium-hydroxypropil-β-cyclodextrin inclusion complex, *Revista de Chimie*, 2011; 62 (3): 349-351.
 17. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Thin-layer chromatography analysis for inclusion complexes of fosinopril and zofenopril with cyclodextrins, *Farmacia*, 2010; 58(4): 478 – 484.
 18. **Sbârcea L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Method validation for spectrophotometric determination of lisinopril in pharmaceuticals using copper sulphate, *Clujul Medical*, 2010; 83 (4): 625- 630.
 19. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu C., Șoica, C., Bojiță, M. Thin-layer chromatographic studies of some angiotensin converting enzyme inhibitors and their inclusion complexes with β-cyclodextrin, *Studia Universitatis "Vasile Goldiș"*, Seria Științele Vieții, 2010; 20 (2): 35-38.
 20. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., Szabadai, Z., Udrescu, L., Bojiță, M., The determination of lisinopril based on its complexation reaction with Cu²⁺ using spectrophotometric methods, *Farmacia*, 2007; 2: 165-170.
 21. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Pătruțescu, C., Z., Bojiță, M. Guest-host system of fosinopril in hydroxypropyl-β-cyclodextrin: IR spectroscopy, X-ray powder diffraction and phase solubility studies, II European Cyclodextrin Conference, 2-4 oct. 2011, Asti, Italy, Abstract book, V P22.
 22. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M., Spectrophotometric method for quantitative determination of lisinopril with ninhydrin, The XIV National Congress of Pharmacy, Târgu-Mureș, 13th–16th oct. 2010, *Acta Medica Marisiensis*, 2010; 56 (2): 33.

CURRICULUM VITAE

1. **Nume, prenume:** SBÂRCEA Laura (născută EFTIMIE)
2. **Data și locul nașterii:** 16.10.1974, Timișoara
3. **Cetățenie:** Română
4. **Stare civilă:** Căsătorită
5. **Email:** laura_sbarcea@yahoo.com
6. **Educație și formare:**
 - 2004-prezent** Doctorand al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Facultatea de Farmacie, conducător științific prof. univ. dr. Marius Bojiță
 - 2003-2004** Masterat în Analiza și Controlul Medicamentelor, în cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Facultatea de Farmacie
 - 2002** Farmacist specialist – Farmacie Generală
 - 2000-2002** Farmacist rezident în specialitatea Farmacie Generală
 - 1998** Licențiat în Farmacie

1993-1998 Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara, Facultatea de Farmacie – șef de promoție

1993 Diplomă de bacalaureat

1989-1993 Liceul „Moise Nicoară” Arad

7. **Experiența profesională**

2002-prezent Asistent universitar la disciplina Chimie Farmaceutică a Facultății de Farmacie din cadrul UMF „Victor Babeș” Timișoara

1999-2002 Preparator universitar la disciplina Chimie Farmaceutică a Facultății de Farmacie din cadrul UMF „Victor Babeș” Timișoara

2004-2010 Farmacist diriginte în cadrul SC HelpNet Farma SA

1999-2004 Farmacist în cadrul SC HelpNet Farma SA

1998-1999 Farmacist stagiar în cadrul SC HelpNet Farma SA

8. **Cursuri postuniversitare**

2006-2007 Attestation d’Homéopathie, Timișoara

2005 Particularități terapeutice în geriatrie, UMF „Victor Babeș” Timișoara

2004 Actualități în legislația farmaceutică, București

2004 Noile formulări farmaceutice, UMF „Victor Babeș” Timișoara

2004 Sisteme de eliberare controlată a substanțelor medicamentoase, UMF „Victor Babeș” Timișoara

2002 Proiectarea medicamentelor, UMF „Victor Babeș” Timișoara

2002 Comunicarea cu pacientul, UMF „Victor Babeș” Timișoara

2002 Plantele în terapia alopată și homeopată, UMF „Victor Babeș” Timișoara

9. **Membru al asociațiilor profesionale**

Societatea de Științe Farmaceutice din România

Colegiul Farmaciștilor Timiș

10. **Limbi străine:** engleză, franceză

11. **Activitatea științifică**

A. Lucrări publicate in extenso în reviste de circulație internațională

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Fosinopril – cyclodextrin inclusion complexes: phase solubility and physicochemical analysis, *Pharmazie*, 2011; 66: 584-589.

B. Lucrări publicate in extenso în reviste de circulație națională

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Sasca, V., Barvinschi, P., Bojiță, M. Characterization of fosinopril sodium-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, *Revista de Chimie*, 2011; 62 (3): 349-351.
2. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Thin-layer chromatography analysis for inclusion complexes of fosinopril and zofenopril with cyclodextrins, *Farmacia*, 2010; 58(4): 478-484.
3. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Method validation for spectrophotometric determination of lisinopril in pharmaceuticals using copper sulphate, *Clujul Medical*, 2010; 83 (4): 625- 630.
4. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Șoica, C., Bojiță, M. Thin-layer chromatographic studies of some angiotensin converting enzyme inhibitors and their inclusion complexes with β -cyclodextrin, *Studia Universitatis "Vasile Goldiș"*, Seria Științele Vieții, 2010; 20 (2): 35-38.
5. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., Szabadai, Z., Udrescu, L., Bojiță, M., The determination of lisinopril based on its complexation reaction with Cu^{2+} using spectrophotometric methods, *Farmacia*, 2007; 2: 165-170.

6. Drăgan, L., **Sbârcea, L.**, The determination of the stability of enalapril maleate under the influence of the elementary package, *Timisoara Medical Journal*, 2006; 56 (2): 39-41.
7. Trandafirescu, C., Șoica, C., **Eftimie, L.**, Dehelean, C., Ciubotariu, D. Inhibitori ai ciclooxygenazei-2, *Medicina în Evoluție*, 2003; 2 :73-76.

C. Lucrări publicate în volumele manifestărilor internaționale

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Pătruțescu, C., Bojiță, M. Guest-host system of fosinopril in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: IR spectroscopy, X-ray powder diffraction and phase solubility studies, II European Cyclodextrin Conference, 2-4 oct. 2011, Asti, Italy, Abstract book: V P22.

D. Lucrări publicate în volumele manifestărilor naționale

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Spectrophotometric method for quantitative determination of lisinopril with ninhydrin, Congresul Național de Farmacie ediția a XIV-a, Târgu-Mureș, 13-16 oct 2010, Acta Medica Marisiensis, vol.56, sppl.2, p.33.
2. Trandafirescu, C., Gyeresi, A., Szabadai, Z., Aigner, Z., Kata, M., Popovici, M., **Sbârcea, L.** Study of interaction of cyclodextrins with albendazole, Congresul Național de Farmacie ediția a XIV-a, Târgu-Mureș, 13-16 oct 2010, Acta Medica Marisiensis, vol.56, Sppl.2, p.38.
3. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Șoica, C., Bojiță, M. Analiza prin cromatografie în strat subțire a unor inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei și a complexilor de incluziune ai acestora cu β -ciclodextrina, „Noi provocări în practica farmaceutică” Zilele Farmaceutice Orădene, Ediția a III-a, 8-10 oct. 2009, volum, Editura Universității din Oradea, p.352-353.
4. Șoica, C., Cântă-Pânzaru, S., Dehelean, C., Ionescu, D., **Sbârcea, L.** Caracterizarea prin spectroscopie vibrațională și difracție de raze X a furosemidei și clortalidonei și a complexilor lor de incluziune cu ciclodextrine, Noi provocări în practica farmaceutică, Zilele Farmaceutice Orădene, Ediția a III-a, 8-10 oct. 2009, volum, Editura Universității din Oradea, p. 354.
5. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., Szabadai, Z., Udrescu, L., Bojiță, M. Determinarea lisinoprilului pe baza reacției de complexare cu ionii Cu^{2+} prin metode spectrofotometrice, Congresul Național de Farmacie, ediția a XIII-a, 26-28 sept. 2006 Cluj-Napoca, România, Abstract book, p. 105-106.

E. Cursuri/Suporturi lucrări practice publicate

1. Trandafirescu, C., **Sbârcea, L.**, *Chimie Farmaceutică. Chimioterapice antiinfecțioase*, Ed. Mirton Timișoara, ISBN 978-973-52-0978-0, 2011.
2. Drăgan, L., **Sbârcea, L.**, *Chimie Farmaceutică lucrări practice, partea I*, Ed. Mirton Timișoara, ISBN 978-973-52-0190-6, 2007.
3. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., *Chimie Farmaceutică lucrări practice, partea II*, Ed. Mirton Timișoara, ISBN 987-973-52-0799-1, 2010.
4. Drăgan, L., **Sbârcea, L.**, *Chimia Medicamentului - îndrumător de lucrări practice*, Editura EUROBIT Timisoara, ISBN 978-973-620-727-3, 2010.

“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

CLUJ-NAPOCA

FACULTY OF PHARMACY



LAURA SBÂRCEA

**ANALYTICAL AND STABILITY STUDIES OF SOME
ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS**

Abstract of the doctoral thesis

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

**Scientific Coordinator
Prof. PhD. MARIUS BOJIȚĂ**

2011

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	3
I. RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM	3
I.1. The components of the renin-angiotensin-aldosterone system	3
I.2. The role of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases.....	5
I.3. Pharmacotherapeutic agents acting on the renin-angiotensin system	6
II. GENERALITIES ON ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS (ACE inhibitors)	7
II.1. Discovery and development of ACE inhibitors	7
II.2. Chemical structure – biological activity relationships in the series of ACE inhibitors	9
II.3. Chemical structure and physicochemical properties of some ACE inhibitors: lisinopril, fosinopril, zofenopril.....	12
II.4. Pharmacological properties of lisinopril, fosinopril and zofenopril	15
III. ANALYTICAL METHODS USED IN THE STUDY OF SOME ACE INHIBITORS	20
III.1. Spectral methods.....	20
1.1. UV-VIS spectrophotometry	20
1.1.1. UV-VIS spectrophotometry in the study of lisinopril	21
1.1.2. UV-VIS spectrophotometry in the study of fosinopril	23
1.1.3. UV-VIS spectrophotometry in the study of zofenopril	25
1.2. IR spectrophotometry	26
III.2. Chromatographic methods.....	29
2.1. High performance liquid chromatography (HPLC).....	30
2.1.1. HPLC methods in the study of lisinopril	30
2.1.2. HPLC methods in the study of fosinopril	32
2.1.3. HPLC methods in the study of zofenopril	35
III.3. Analytical methods used in the study of ACE inhibitors inclusion complexes with cyclodextrins.....	37
III.4. Analytical methods in stability studies	39
4.1. Degradation mechanisms of some ACE inhibitors: lisinopril, fosinopril.....	39
4.2. Interaction of lisinopril and fosinopril with drug substances and excipients	42
4.3. Laws of degradation kinetics	46
III.5. Analytical methods validation	48
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
IV. ANALYSIS OF SOME ACE INHIBITORS USING SPECTRAL METHODS	51
IV.1. VIS spectrophotometric method for determination of lisinopril using ninhydrin	51
1.1. The principle of the method.....	51
1.2. The method description	52
1.3. Results and discussion	53
1.3.1. Optimization of the reaction conditions.....	53

1.3.2. Method validation	55
1.4. Analytical applications	59
1.5. Comparison of the proposed procedure with the existing spectrophotometric methods for lisinopril quantification	60
1.6. Conclusions.....	62
IV.2. VIS spectrofotometric method for determination of lisinopril with copper sulphate	62
2.1. The principle of the method.....	62
2.2. The method description	63
2.3. Results and discussion	63
2.3.1. Optimal concentration of copper sulphate	64
2.3.2. Evaluation of the number of obtained reaction products.....	64
2.3.3. Method validation.....	65
2.4. Analytical applications	69
2.5. Comparison of the results of lisinopril quantification from commercial tablets obtained by the spectrophotometric method with ninhydrin and by the copper sulphate method	70
2.6. Conclusions.....	71
IV.3. UV spectrophotometric determination of zofenopril	71
3.1. The principle of the method.....	71
3.2. The method description	72
3.3. Results and discussion	72
3.3.1. Method validation.....	73
3.4. Analytical applications	77
IV.4. IR spectrum – identity criterion.....	79
4.1. Samples preparation.....	79
4.2. IR spectrum of lisinopril.....	79
4.3. IR spectrum of al fosinopril.....	81
4.4. IR spectrum of zofenopril.....	82
IV.5. Conclusions of spectral studies	83

V. QUANTITATIVE ANALYSIS OF FOSINOPRIL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

V.1. Working hypothesis	85
V.2. Materials and methods	85
V.3. Results and discussion	86
3.1. Optimization of the chromatographic conditions	88
3.2. Method validation.....	88
V.4. Analytical applications	94
4.1. Method application to pharmaceutical formulation.....	94
4.2. Acuracy and selectivity study on the pharmaceutical formulation	95
V.5. Conclusions.....	95

VI. INTERACTION STUDY OF SOME ACE INHIBITORS WITH CYCLODEXTRINS

VI.1. Cyclodextrins (CD) – structure, properties, uses.....	97
1.1. History of cyclodextrins	97
1.2. Chemical structure, physicochemical and toxicological properties	97

1.3. Structural conditions for inclusion complexes formation.....	100
1.4. The uses of cyclodextrins	101
VI.2. Methods for the inclusion complexes preparation.....	102
2.1. General methods	102
2.2. Obtaining the ACE inhibitors/cyclodextrin inclusion complexes	104
VI.3. Analysis methods of supramolecular compounds ACE inhibitors/cyclodextrins	104
3.1. Thin-layer chromatography	104
3.2. Thermal analysis	111
3.3. X-ray diffractometry	120
3.4. FTIR spectroscopy	126
3.5. Phase solubility method.....	134
3.6. Conclusions regarding inclusion complexes of ACE inhibitors with cyclodextrins.....	139
VII. STABILITY STUDIES	141
VII.1. Stability study of fosinopril in accelerate testing conditions	141
1.1. Working hypothesis	141
1.2. Material and method	141
1.3. Results and discussion	142
VII.2. Stability study of fosinopril under the influence of the elementary package.....	146
2.1. Working hypothesis	146
2.2. Material and method	146
2.3. Results and discussion	146
VII.3. Stability study of the binary systems ACE inhibitors/cyclodextrins in the presence of excipients.....	148
3.1. Comparative assessment of lisinopril and inclusion complex lisinopril/ β -cyclodextrin stability in the presence of lactose	148
3.2. Stability study of the binary system fosinopril/hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the presence of excipients.....	153
VII.4. Conclusions of the stability studies.....	167
FINAL CONCLUSIONS.....	169
REFERENCES	176

Key-words: lisinopril, fosinopril, zofenopril, quantitative determination, validation, inclusion complexes with cyclodextrins, kinetic studies under non-isothermal conditions.

I. CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors undoubtedly represent a milestone in cardiovascular diseases therapy. These compounds act on the renin-angiotensin-aldosterone system, which is known as a key element in the adjustment of the blood pressure and hydro-electrolyte homeostasy [1].

ACE inhibitors were developed as antihypertensive substances, but nowadays, they have proved their efficiency in other cardiovascular diseases such as: congestive heart failure, myocardial infarction, atherosclerotic vascular disease and diabetic nephropathy [1,2].

The first part of this thesis contains three chapters. In the *first chapter*, a succinct presentation of the renin-angiotensin-aldosterone system and of its role in the cardiovascular pathology is displayed. Also, mention is made of the groups of drug substances which act at this level.

The bibliographical study, developed in the next two chapters, *Chapter II and III*, has been performed on three key substances of the class of ACE inhibitors: lisinopril (LIS), fosinopril (FOS) and zofenopril (ZOF), having in their molecule carboxyl, phosphinic and sulphhydryl remains, as functional groups that create links with Zn^{2+} ions of ACE. The study presents a synthesis of the literature data about physicochemical characteristics, pharmacological profile, analytical properties, the factors which influence their stability and also the methods used in assessing their stability and compatibility with other drug substances or auxiliary substances used in the formulation process.

The research of the ACE inhibitors is a developing process emphasized by the great number of studies regarding identification, quantification of these substances from raw materials, pharmaceutical formulation and biological environments, stability and compatibility, reported in the literature. The analytical methods used for these purposes range from UV spectrophotometry [3,4] to high performance liquid chromatography with UV detection [5-8] or coupled with mass spectrometry [9-11]. The stability studies of these substances are based on their degradation mechanisms (pathways) [12] and their interaction with drug substances and excipients [13,14].

II. PERSONAL CONTRIBUTIONS

The studies performed during the doctoral stage, inserted along four chapters, have followed four research directions: (1) the development of analytical methods for the quantitative determination of the studied substances in pharmaceutical dosage forms, (2) the characterization of the inclusion complexes between the three substances and β -cyclodextrin and its derivative: hydroxypropyl- β -cyclodextrin and randomly methylated β -cyclodextrin, (3) the performance of studies regarding fosinopril's stability in accelerated testing conditions and (4) the performance of compatibility studies of binary systems lisinopril/ β -cyclodextrin with lactose and fosinopril/hydroxypropyl- β -cyclodextrin with three excipients.

1. ANALYSIS OF SOME ACE INHIBITORS USING SPECTRAL METHODS

In *Chapter IV* of this thesis, two VIS spectrophotometric methods for quantitative determination of lisinopril in pure and pharmaceutical formulation and an UV spectrophotometric method for quantification of zofenopril from raw materials and dosage forms have been developed and validated according to ICH guidelines.

The VIS spectrophotometric method described in *subchapter IV.1* is based on the chemical reaction between lisinopril and ninhydrin, in the presence of potassium hydroxide in ethanolic medium, by heating at 95 ± 2 °C for 10 min. The end product, purple colored, formed in these reaction conditions exhibits maximum absorbance at 567 nm. The method presents linearity in the concentration range of 10–30 $\mu\text{g/ml}$ and selectivity in the presence of the pharmaceutical formulation matrix. The sensitivity of the proposed method is certified by the value of the molar absorptivity of 7.98×10^3 l/(mol·cm), and the accuracy and precision by the value of the relative error in the recovery average of 1.126% and by the value of the variation coefficient smaller than 1.982%. The application of this method to the quantification of 4 marketed products containing lisinopril has revealed an amount of drug substance which falls within the range of 99.306% - 106.535%, accepted by the pharmacopoeias.

The second VIS spectrophotometric method, presented in *subchapter IV.2.*, has used the derivatization of lisinopril with copper sulphate, when a blue complex, with maximum absorbance at 740 nm, is formed. The analytical response of the optical absorbance dependence on the lisinopril concentration meets a 2nd order polynomial equation and represents the expression of the reversible nature of the complexation process. The analysis of the spectrophotometric data by means of matrix procedures reveal the formation of a unique reaction product which presents absorbance in the visible spectral field. This method was successfully applied to the determination of lisinopril in dosage form and the obtained results are in agreement with pharmacopoeia specifications.

An UV spectrophotometric method for the quantification of zofenopril in pharmaceutical formulations was developed and validated. The method is based on the maximum absorbance of an aqueous solution of zofenopril calcium salt at the wavelength of 248 nm and it is enlarged in *subchapter IV.3*. The linearity domain of the proposed method is in the concentration range of 2-70 µg/ml and the accuracy and precision are certified by the confidence interval of the average over the safety degree $\alpha_{95\%}$ within the range of 98.811 – 101.005% (RSD 1.046) and by the value of the coefficient of variation smaller than 1.762%. The selectivity of the procedure, assessed by standard addition method, is confirmed by the percentage recovery of the pure substance in the range of 98.088% - 101.988%. The application of the method to the determination of zofenopril from the existing marketed products has shown an amount of substance which falls within the range of 98.987% - 100.003%, accepted by the pharmacopoeias.

In order to assess the identity and purity of the raw materials, in *subchapter IV.4.*, IR spectra were recorded. There were highlighted in the IR spectra of studied substances the absorption bands corresponding to the vibration of the main functional groups of the substances. The IR spectra of lisinopril and fosinopril obtained in the specific conditions of our laboratories were compared with those existing in the literature.

2. QUANTITATIVE ANALYSIS OF FOSINOPRIL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Chapter V presents a reversed phase HPLC-UV method with isocratic elution for the determination of fosinopril sodium in pure and in tablets with a chromatographic analysis run-time under 15 minutes. The mobile phase consists of a mixture of methanol:water (80:20 v/v) with pH value of 3.4 adjusted using 80% formic acid. The proposed procedure meets the validation requirements of analytical methods and is characterised by selectivity, linearity, precision and accuracy in the concentration range of 200-1000 µg/ml. The application of this method to the analysis of two commercial products containing fosinopril leads to an amount of drug substance between 100.733% and 101.020%, accepted by the pharmacopoeias. The method was also used for the stability study of fosinopril in accelerated testing conditions and under the influence of the elementary package.

3. INTERACTION STUDY OF SOME ACE INHIBITORS WITH CYCLODEXTRINS

In order to improve some physicochemical and biopharmaceutical properties of the studied substances, inclusion complexes with β -cyclodextrin, and in the case of fosinopril also with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and randomly methylated β -cyclodextrin were obtained. The inclusion complexes were prepared using the kneading method, in the molar ratio 1:1 and were analysed in solid state by thin-layer chromatography, thermal methods, powder X-ray

diffraction, FTIR spectroscopy and in solution by phase solubility method. The characterization of the obtained inclusion complexes is presented in *Chapter VI*.

The chromatographic studies reveal that the binary systems have a chromatographic behaviour which differs from that of the active substances, the hR_f value of the inclusion complexes being smaller than that of the guest molecules.

The assessment of the inclusion complexes using thermoanalytical techniques indicates the shifting towards different temperature values of the thermal phenomena characteristic of the active substances and also, the reduction of the peaks area and/or the peaks disappearance in the binary systems in comparison with the pure substances. In the case of all inclusion complexes a shifting was noticed to smaller values of temperature of the peaks corresponding to cyclodextrins dehydration processes.

The X-ray diffraction indicates, for the β -cyclodextrin inclusion compounds, a reduction in their crystallinity in comparison with pure substances (crystalline), while the binary compounds of HPBCD and RAMEB have shown an amorphous structure, similar to that of cyclodextrin. This phenomenon demonstrates the formation of a new different solid state and confirms the existence of the interaction between drug substances and cyclodextrins.

FTIR spectroscopy analysis of the studied drug substances, cyclodextrins and binary products ACE inhibitors/CD reveal significant differences in the IR spectra of the binary compounds compared to those of the pure substances: (1) the marked reduction of the intensity of drug substances characteristic bands in the IR spectra of the binary compounds, (2) the disappearance of some of the drug substances characteristic bands in the IR spectra of the binary compounds and (3) shifting of the drug substances characteristic bands towards different frequency in the IR spectra of the supramolecular compounds. These results support the hypothesis of the new compounds formation with different spectroscopic bands and demonstrate the inclusion complex formation between the drug substances and cyclodextrins.

Phase solubility study, performed according to the method reported by Higuchi and Connors [14], highlights an increase of fosinopril and zofenopril solubility in the presence of studied cyclodextrins. The phase solubility diagrams are B_S -type for the inclusion complexes of fosinopril and zofenopril with β -cyclodextrin and A_L -type diagram in the case of fosinopril inclusion complexes with HPBCD and RAMEB.

The results obtained by different characterization techniques for the binary systems clearly show that the physicochemical properties of the binary products were different in relation to the constitutive drug substances and confirm the inclusion complexes formation in both solid and liquid state.

4. STABILITY STUDIES

In the stability studies, presented in *Chapter VII* of the thesis, the behaviour of fosinopril in accelerated testing conditions and its stability under the influence of elementary package was analysed. The thermal behaviour of fosinopril and its inclusion complex with HPBCD, the compatibility of the binary system FOS/HPBCD with excipients were also assessed and the stability of the inclusion complex of lisinopril with β -cyclodextrin in the presence of lactose was tested.

The fosinopril study in the accelerated testing conditions (temperature 40 ± 2 °C and RH $75 \pm 2\%$) highlights zero order kinetic decomposition reaction both in the case of light exposure and in its absence and is presented in *subchapter VII.1*. The degradation rate, after six months of storage in the mentioned conditions was 21.901% and 22.289% in the absence respectively presence of the light.

The results of the fosinopril stability study under the influence of the elementary package aluminium/vinyl polychloride-double layer vinyl polychloride (Al/PVC-PVDC) and aluminium/vinyl polychloride-polyamide/aluminium (Al/PVC-PA/Al), in the accelerated testing conditions, in the absence of the light, during the six months have indicated better stability of tablets in the primary package of Al-PVC-PA/Al, in the given experimental conditions (*subchapter VII.2*).

Thermoanalytical and FTIR spectrophotometric studies of the inclusion complex LIS/ β -CD in the presence of lactose, exposed in *subchapter VII.3.*, have revealed the lack of incompatibility between the binary system and the excipient. The inclusion of lisinopril into the cavity of β -CD results in the prevention of the chemical interaction between the drug substance and the excipient and allows the use of lactose as excipient in the lisinopril formulations. This study shows the stabilization of lisinopril in relation with lactose due to the formation of the guest-host system.

The kinetic studies under non-isothermal conditions, using the isoconversional Kissinger-Akahira-Sunose's and Flynn-Wall-Ozawa methods have been performed in order to calculate the activation energy of the fosinopril decomposition process within the 120-250 °C temperature range. Also, the kinetic analysis in the above described conditions have been used for the compatibility studies of the binary system FOS/HPBCD with excipients, presented in *subchapter VII.4*.

The kinetic analysis of the physical mixture FOS-magnesium stearate indicates an activation energy value (E_a) significantly lower compared with that of fosinopril. The incompatibility between the two substances, reported in the literature and confirmed by the E_a value of the mixture is prevented by the encapsulation of FOS into the HPBCD cavity. This fact is supported by the FTIR spectroscopic analysis and the kinetic studies which reveal a value of E_a for the physical mixture FOS/HPBCD-magnesium stearate very close of that of the binary system FOS/HPBCD. Therefore, the kinetic study demonstrates the stabilization of fosinopril in relation with magnesium stearate due to its embedding into the cyclodextrin cavity. The stability assessment of the inclusion compound FOS/HPBCD in the presence of talc and starch has indicated, by means of the results of the kinetic studies, the lack of the incompatibility between the excipients and the binary system.

FINAL CONCLUSIONS

1. In this thesis, two accurate, precise and selective VIS spectrophotometric methods for quantitative determination of lisinopril in pharmaceutical formulation have been developed and validated, according to ICH guidelines.
2. A simple, rapid, inexpensive, accurate, precise and selective UV spectrophotometric method for determination of zofenopril has been developed.
3. The IR spectral study of the three studied substances has been performed. The absorption bands corresponding to the vibration of the main functional groups of the substances were highlighted.
4. The perspective this technique opens on the characterization and rendering of the interaction phenomenon through the inclusion of the drug substances into the cyclodextrin cavity was taken into account in the identification process using IR spectrophotometry.
5. A reversed phase HPLC-UV method with isocratic elution for the determination of fosinopril sodium in pure and in tablets with a chromatographic analysis run-time under 15 minutes has been developed. The proposed method is characterised by selectivity, linearity, precision and accuracy in the concentration range of 200-1000 $\mu\text{g/ml}$.
6. The inclusion complexes of the studied substances with β -CD and of FOS with HPBCD and RAMEB have been obtained and characterized using thin-layer chromatography, thermal methods, powder X-ray diffractometry, FTIR spectroscopy and phase solubility method.
7. The obtaining of binary systems ACE inhibitors/cyclodextrins have increased the solubility,

with favorable consequences on the bioavailability of the drug, and the stability of drug substances embedded into the cyclodextrin cavity.

8. The fosinopril study in accelerated testing conditions (temperature 40 ± 2 °C and RH $75 \pm 2\%$) highlights zero order kinetic decomposition reaction both in the case of light exposure and in its absence.
9. The kinetic studies under non-isothermal conditions, using the isoconversional Kissinger-Akahira-Sunose and Flynn-Wall-Ozawa methods indicate an average value of activation energy (E_a) corresponding to fosinopril decomposition process within the 120-250 °C temperature range of 206.433 kJ/mol.
10. The assessment of the inclusion complex FOS/HPBCD stability in the presence of excipients, using kinetic studies, has indicated lack of incompatibility between the excipients and the binary system.
11. The studies performed in this thesis and the results obtained herein can be a starting point of further researches for the development of new formulations containing fosinopril, with enhanced bioavailability.

SELECTIVE REFERENCES

1. Brown, J.N. and Vaughan, E.D. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, *Circulation*, 1998; 97: 1411-1420
2. Ferrar, R., Guardigli, G., Mele, D., Valgimigli, M., and Ceconi, C., Myocardial ischemia: new evidence for angiotensin - converting enzyme inhibition, *European Heart Journal Supplements*, 2003; 5 (Supplement E), E11–E17.
3. El Kawy, M. Abd., El Gindy, A.E., Hegazy, M., Shokry, E.S. Novel Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Two Binary Mixtures Containing Hydrochlorothiazide by Ratio Subtraction, *Journal of Applied Sciences Research*, 2010; 6(8): 918-926.
4. Carlucci, G., Di Federico, L., Iuliani, P. Simultaneous determination of zofenopril and hydrochlorothiazide in tablets using derivative UV spectrophotometry. *Analytical Letters*, 2010; 439 (16) : 2609-2617.
5. Ivanovic, D., Medenica, M., Jancic, B., Knezevic, N., Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril and their impurities, *Acta Chromatogr.*, 2007; 18: 143-156.
6. Ivanovic, D., Medenica, M., Jancic, B., Malenovic, A., Markovic, S. Chemometrical approach in fosinopril sodium and its degradation product fosinoprilat analysis, *Chromatographia*, 2004; Suppl. 60: S87–S92.
7. Saglik, A.S. Validated RP-LC method for simultaneous determination of of zofenopril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparation. *Journal of Chromatographic Science*, 2011; 49: 259-263.
8. Qin, W., Zhang, Z., Tian, Y., Xu, F., Wang N. and Chen, Y., Rapid quantification of lisinopril in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.*, 2007; 21: 415-421.
9. Shuangjin, C., Fang, F., Ming, M., Han, L., Yun, C. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of fosinopril and its active metabolite in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 2007; 854: 143–151.
10. Jiang, Y., Yan, F., Di B., Feng, F., You, L., Huang, L., Lu J. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of zofenopril and its active metabolite zofenoprilate in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011; doi:10.1016/j.jpba.2011.02.010.
11. Hinojosa-Torres, J., Aceves-Hernandez, J. M., Hijonosa-Torres, J., Paz, M., Castano, V.M., Esther Agacino-Valdes – Degradation of lisinopril: A physico-chemical study, *Journal of Molecular Structure*, 2008; 886: 51-58.

12. Kumar, V., Malik, S., Singh, S. Polypills for the treatment of cardiovascular diseases. Part 2. LC-MS/TOF characterisation of interaction/degradation products of atenolol/lisinopril and aspirin, and mechanism of formation thereof, *J Pharm Biomed Anal*, 2008; 48: 619–628.
13. Bharate, S.S., Bharate, S.B., Bajaj, A.N., Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J. Excipients and Food Chem.*, 2010; 1 (3): 3-26.
14. Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility technique. *Adv Anal Chem Instrum*, 1965; 4: 117–212.
15. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Fosinopril – cyclodextrin inclusion complexes: phase solubility and physicochemical analysis, *Pharmazie*, 2011; 66: 584-589.
16. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Sasca, V., Barvinschi, P., Bojiță, M. Characterization of fosinopril natrium-hydroxypropil-β-cyclodextrin inclusion complex, *Revista de Chimie*, 2011; 62 (3): 349-351.
17. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Thin-layer chromatography analysis for inclusion complexes of fosinopril and zofenopril with cyclodextrins, *Farmacia*, 2010; 58(4): 478–484
18. **Sbârcea L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Method validation for spectrophotometric of lisinopril in pharmaceuticals using copper sulphate, *Clujul Medical*, 2010; 83 (4): 625- 630.
19. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu C., Șoica, C., Bojiță, M. Thin-layer chromatographic studies of some angiotensin converting enzyme inhibitors and their inclusion complexes with β-cyclodextrin, *Studia Universitatis "Vasile Goldiș"*, Seria Științele Vieții, 2010; 20 (2): 35-38.
20. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., Szabadai, Z., Udrescu, L., Bojiță, M., The determination of lisinopril based on its complexation reaction with Cu²⁺ using spectrophotometric methods, *Farmacia*, 2007; 2: 165-170.
21. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Pătruțescu, C., Z., Bojiță, M. Guest-host system of fosinopril in hydroxypropyl-β-cyclodextrin: IR spectroscopy, X-ray powder diffraction and phase solubility studies, II European Cyclodextrin Conference, 2-4 oct. 2011, Asti, Italy, Abstract book, V P22.
22. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M., Spectrophotometric method for quantitative determination of lisinopril with ninhydrin, The XIV National Congress of Pharmacy, Târgu-Mureș, 13th–16th oct. 2010, *Acta Medica Marisiensis*, 2010; 56 (2): 33.

CURRICULUM VITAE

1. **Name, Surname:** Laura SBÂRCEA (born EFTIMIE)
2. **Date and place of birth:** 16.10.1974, Timișoara
3. **Nationality:** Romanian
4. **Marital status:** Married
5. **Email:** laura_sbarcea@yahoo.com
6. **Educational background:**
 - 2004-present** PhD student – “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy, scientific coordinator Prof. PhD. Marius Bojiță
 - 2003-2004** MA in Drug Study and Analysis – “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy
 - 2002** Specialist Pharmacist – General Pharmacy
 - 2000-2002** Resident Pharmacist - General Pharmacy
 - 1998** Bachelor of Pharmaceutical Sciences

1993-1998 “Victor Babeş” University of Medicine and Pharmacy Timișoara, Faculty of Pharmacy, valedictorian 1998

1993 Baccalaureate diploma

1989-1993 “Moise Nicoară” High School, Arad

7. Professional experience

2002-present Teaching assistant, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, “Victor Babeş” University of Medicine and Pharmacy, Timișoara

1999-2002 Assistant, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, “Victor Babeş” University of Medicine and Pharmacy, Timișoara

2004-2010 Pharmacist manager, SC HelpNet Pharma SA

1999-2004 Pharmacist, SC HelpNet Pharma SA

1998-1999 Probationer Pharmacist, SC HelpNet Pharma SA

8. Postuniversity studies

2006-2007 Attestation d’Homéopathie, Timișoara

2005 Therapeutical features in geriatrics, “Victor Babeş” University of Medicine and Pharmacy, (UMF)Timișoara

2004 News in pharmaceutical laws, Bucharest

2004 The novel pharmaceutical formulation, “Victor Babeş” UMF, Timișoara

2004 Controlled released systems of drug substances, “Victor Babeş” UMF, Timișoara

2002 The projection of the drugs, “Victor Babeş” UMF Timișoara

2002 Communication with the patient, “Victor Babeş” UMF, Timișoara

2002 Medicinal plants in allopathic and homeopathic therapy, “Victor Babeş” UMF, Timișoara

9. Member of professional associations

Member of the Romanian Society of Pharmaceutical Sciences

Member of Timiș Pharmacist College

10. Language skills: English, French

11. Scientific contribution

A. Scientific papers published in extenso in international journals

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Fosinopril – cyclodextrin inclusion complexes: phase solubility and physicochemical analysis, *Pharmazie*, 2011; 66: 584-589.

B. Scientific papers published in extenso in national journals

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Sasca, V., Barvinschi, P., Bojiță, M. Characterization of fosinopril natrium-hydroxypropil-β-cyclodextrin inclusion complex, *Revista de Chimie*, 2011; 62 (3): 349-351.
2. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Thin-layer chromatography analysis for inclusion complexes of fosinopril and zofenopril with cyclodextrins, *Farmacia*, 2010; 58(4): 478–484.
3. **Sbârcea L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Method validation for spectrophotometric determination of lisinopril in pharmaceuticals using copper sulphate, *Clujul Medical*, 2010; 83 (4): 625- 630.
4. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu C., Șoica, C., Bojiță, M. Thin-layer chromatographic studies of some angiotensin converting enzyme inhibitors and their inclusion complexes with β-cyclodextrin, *Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Life Sciencis Series*, 2010; 20 (2): 35-38.

5. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., Szabadai, Z., Udrescu, L., Bojiță, M., The determination of lisinopril based on its complexation reaction with Cu^{2+} using spectrophotometric methods, *Farmacia*, 2007; 2: 165-170.
6. Drăgan, L., **Sbârcea, L.**, The determination of the stability of enalapril maleate under the influence of the elementary package, *Timisoara Medical Journal*, 2006; 56 (2): 39-41.
7. Trandafirescu, C., Șoica, C., **Eftimie, L.**, Dehelean, C., Ciubotariu, D. Cyclooxygenase-2 inhibitors, *Medicine in Evolution*, 2003; 2 :73-76.

C. Scientific papers published in the book of international congresses

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Pătruțescu, C., Bojiță, M. Guest-host system of fosinopril in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: IR spectroscopy, X-ray powder diffraction and phase solubility studies, II European Cyclodextrin Conference, 2-4 oct. 2011, Asti, Italy, Abstract book: V P22.

D. Scientific papers published in the book of national congresses

1. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Szabadai, Z., Bojiță, M. Spectrophotometric method for quantitative determination of lisinopril with ninhydrin, , The XIV National Congress of Pharmacy, Târgu-Mureș, 13th-16th oct. 2010, Acta Medica Marisiensis, vol.56, sppl.2, p.33.
2. Trandafirescu, C., Gyeresi, A., Szabadai, Z., Aigner, Z., Kata, M., Popovici, M., **Sbârcea, L.** Study of interaction of cyclodextrins with albendazole, , The XIV National Congress of Pharmacy, Târgu-Mureș, 13th-16th oct. 2010, Acta Medica Marisiensis, vol.56, Sppl.2, p.38.
3. **Sbârcea, L.**, Udrescu, L., Drăgan, L., Trandafirescu, C., Șoica, C., Bojiță, M. Analysis of some angiotensin converting enzyme inhibitors and their inclusion complexes with β -cyclodextrin using thin-layer chromatography, „New challenges in pharmaceutical practice" The Oradea's Pharmaceutical Days, III Edition 8th-10th oct. 2009, book, Oradea University Publishing House, p.352-353.
4. Șoica, C., Cântă-Pânzaru, S., Dehelean, C., Ionescu, D., **Sbârcea, L.** The characterization of furosemide and chlorthalidone and their inclusion complexes with cyclodextrins using vibrational spectroscopy and X-ray diffractometry, „New challenges in pharmaceutical practice" The Oradea's Pharmaceutical Days, III Edition 8th-10th oct. 2009, book, Oradea University Publishing House, p. 354.
5. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., Szabadai, Z., Udrescu, L., Bojiță, M. Lisinopril determination based on its complexation reaction with Cu^{2+} ions using spectrophotometric methods, The XIII National Congress of Pharmacy, Cluj-Napoca 26th-28th sept. 2006, Romania, Abstract book, p. 105-106.

E. Published Courses/Practical Work Guides

1. Trandafirescu, C., **Sbârcea, L.**, *Pharmaceutical Chemistry. Anti-infective Drugs*, Mirton Publishing House Timișoara, ISBN 978-973-52-0978-0, 2011.
2. Drăgan, L., **Sbârcea, L.**, *Pharmaceutical Chemistry, Practical work guide, part I*, Mirton Publishing House Timișoara, ISBN 978-973-52-0190-6, 2007.
3. **Sbârcea, L.**, Drăgan, L., *Pharmaceutical Chemistry, Practical work guide, part II*, Mirton Publishing House Timișoara, ISBN 987-973-52-0799-1, 2010.
4. Drăgan, L., **Sbârcea, L.**, *Chemistry of the Drug - Practical work guide*, EUROBIT Publishing House Timisoara, ISBN 978-973-620-727-3, 2010.