

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Studiul interacțiunilor excipienți - antihipertensive în cadrul formelor farmaceutice cu eliberare modificată**

---

Doctorand **Anca Moisei**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Marius Bojiță**

---



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Considerații generale</b>	21
1.1. Reprezentanți ai unor clase de antihipertensive	21
1.1.1. Reprezentanți ai unor clase de antihipertensive - antagoniști ai angiotensinei II	21
1.1.2. Reprezentanți ai unor clase de antihipertensive – blocante ale canalelor de calciu	22
1.1.3. Reprezentanți unei clase de antihipertensive - diuretice	23
1.2. Farmacocinetica și farmacodinamia unor clase de antihipertensive	24
1.2.1. Farmacocinetica și farmacodinamia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive - antagoniști ai angiotensinei II	24
1.2.2. Farmacocinetica și farmacodinamia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive – blocante ale canalelor de calciu	24
1.2.3. Farmacocinetica și farmacodinamia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive - diuretice	24
1.3. Farmacoterapia	25
1.3.1. Farmacoterapia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive - antagoniști ai angiotensinei II	25
1.3.2. Farmacoterapia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive – blocante ale canalelor de calciu	25
1.3.3. Farmacoterapia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive - diuretice	25
1.4. Farmatotoxicologia	25
1.4.1. Farmatotoxicologia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive - antagoniști ai angiotensinei II	25
1.4.2. Farmatotoxicologia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive – blocante ale canalelor de calciu	26
1.4.3. Farmatotoxicologia unor reprezentanți ai clasei de antihipertensive - diuretice	26
<b>2. Caracterizarea fizico-chimică a excipienților și substanțelor medicamentoase în etapa de preformulare</b>	27
2.1. Excipienți – substanțe auxiliare utilizate în procesul de comprimare	27
2.2. Proprietăți fizico-chimice ale substanțelor medicamentoase	29
2.3. Preformularea	29
2.3.1. Proprietăți fundamentale ale substanțelor medicamentoase	29
2.3.2. Proprietăți derivate din structura chimică	30
2.4. Metode de studiu utilizate în etapa de preformulare	30
2.4.1. DSC – calorimetria cu scanare diferențiată	31
2.4.2. TG - termogravimetria	31
2.4.3. Difracția cu raze X	32
2.4.4. Spectroscopia de absorbție în IR	32
2.4.5. Spectroscopia NIR	33
2.4.6. Metode cromatografice	34
2.4.6.1. Cromatografia în strat subțire (CSS)	34
2.4.6.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)	34
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Obiective</b>	39
<b>2. Metodologie generală</b>	40

<b>3. Studiul 1 – Caracterizarea amlodipinei besilat</b>	43
3.1. Introducere	43
3.2. Obiective	43
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	45
3.4.1. Analiza termică și spectrală a amestecului Amlodipină/Croscarmeloză sodică	46
3.4.1.1. Analiza DSC a amestecului Amlodipină/Croscarmeloză sodică	46
3.4.1.2. Analiza TG a amestecului Amlodipină/Croscarmeloză sodică	47
3.4.1.3. Analiza IR a amestecului Amlodipină/Croscarmeloză sodică	49
3.4.1.4. Analiza NIR a amestecului Amlodipină/Croscarmeloză sodică	50
3.4.2. Analiza termică și spectrală a amestecului Amlodipină/Stearat de Magneziu	52
3.4.2.1. Analiza DSC a amestecului Amlodipină/Stearat de Magneziu	52
3.4.2.2. Analiza TG a amestecului Amlodipină/Stearat de Magneziu	53
3.4.2.3. Analiza IR a amestecului Amlodipină/Stearat de Magneziu	54
3.4.2.4. Analiza NIR a amestecului Amlodipină/Stearat de Magneziu	56
3.4.3. Analiza termică și spectrală a amestecului Amlodipină/Pigment Blend Red	57
3.4.3.1. Analiza DSC a amestecului Amlodipină/Pigment Blend Red	57
3.4.3.2. Analiza TG a amestecului Amlodipină/Pigment Blend Red	58
3.4.3.3. Analiza IR a amestecului Amlodipină/Pigment Blend Red	59
3.4.3.4. Analiza NIR a amestecului Amlodipină/Pigment Blend Red	60
3.5. Discuții	62
3.6. Concluzii	62
<b>4. Studiul 2 - Caracterizarea candesartanului</b>	65
4.1. Introducere	65
4.2. Obiective	65
4.3. Material și metodă	66
4.4. Rezultate	67
4.4.1. Analiza termică și spectrală a amestecului Candesartan/Aerosil	68
4.4.1.1. Analiza DSC a amestecului Candesartan/Aerosil	68
4.4.1.2. Analiza TG a amestecului Candesartan/Aerosil	69
4.4.1.3. Analiza IR a amestecului Candesartan/Aerosil	70
4.4.1.4. Analiza NIR a amestecului Candesartan/Aerosil	71
4.4.2. Analiza termică și spectrală a amestecului Candesartan /Celuloză Microcristalină	73
4.4.2.1. Analiza DSC a amestecului Candesartan /Celuloză Microcristalină	73
4.4.2.2. Analiza TG a amestecului Candesartan /Celuloză Microcristalină	74
4.4.2.3. Analiza IR a amestecului Candesartan /Celuloză Microcristalină	75
4.4.2.4. Analiza NIR a amestecului Candesartan /Celuloză Microcristalină	76
4.4.3. Analiza termică și spectrală a amestecului Candesartan /Pigment Blend Red	78
4.4.3.1. Analiza DSC a amestecului Candesartan /Pigment Blend	78

Red	
4.4.3.2. Analiza TG a amestecului Candesartan /Pigment Blend Red	79
4.4.3.3. Analiza IR a amestecului Candesartan /Pigment Blend Red	80
4.4.3.4. Analiza NIR a amestecului Candesartan /Pigment Blend Red	81
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	83
<b>5. Studiul 3 - Caracterizarea hidroclorotiazidei</b>	<b>85</b>
5.1. Introducere	85
5.2. Obiective	85
5.3. Material și metodă	86
5.4. Rezultate	87
5.4.1. Analiza termică și spectrală a amestecului Hidroclorotiazidă / Stearat de Magneziu	88
5.4.1.1. Analiza DSC a amestecului Hidroclorotiazidă / Stearat de Magneziu	88
5.4.1.2. Analiza TG a amestecului Hidroclorotiazidă / Stearat de Magneziu	89
5.4.1.3. Analiza IR a amestecului Hidroclorotiazidă / Stearat de Magneziu	90
5.4.1.4. Analiza NIR a amestecului Hidroclorotiazidă / Stearat de Magneziu	92
5.4.2. Analiza termică și spectrală a amestecului Hidroclorotiazidă / Croscarmeloză sodică	93
5.4.2.1. Analiza DSC a amestecului Hidroclorotiazidă / Croscarmeloză sodică	93
5.4.2.2. Analiza TG a amestecului Hidroclorotiazidă / Croscarmeloză sodică	94
5.4.2.3. Analiza IR a amestecului Hidroclorotiazidă / Croscarmeloză sodică	95
5.4.2.4. Analiza NIR a amestecului Hidroclorotiazidă / Croscarmeloză sodică	97
5.4.3. Analiza termică și spectrală a amestecului Hidroclorotiazidă /Pigment Blend Red	98
5.4.3.1. Analiza DSC a amestecului Hidroclorotiazidă /Pigment Blend Red	98
5.4.3.2. Analiza TG a amestecului Hidroclorotiazidă /Pigment Blend Red	99
5.4.3.3. Analiza IR a amestecului Hidroclorotiazidă /Pigment Blend Red	100
5.4.3.4. Analiza NIR a amestecului Hidroclorotiazidă /Pigment Blend Red	102
5.5. Discuții	103
5.6. Concluzii	103
<b>6. Studiul 4 - Dezvoltarea și validarea unei metode HPLC pentru determinarea simultană a candesartanului, amlodipinei și hidroclorotiazidei dintr-o formă farmaceutică combinată</b>	<b>105</b>
6.1. Introducere	105
6.2. Obiective	105
6.3. Material și metodă	105
6.4. Rezultate	108
6.4.1. Dezvoltarea metodei	108
6.4.2. Optimizarea metodei	109
6.5. Discuții	117
6.6. Concluzii	118

<b>7. Discuții generale</b>	119
<b>8. Concluzii generale</b>	121
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	123
<b>REFERINȚE</b>	125

**CUVINTE CHEIE:** amlodipină, candesartan, hidroclorotiazidă, analize termice, analize spectrale, dozare simultană, HPLC

# INTRODUCERE

Dezvoltarea formelor farmaceutice orale cu eliberare modificată ce conțin una sau mai multe substanțe active constituie un domeniu de mare actualitate al cercetării, deoarece reprezintă o alternativă terapeutică mai eficientă comparativ cu formele convenționale sau formele cu eliberare imediată. Avantejele pe care le prezintă aceste tipuri de formulări realizate prin asocierea unor substanțe care acționează sinergic -obținerea evidentă a unor rezultate terapeutice superioare administrării singulare a substanțelor asociate, sunt determinate de utilizarea tot mai diversă de excipienți precum și de posibilitatea de dezvoltare a unor tehnologii corespunzătoare pentru o utilizare mai bună a substanței medicamentoase în practica clinică.

Terapia asociată cu blocante ale canalelor de calciu, blocante ale angiotensinei II și diuretice este recomandată ca una dintre cele mai eficiente și des utilizată în tratamentul hipertensiunii arteriale.

## Obiective

În cadrul studiului doctoral s-a efectuat investigarea calitativă a interacțiunilor dintre substanțe active anihipertensive și posibili excipienți, pentru ghidarea procesului de preformulare a unui comprimat triplustratificat, cu cedare modificată care să conțină o combinație fixă, respectând regulile de buna practică de fabricație și de laborator.

În vederea determinării cantitative și calitative s-a dezvoltat o metodă cromatografică de lichide (HPLC) care să permită dozarea simultană a celor trei substanțe active din amestec și din comprimate.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În prima parte a tezei este prezentată o sinteză a datelor din literatură cu privire la metodele de analiză fizico-chimică a substanțelor medicamentoase și a excipienților în etapa de preformulare.

Conform literaturii de specialitate o primă etapă în dezvoltarea farmaceutică a unui medicament constă în studierea proprietăților fundamentale ale substanței medicamentoase precum și a unor proprietăți derivate ale moleculei. Se efectuează studii privind compatibilitatea substanței medicamentoase cu excipienții prin analize termice și spectrale.

Studiile privind interacțiunile dintre substanța medicamentoasă și excipienți sunt esențiale pentru prevenirea instabilității produsului medicamentos, informațiile obținute fiind utile în dezvoltarea ulterioară (dezvoltare tehnologică, dezvoltare analitică, studii de stabilitate).

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### Introducere

În cadrul primelor trei studii s-a efectuat o evaluare a compatibilității și a stabilității dintre amlodipină, candesartan, hidroclorotiazidă și excipienți, prin metode termice și spectrale utilizate frecvent în industria farmaceutică.

Analizele au fost efectuate pe substanțele medicamentoase antihipertensive și excipienții selectați, individual, apoi pe amestecurile binare substanță activă-excipient în raport de combinare 1:1 (m/m).

Pentru a obține informații cu privire la compatibilitatea dintre substanțele medicamentoase și excipienții selectați, precum și despre stabilitatea lor în timp, s-au păstrat probele la camerele climatice, în condiții normale de temperatură și umiditate (25°C și umiditate 60%) și în condiții de degradare accelerată (40°C și umiditate 75%) și au fost analizate la o lună, 2 luni, 3 luni, 6 luni și 12 luni prin patru metode analitice.

### Materiale și metode

Analiza termică a comportamentului substanțelor medicamentoase antihipertensive, amlodipină, candesartan, hidroclorotiazidă și a excipienților, precum și a amestecurilor binare s-a realizat cu analizatorul DSC – Calorimetru Diferențial de tipul DSC 200F3 Maia Netzsch prin expunerea la temperatura de 25-400°C în atmosfera dinamică de N<sub>2</sub> (purjare cu un debit de 50 mL/min), iar viteza de încălzire a fost 10°C/min folosind creuzeți de aluminiu. Prelucrarea și interpretarea termogramelor s-au efectuat prin programul Netzsch.

La analiza TG, termogravimetrul utilizat a fost de tipul TGA-TG 209F3 Maia Netzsch, iar prelucrarea și interpretarea termogramelor s-au efectuat prin programul Netzsch. Probele au fost expuse la temperatura 30-700°C. S-a utilizat atmosfera dinamică de N<sub>2</sub> (purjare cu un debit de 20 mL/min), viteza de încălzire a fost 10°C/min. folosind creuzeți de aluminiă.

Analizele spectrale au fost efectuate cu spectrometrul IR de tipul Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Scientific, SUA), iar spectrele rezultate au fost prelucrate prin programul Omnic (Thermo Scientific, SUA).

Spectrometrul NIR utilizat a fost de tipul Antaris FT-NIR Analyzer (Thermo Scientific, SUA), iar spectrele au fost prelucrate prin programul Antaris (Thermo Scientific, SUA).

Colectarea spectrelor IR s-a efectuat pe domeniul spectral: 400-4000 cm<sup>-1</sup>, rezoluția spectrelor: 2 cm<sup>-1</sup>, s-a făcut o medie a 32 colectări de spectre individuale;

Colectarea spectrelor NIR s-a efectuat pe domeniul spectral: 4000-10000 cm<sup>-1</sup> domeniul spectral: 4000-10000 cm<sup>-1</sup>, rezoluția spectrelor: 2 cm<sup>-1</sup> s-a făcut o medie a 32 colectări de spectre individuale.

Fiecare spectru prezintă transmitanța T(%) în funcție de numărul de undă (cm<sup>-1</sup>)

S-a efectuat, inițial, analiza substanțelor medicamentoase și a excipienților individual apoi s-a trecut la amestecurile binare. S-a continuat cu studierea comportamentului amestecurilor binare în timp, la o lună, 2, 3, 6, 12 luni, după ce acestea au fost păstrate în camere climatice în condiții normale de temperatură și umiditate (25°C și umiditate 60%) și în condiții de degradare accelerată (40°C și umiditate 75 %).

Camere climatice MMM MEDCENTER Model: CLC 707 Seria: B100992 (condiții normale) , Seria: B100991 (condiții accelerate).

Cântărirea probelor s-a efectuat la balanță analitică Excellence Plus 5 zecimale XP205T Mettler Toledo

## Rezultate

### Studiu 1. Amlodipina besilat

Prin compararea datelor obținute din termogramele DSC și TG, ale amestecurilor binare amlodipină cu cei trei excipienți selectați (crosscarmeloză sodică, stearat de magneziu, pigment blend red), analizate la o lună, 2, 3, 6, 12 luni se observă că acestea sunt apropiate de datele obținute din termogramele inițiale la T<sub>0</sub>.

Spectrele IR ale combinațiilor binare amlodipină/excipienți, prezintă benzi de absorbție caracteristice grupărilor funcționale din structura amlodipinei, care se regăsesc nemodificate la analiza spectrelor pentru timpii studiați, în condiții normale de temperatură și umiditate, cât și pentru condiții de degradare accelerată. Pic-urile caracteristice amlodipinei: 2820 cm<sup>-1</sup>, bandă de absorbție specifică grupării-C=N respectiv -NH<sub>2</sub>, 1870, 1488 cm<sup>-1</sup> pentru gruparea -C=N, 1300, 1201 cm<sup>-1</sup>.

### Studiu 2. Candesrtan cilexetil

Termogramele inițiale (T<sub>0</sub>) DSC și TG obținute la analiza amestecurilor binare candesartan/celuloza microcristalină, dioxid de siliciu coloidal, pigment blend red au fost interpretate și comparate cu cele obținute la timpii analizați, după ce probele au fost păstrate în camerele climatice. Prin compararea valorilor termice obținute pe substanțele active pure, pe excipienți și pe amestecurile binare se evidențiază faptul că există compatibilitate.

Spectrele IR ale probelor studiate prezintă benzi de absorbție caracteristice candesartanului 2840, 1760, 1715, 1648, 1328, 1284 cm<sup>-1</sup> ce corespund structurii aromatice C-H, C=O din ester, C=O din acid, C-N, -C-O- ester.

Spectrele NIR prezintă pe domeniul 4000-4400 cm<sup>-1</sup> benzi de absorbție dominante ce se datorează legăturilor C-C, C-H, iar în zona de absorbție 4400-4700 cm<sup>-1</sup> principalele benzi se datorează structurii chimice ale moleculei de candesartan, benzi care se regăsesc și în spectrele amestecurilor binare

Prin analiza spectrelor IR și NIR obținute în acest studiu cu ajutorul dispozitivului ATR s-a urmărit similitudinea benzilor specifice ce se traduc prin maxime de absorbție specifice fiecărei combinații la toți timpii studiați.

### Studiu 3. Hidroclorotiazida

În urma analizării termogramelor DSC și TG prin compararea valorilor parametrilor termici înregistrați se observă că fiecare din substanțele analizate se regăsesc nemodificate în amestecuri, ceea ce indică faptul că nu există interacțiuni majore între acestea și excipienții testați.

Spectrul IR al hidroclorotiazidei analizate individual prezintă benzi caracteristice corespunzătoare vibrațiilor de valență ale grupărilor funcționale din structura sa chimică, benzile de absorbție specifice 3359, 3261, 3163, 1518, 1462, 1274, 1057  $\text{cm}^{-1}$  se regăsesc și în amestecurile binare studiate.

Spectrul NIR obținut pe domeniul 4000-4400  $\text{cm}^{-1}$  este dominat de benzile datorate legăturilor C-C, C-H, iar pe domeniul 4400-4700  $\text{cm}^{-1}$  benzile de absorbție specifice se datorează grupărilor din structura chimică a hidroclorotiazidei.

## **Studiu 4. Dezvoltarea și validarea unei metode HPLC pentru determinarea simultană a candesartanului, amlodipinei și hidroclorotiazidei dintr-o formă farmaceutică combinată**

### **Introducere**

Literatura de specialitate prezintă doar câteva metode care permit determinarea simultană a candesartanului și a hidroclorotiazidei, dar nu s-a dezvoltat până în prezent nicio metodă de determinare simultană a trei antihipertensive candesartan, hidroclorotiazidă și amlodipină din amestec.

În acest studiu mi-am propus dezvoltarea și optimizarea unei metode analitice HPLC-UV care să permită separarea candesartanului, amlodipinei și hidroclorotiazidei din amestecuri și forme farmaceutice.

### **Material și metodă**

Aparat HPLC cu sistem de prelucrare date model 1200 serie/ChemStation for LC 3D systems vers. B 04.02, producător Agilent Technologies.

Coloană cromatografică: Zorbax SB C18, 250 mm X 4,6 mm, diametrul particulelor 5  $\mu\text{m}$ ., temperatura coloanei : 25°C, debit: 1ml/min., detecție: UV, la 240 și 270 nm., timpul de rulare : 10 minute.

Faza mobilă compusă din acetat de sodiu 0,01 M (s-au dizolvat 0,41 g acetat de sodiu în 500 mL apă purificată, ajustată la pH 3,5 cu acid acetic glacial) și metanol (15:85 v/v) a fost preparată, apoi filtrată și sonicată 10 minute pentru degazare.

### **Rezultate**

Deoarece literatura de specialitate prezintă unele metode pentru o determinare simultană a candesartanului cu hidroclorotiazida, în cadrul studiului a fost realizată o metodă HPLC-UV, care permite dozarea simultană pentru o combinație care are în plus amlodipina. S-au ales două lungimi de undă datorită faptului că hidroclorotiazida are un maxim de absorbție la 270 nm, în timp ce amlodipina prezintă un maxim de absorbție la 237 nm, iar candesartanul are maxim de absorbție la 202 nm.

Metoda a fost validată, prezintă liniaritate pe domeniul 70-120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , coeficienții de corelare au fost: pentru amlodipină  $R^2 = 0,998$ , pentru candesartan  $R^2 = 0,998$  și pentru hidroclorotiazidă  $R^2 = 0,999$ . Procentul de recuperare pentru fiecare analit s-a încadrat în intervalul impus, cuprins între 98.0% - 102.0%.

Metoda realizată a fost validată și permite determinarea simultană cantitativă a amlodipinei, candesartanului și hidroclorotiazidei din substanțe farmaceutice active și din preparate farmaceutice.

### **Concluzii generale**

Obiectivul principal al cercetării propuse în cadrul tezei de doctorat a fost studierea interacțiunilor dintre substanțe medicamentoase antihipertensive și excipienți în cadrul formelor farmaceutice cu cedare modificată, ce ar putea face posibilă realizarea unui comprimat triplustrat cu cedare modificată, ce conține o combinație fixă.

În acest scop s-au selectat trei antihipertensive mult utilizate în terapia cardiovasculară și anume Amlodipină, Candesartan și Hidroclorotiazidă.

Pornind de la aceste considerente s-au efectuat analize fizico-chimice specifice etapei de preformulare utilizând metode de analiză termice și spectrale, în vederea obținerii de informații despre comportamentul, compatibilitatea și stabilitatea substanțelor active și a excipienții selectați.

Analizele termice DSC (analiza termică diferențială) și TG (analiza termogravimetrică) au oferit informații despre identitatea și stabilitatea amestecurilor binare prin suprapunerea termogramelor și compararea



parametrilor temici obținuți în cazul probelor păstrate în camere climatice, cu amestecul inițial considerat de referință. Pentru confirmarea stabilității și a eventualelor interacțiuni s-au folosit tehnicile de analiză spectrală FTIR și NIR (spectrometrie în infraroșu și infraroșu apropiat) care au demonstrat că nu apar modificări semnificative, iar substanțele și excipienții selectați sunt compatibili.

În vederea determinării simultane a celor trei substanțe antihipertensive din amestec și forme farmaceutice, s-a dezvoltat și validat o metodă cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță HPLC .

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

# **Study of the interactions between excipients and antihypertensives in modified-release dosage pharmaceutical formulations**

---

Ph.D. Candidate **Anca Moisei**

---

Doctoral Thesis Supervisor **Prof. Marius Bojiță, Ph.D**

---



# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>CURRENT STATUS OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. General Considerations</b>	21
1.1. Representatives of Certain Classes of Antihypertensives	21
1.1.1. Representatives of Certain Classes of Antihypertensives – Angiotensin II Antagonists	21
1.1.2. Representatives of Certain Classes of Antihypertensives – Calcium Channels Blockers	22
1.1.3. Representatives of Certain Classes of Antihypertensives – Diuretics	23
1.2. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Certain Antihypertensive Classes	24
1.2.1. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Representatives of Antihypertensive Class – Angiotensin II Antagonists	24
1.2.2. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Representatives of Antihypertensive Class – Calcium Channel Blockers	24
1.2.3. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Representatives of Antihypertensive Class – Diuretics	24
1.3. Pharmacotherapy	25
1.3.1. Pharmacotherapy of Representatives of Antihypertensive Class - Angiotensin II Antagonists	25
1.3.2. Pharmacotherapy of Representatives of the Antihypertensive Class – Calcium Channel Blockers	25
1.3.3. Pharmacotherapy of Representatives of the Antihypertensive Class – Diuretics	25
1.4. Pharmatotoxicology	25
1.4.1. Pharmatotoxicology of Representatives of the Antihypertensive Class - Angiotensin II Antagonists	25
1.4.2. Pharmatotoxicology of Representatives of the Antihypertensive Class – Calcium Channels Blockers	26
1.4.3. Pharmatotoxicology of Representatives of the Antihypertensive Class – Diuretics	26
<b>2. Physicochemical Characterization of Excipients and Medicinal Substances in the Preformulation Stage</b>	27
2.1. Excipients – Auxiliary Substances Used in the Compression Process	27
2.2. Physicochemical Characteristics of the Medicinal Substances	29
2.3. Preformulation	29
2.3.1. Fundamental Properties of Medicinal Substances	29
2.3.2. Properties Derived from the Chemical Structure	30
2.4. Study Methods Used in the Preformulation Stage	30
2.4.1. DSC – Differential Scanning Calorimetry	31
2.4.2. TG - Thermogravimetry	31
2.4.3. X-Ray Diffraction	32
2.4.4. Infrared Spectroscopy	32
2.4.5. NIR Spectroscopy	33
2.4.6. Chromatographic Methods	34
2.4.6.1. Thin Layer Chromatography (TLC)	34
2.4.6.2. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Objectives</b>	39

<b>2. General Methodology</b>	40
<b>3. Study no 1 – Characterization of Amlodipine Besylate</b>	40
3.1. Introduction	40
3.2. Objectives	
3.3. Material and Methodology	43
3.3.1. Material	43
3.3.2. Methodology	43
3.4. Results	44
3.4.1. Thermal and Spectral Analysis of the Amlodipine/Croscarmellose Sodium Mixture	45
3.4.1.1. DSC Analysis of the Amlodipine/Croscarmellose Sodium Mixture	46
3.4.1.2. TG Analysis of the Amlodipine/Croscarmellose Sodium Mixture	46
3.4.1.3. IR Analysis of the Amlodipine/Croscarmellose Sodium Mixture	47
3.4.1.4. NIR Analysis of the Amlodipine/Croscarmellose Sodium Mixture	49
3.4.2. Thermal and Spectral Analysis of the Amlodipine/Magnesium Stearate Mixture	50
3.4.2.1. DSC Analysis of the Amlodipine/Magnesium Stearate Mixture	52
3.4.2.2. TG Analysis of the Amlodipine/Magnesium Stearate Mixture	52
3.4.2.3. IR Analysis of the Amlodipine/Magnesium Stearate Mixture	53
3.4.2.4. NIR Analysis of the Amlodipine/Magnesium Stearate Mixture	54
3.4.3. Thermal and Spectral Analysis of the Amlodipine/ Blend Red Pigment Mixture	56
3.4.3.1. DSC Analysis of the Amlodipine/ Blend Red Pigment Mixture	57
3.4.3.2. TG Analysis of the Amlodipine/ Blend Red Pigment Mixture	57
3.4.3.3. IR Analysis of the Amlodipine/ Blend Red Pigment Mixture	58
3.4.3.4. NIR Analysis of the Amlodipine/ Blend Red Pigment Mixture	59
3.5. Discussions	60
3.6. Conclusions	62
<b>4. Study no 2 – Characterization of Candesartan</b>	65
4.1. Introduction	65
4.2. Objectives	65
4.3. Material and Methodology	66
4.3.1. Material	67
4.3.2. Methodology	68
4.4. Results	68
4.4.1. Thermal and Spectral Analysis of the Candesartan/Aerosil Mixture	68
4.4.1.1. DSC Analysis of the Candesartan/Aerosil Mixture	68
4.4.1.2. TG Analysis of the Candesartan/Aerosil Mixture	69
4.4.1.3. IR Analysis of the Candesartan/Aerosil Mixture	70
4.4.1.4. NIR Analysis of the Candesartan/Aerosil Mixture	71
4.4.2. Thermal and Spectral Analysis of the Candesartan /Microcrystalline Cellulose Mixture	73
4.4.2.1. DSC Analysis of the Candesartan /Microcrystalline Cellulose Mixture	73
4.4.2.2. TG Analysis of the Candesartan /Microcrystalline Cellulose Mixture	74
4.4.2.3. IR Analysis of the Candesartan /Microcrystalline	75

Cellulose Mixture	
4.4.2.4. NIR Analysis of the Candesartan /Microcrystalline Cellulose Mixture	76
4.4.3. Thermal and Spectral Analysis of the Candesartan /Blend Red Pigment Mixture	78
4.4.3.1. DSC Analysis of the Candesartan /Blend Red Pigment Mixture	78
4.4.3.2. TG Analysis of the Candesartan /Blend Red Pigment Mixture	79
4.4.3.3. IR Analysis of the Candesartan /Blend Red Pigment Mixture	80
4.4.3.4. NIR Analysis of the Candesartan /Blend Red Pigment Mixture	81
4.5. Discussions	83
4.6. Conclusions	83
<b>5. Study no 3 – Characterization of Hydrochlorothiazide</b>	<b>85</b>
5.1. Introduction	85
5.2. Objectives	85
5.3. Material and Methodology	86
5.4. Results	87
5.4.1. Thermal and Spectral Analysis of the Hydrochlorothiazide/Magnesium Stearate Mixture	88
5.4.1.1. DSC Analysis of the Hydrochlorothiazide/Magnesium Stearate Mixture	88
5.4.1.2. TG Analysis of the Hydrochlorothiazide/Magnesium Stearate Mixture	89
5.4.1.3. IR Analysis of the Hydrochlorothiazide/Magnesium Stearate Mixture	90
5.4.1.4. NIR Analysis of the Hydrochlorothiazide/Magnesium Stearate Mixture	92
5.4.2. Thermal and Spectral Analysis of the Hydrochlorothiazide/Croscarmellose Sodium Mixture	93
5.4.2.1. DSC Analysis of the Hydrochlorothiazide/Croscarmellose Sodium Mixture	93
5.4.2.2. TG Analysis of the Hydrochlorothiazide/Croscarmellose Sodium Mixture	94
5.4.2.3. IR Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Croscarmellose Sodium Mixture	95
5.4.2.4. NIR Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Croscarmellose Sodium Mixture	97
5.4.3. Thermal and Spectral Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Blend Red Pigment Mixture	98
5.4.3.1. DSC Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Blend Red Pigment Mixture	98
5.4.3.2. TG Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Blend Red Pigment Mixture	99
5.4.3.3. IR Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Blend Red Pigment Mixture	100
5.4.3.4. NIR Analysis of the Hydrochlorothiazide/ Blend Red Pigment Mixture	102
5.5. Discussions	103
5.6. Conclusions	103
<b>6. Study no 4 – Development and Validation of a HPLC Method for the Simultaneous Determination of Candesartan, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in a Combined Pharmaceutical Formulation</b>	<b>105</b>
6.1. Introduction	105
6.2. Objectives	105
6.3. Material and Methodology	105
6.4. Results	108
6.4.1. Method development	108
6.4.2. Optimization method	109

6.5. Discussions	117
6.6. Conclusions	118
<b>7. General Discussions</b>	119
<b>8. General Conclusions</b>	121
<b>9. Originality and Innovative Contributions of the Thesis</b>	123
<b>REFERENCES</b>	125

**KEY WORDS:** Amlodipine, Candesartan, Hydrochlorothiazide, thermal analyses, spectral analyses, simultaneous dosage, HPLC

## **INTRODUCTION**

The development of oral modified-release pharmaceutical formulations containing one or more active substances is a research area of great interest nowadays, because this is a more effective therapeutic alternative compared to the conventional or the immediate release formulations. The advantages posed by these types of formulations achieved by associating substances that act synergistically - the obvious achievement of superior therapeutic outcomes with a single-administration of the associated substances -, are determined by the increasingly diverse use of excipients and the possibility of developing appropriate technologies for a better use of the medical substance in the clinical practice.

The associated therapy with Calcium channel blockers, Angiotensin II blockers and diuretics is recommended as one of the most efficient and frequently used therapies of treating arterial hypertension.

### **Objectives**

The doctoral study conducts a qualitative investigation of the interactions between the antihypertensive active substances and the possible excipients, in order to guide the process of preformulating a modified release triple-layer tablet which should contain a fixed combination, observing the good manufacturing and laboratory practice.

In order to determine the appropriate quantity and quality, a liquid chromatographic method was developed (HPLC) which will enable the simultaneous dosage of the three active substances in the mixture and the tablets.

## **PRESENT STATUS OF KNOWLEDGE**

The first part of the thesis presents a summary of the literature on the methods of physically and chemically analyzing the medicinal substances and the excipients in the preformulation stage.

According to the literature, the first step in the pharmaceutical development of a medicine is to study the fundamental properties of the medicinal substance and the derived properties of the molecule. Studies on the compatibility of the medicinal substance with the excipients are conducted through thermal and spectral analyzes.

The studies regarding the interactions between the medicinal substance and the excipients are essential in order to prevent the instability of the medicinal product, the information obtained being useful for the further development (technological development, analytical development, stability studies).

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Introduction**

The first three studies cover an evaluation of the compatibility and stability between the Amlodipine, the Candesartan, the Hydrochlorothiazide and the excipients, through thermal and spectral methods commonly used in the pharmaceutical industry.

The analyses were performed on the antihypertensive medical substances and the selected excipients individually, then on the binary mixtures consisting of the active substance and the excipient in a combination ratio of 1:1 (m/m).

In order to obtain information regarding the compatibility between the medicinal substances and the selected excipients, and their stability over time, the samples were kept in the climate chambers under normal temperature and humidity conditions (25°C and 60% humidity) and under accelerated degradation conditions (40°C and 75% humidity) and were analyzed after one month, 2 months, 3 months, 6 months and 12 months by four analytical methods.

### **Material and Methodology**

The thermal analysis of the behavior of the antihypertensive medicinal substances, Amlodipine, Candesartan, Hydrochlorotiazide and of the excipients, as well as that of the binary mixtures, was conducted with the DSC– Differential Scanning Calorimeter analyzer, type DSC 200F3 Maia Netzsch by exposure to a temperature of 25-400°C, dynamic atmosphere N<sub>2</sub> (purge at a flow rate of 50 mL/min), the heating speed was 10°C/min using alumina crucibles. The processing and interpretation of the thermograms was carried out in the Netzsch program.

For the TG analysis, the thermal analysis system used was TGA-TG 209F3 Maia Netzsch, and the processing and interpretation of the thermograms was conducted in the Netzsch program. The samples were exposed to a temperature of 30-700°C, the dynamic atmosphere N<sub>2</sub> was used (purge with a flow of 20 mL/min), and the heating speed was 10°C/min. using alumina crucibles.

The spectral analyses were conducted with the IR spectrometer Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Scientific, USA), and the resulting spectra were processed in the Omnic program (Thermo Scientific, USA).

The NIR spectrometer that was used was an Antaris FT-NIR Analyzer (Thermo Scientific, USA), and the spectra were processed in the Antaris program (Thermo Scientific, USA).

Collecting the IR spectra was performed on the 400-4000 cm<sup>-1</sup> spectral range, and the spectral resolution was: 2 cm<sup>-1</sup>, there was an average of 32 collections of individual spectra;

The NIR spectra were collected on the spectral range: 4000-10000 cm<sup>-1</sup>, the spectral resolution being: 2 cm<sup>-1</sup>; there was an average of 32 collections of individual spectra.

Each spectrum shows the transmittance T(%) according to the wavenumber (cm<sup>-1</sup>)

Initially, the analysis of the medical substances and of the excipients was performed individually and then we switched to the binary mixtures. The behavior of the binary mixtures was studied over time, after one month, 2, 3, 6, 12 months, after they were kept in the climate chambers under normal conditions of temperature and humidity (25°C and 60% humidity) and under accelerated degradation conditions (40°C and 75 % humidity).

We used the MMM MEDCENTER climate chambers Model: CLC 707 Series: B100992 (normal conditions), Series: B100991 (accelerated conditions).

The samples were weighed with the 5-digit Excellence Plus XP205T Mettler Toledo analytical balance.

## Results

### Study no 1. Amlodipine Besylate

By comparing the data obtained from the DSC and TG thermograms for the binary mixtures Amlodipine and the three selected excipients (Croscarmellose Sodium, Magnesium Stearate, Blend Red Pigment), analyzed after one month, 2, 3, 6, 12 months, it is observed that these are similar with the data obtained from the initial thermograms at T<sub>0</sub>.

The IR spectra of the binary combinations Amlodipine/excipients show absorption bands characteristic to the functional groups in the structure of the Amlodipine, which are unmodified in the analysis of the spectra for the studied times, under normal conditions of temperature and humidity, as well as under the accelerated degradation conditions. The peaks characteristic to the Amlodipine: 2820 cm<sup>-1</sup>, the absorption band specific to group -C=N respectively -NH<sub>2</sub>, 1870, 1488 cm<sup>-1</sup> for the group -C=N, 1300, 1201 cm<sup>-1</sup>.

### Study no 2. Candesartan Cilexetil

The initial DSC and TG thermograms (T<sub>0</sub>) obtained from analyzing the binary mixtures Candesartan/Microcrystalline Cellulose, Colloidal silicon dioxide, Blend red pigment, were processed and compared with those obtained at the analyzed times, after the samples have been kept in the climate chambers. By comparing the thermal values obtained on the pure active substances, on the excipients and on the binary mixtures, it is obvious that there is compatibility.

The IR spectra of the studied samples show absorption bands characteristic to Candesartan 2840, 1760, 1715, 1648, 1328, 1284 cm<sup>-1</sup> which correspond to the aromatic structure C-H, C=O from Ester, C=O from Acid, C-N, -C-O- Ester.

The NIR spectra show on the 4000-4400 cm<sup>-1</sup> range, dominant absorption bands which are caused by the C-C, C-H links, and in the 4400-4700 cm<sup>-1</sup> absorption area, the main bands are due to the chemical structure of the Candesartan molecule, and these bands are also present in the spectra of the binary mixtures.



The analysis of the IR and NIR spectra obtained in this research by means of the ATR device was focused on observing the similarity of the specific bands which translate into absorption maxima specific to each combination at all studied times.

### **Study no 3. Hydrochlorothiazide**

After analyzing the DSC and TG thermograms by comparing the values of the recorded thermal parameters, it can be observed that each of the analyzed substance are unmodified in the mixtures, which indicates that there are no major interactions between them and the tested excipients.

The IR spectra of the individually analyzed Hydrochlorothiazide shows specific bands corresponding to the valence vibrations of the functional groups in its chemical structure, the following specific absorption bands are also found in the studied binary mixtures: 3359, 3261, 3163, 1518, 1462, 1274, 1057  $\text{cm}^{-1}$ .

The NIR spectrum obtained in the range 4000-4400  $\text{cm}^{-1}$  is dominated by the bands due to the C-C, C-H links and in the range 4400-4700  $\text{cm}^{-1}$ , the specific absorption bands are due to the groups in the chemical structure of the Hydrochlorothiazide.

## **Study no 4. Development and Validation of a HPLC Method for the Simultaneous Determination of Candesartan, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in a Combined Pharmaceutical Formulation**

### **Introduction**

The literature presents a few methods that allow simultaneous determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide but no method has been developed so far for simultaneously determining three antihypertensives: Candesartan, Hydrochlorothiazide and Amlodipine in the mixture.

In this study, we intend to develop and optimize a HPLC-UV analytical method which will allow the separation of Candesartan, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in pharmaceutical mixtures and formulations.

### **Material and Methodology**

We used the data processing HPLC system model 1200 series/ChemStation for LC 3D systems vers. B 04.02, produced by Agilent Technologies.

Chromatographic column: Zorbax SB C18, 250 mm X 4,6 mm, particle diameter 5  $\mu\text{m}$ ., temperature of the column : 25°C, flow: 1ml/min., detection: UV,  $\lambda$  240 and 270 nm., run time: 10 minutes.

The mobile phase was composed of Sodium acetate 0.01 M (0.41 g Sodium acetate was dissolved in 500 mL purified water, adjusted at a pH of 3.5 with glacial acid) and Methanol (15:85 v/v); after preparation, it was filtered and sonicated for 10 minutes in order to be degasified.

### **Results**

Since the literature presents some methods for the simultaneous determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide, in this study, a HPLC-UV method was developed that allows simultaneous dosage for a combination that also has Amlodipine. Two wavelengths were selected because the Hydrochlorothiazide has an absorption maximum at 270 nm, while the Amlodipine shows an absorption maximum at 237 nm and the Candesartan has the absorption maximum at 202 nm.

The method was validated, it shows linearity in the range 70-120  $\mu\text{g}/\text{m}$ , the correlation coefficients were: for Amlodipine  $R^2 = 0.998$ , for Candesartan  $R^2 = 0.998$  and for Hydrochlorothiazide  $R^2 = 0.999$ . The percent recovery for each analyte fell within the imposed range, between 98.0% and 102.0%.

The method has been validated and enables the simultaneous quantitative determination of Amlodipine, Candesartan and Hydrochlorothiazide in the active pharmaceutical substances and pharmaceutical preparations.

### **General Conclusions**

The main objective of the research conducted within the doctoral thesis was to study the interactions between the antihypertensive medicinal substances and the excipients in modified release pharmaceutical preparations, which could enable the achievement of a triple-layer modified release tablet containing a fixed combination.

For this purpose, we selected three antihypertensives widely used in the cardiovascular therapy, namely Amlodipine, Candesartan and Hydrochlorothiazide.

Based on these considerations we conducted physicochemical analyses specific to the preformulation stage using thermal and spectral analysis methods in order to obtain data about the behavior, the compatibility and the stability of the active substances and of the selected excipients.

The DSC thermal analysis (differential thermal analysis) and the TG analysis (thermogravimetric analysis) provided information on the identity and the stability of the binary mixtures by overlapping the thermograms and comparing the obtained thermal parameters in the case of the samples kept in the climatic chambers, with the initial mixture considered to be the reference. In order to confirm the stability and the possible interactions, we used spectral analysis techniques like FTIR and NIR (infrared and near infrared spectrometry) which showed that there are no significant changes and that the substances and the selected excipients are compatible.

In order to determine simultaneously the right dosage of the three antihypertensive substances in the mixture and in the pharmaceutical forms, a new method has been developed and validated by means of the high performance liquid chromatography HPLC.