



GRIGORE T. POPA UNIVERSITY OF
MEDICINE AND PHARMACY IASI

HABILITATION THESIS

Abstract

***RESEARCH AND CONTRIBUTIONS
IN THE FIELD OF ANALYTICAL CHEMISTRY
AND PHARMACEUTICAL ANALYSIS***

Associate Professor Mihai Apostu, PhD

**Iași
2019**

Abstract

The habilitation thesis entitled “*Research and contributions in the field of analytical chemistry and pharmaceutical analysis*” is a synthesis of the most representative research directions approached in the postdoctoral period.

The paper aims to present my scientific activity, after the presentation of my PhD thesis entitled “*Analytical research regarding new methods of quantitative determination of inhibitory medical substances of gastric secretion (Antihistamines H_2)*”, also including the main development perspectives of the academic, professional and research career.

Research and development of pharmaceutical compounds has led to a revolution in the field of human health. Methods of analysis were developed for the estimation of the concentration in active substances, excipients and impurities, in order for the pharmaceutical products to serve the reason they were introduced into therapy.

Studies of bioavailability and pharmacokinetics offer information regarding the behaviour of drug compound, including in biological mediums, confirming the proposed action mechanism, the dosage and administration, the efficiency, safety and the association between the total benefit and risk of the medicine.

The instrumental techniques of detection and quantification play a decisive role in the quality control of drugs and in their biological profile study.

The method validation is an important problem in the analysis of medicinal substances, according to conventional regulations, such as Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) and International Conference of Harmonization (ICH).

The process confirms that the used analysis procedure is adequate for its pre-established use and demonstrates the reliability of the obtained results. The validation methodology has the role of demonstrating that the proposed method corresponds to the usage for which it has been prescribed. The statistic processing of the results of an analysis offers the possibility of obtaining the most probable value closest to the real value.

The main directions I have approached in the scientific research activity after obtaining in 2004 the title of *Doctor of Pharmacy*, aims the elaboration and validation of new analysis methods for medicinal substances, pharmaceutical forms, active principles from medicinal plants, as well as the insertion of new analytical reagents and electrochemical sensors in order to determine certain ions and pharmaceutical compounds.

The habilitation thesis is structured into sections which synthesise these research directions, respecting the criteria recommended by CNATDCU.

Thus, the first presented research direction is called “*Electrochemical sensors with pharmaceutical applications*”. Selective membrane electrodes play an important role in the field of analytical chemistry due to their advantages: simple frame and easy use; shows the results directly in the ionic activity; selectivity and sensitivity (they can be used in case of rapid

analysis on complex samples which contain small quantities of analyte); one can determine important species which cannot be measured through other methods.

Electrochemical sensors are used in the analysis and quality control of medicinal substances as such or from pharmaceutical forms, of raw materials and intermediate products obtained in industrial processes or of metabolites in case of biomedical analyses and therapy monitoring.

One can see the results obtained in the field of electrochemical sensors with a membrane based on inclusion matrices, which contain various ionophores used in the quantitative determination of ranitidine, nizatidine, famotidine, scopolamine, lisinopril or some heavy metals.

The analysis of heavy metals represents another research direction described in the section "*Advanced instrumental techniques for the analysis of heavy metals*". Our studies have followed the elaboration and validation of some methods of quantitative determination through atomic absorption spectroscopy (AAS) or potentiometry, as needed, for each metal in the study. The heavy metal content of some types of tobacco was also studied, as well as a series of foods of vegetable origin, also establishing the influence of the type of soil on the content of heavy metals from the plants.

The research continued with the evaluation of the real capacity of some vegetable watery extracts to bind and favour the removal of heavy metals from the body, as an alternative to the classic chelating agents therapy.

The therapeutic spectre and the one of the analytical applications for the Schiff bases were approached in the section "*Contributions to the development of novel Schiff bases with pharmaceutical applications*".

Schiff bases represent an important class of organic compounds which present a wide range of biological activities, including antibacterial, antifungal, antiviral, antimalarial, antiproliferative, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-HIV, antihelmintic and antipyretic. They are used as chelating ligands in the area of coordination compound chemistry, their metal complexes also presenting medical or analytical interest.

In the presented studies a series of Schiff bases, which were characterised through elemental analysis, solubility, melting point, UV-VIS spectres, IR spectres or NMR, were synthesised.

Due to their good capacity of coordination, some Schiff bases have been used as complexing reagents for the establishment of new methods of spectrophotometric quantitative analysis of some metal cations of bio-medical interest.

After synthesis, some of the free Schiff ligands and their metal complexes have been subjected to a screening of their biological *in vitro* activity on bacteria, fungi or the anti-inflammatory effect.

Two different sections describe the research made for the completion of the analytical profile of bisoprolol fumarate and lisinopril.

The section "*Contributions to the analytical profile of the bisoprolol fumarate*" is dedicated to one of the most used beta-blockers in the treatment of cardiovascular diseases. Our studies have aimed to develop new methods of quantitative determination of bisoprolol

fumarate through high-performance liquid chromatography (HPLC) or VIS spectrophotometry. The methods were validated and applied at the quantitative estimation of bisoprolol in pharmaceutical dosage forms or biological liquids.

Lisinopril is an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor used in the treatment of high blood pressure, congestive heart failure, heart attack, but also in the prevention of kidney complications of diabetes.

The section “*Contributions to the analytical profile of the lisinopril*” includes the studies which aimed to develop new methods of quantitative determination of lisinopril through high-performance liquid chromatography (HPLC) or VIS spectrophotometry. The methods were validated and applied at the quantitative estimation of lisinopril in pharmaceutical dosage forms.

In the section “*Modern analytical methods used for the quantification of some pharmaceutical substances*” one can find the synthesized description of a few HPLC determination methods of some drug compounds in biological mediums (alprazolam, clopidogrel) or pharmaceutical dosage forms (piroxicam). We have also studied the separation through ion exchange chromatography of haemoglobin hydrolysed.

Spectrophotometric methods were also applied in the quantitative determination of Fe (II) from pharmaceutical products or of hydroxyurea from biological liquids. The disposal of miconazole nitrate from products (films) with dermal application was quantified through a UV spectrophotometric method.

The results obtained after these researches have materialised by publishing some articles in specialty publications and participating in scientific events.

The final section “*The evolution and development of the professional, scientific and academic career*” is dedicated to a synthesis of the scientific, didactic and academic accomplishments from the postdoctoral period and to the presentation of the evolution and development plans of the scientific and professional career.

Rezumat

Teza de abilitare intitulată “*Cercetări și contribuții în domeniul chimiei analitice și analizei farmaceutice*” este o sinteză a celor mai reprezentative direcții de cercetare abordate în perioada postdoctorală.

Lucarea își propune prezentarea activității mele științifice după susținerea tezei de doctorat, intitulată “*Cercetări analitice privind realizarea de noi metode de determinare cantitativă a unor substanțe medicamentoase inhibitoare ale secreției gastrice (Antihistaminice H_2)*”, incluzând deasemenea și principalele perspective de dezvoltare a carierei academice, profesionale și de cercetare.

Cercetarea și dezvoltarea compușilor farmaceutici a condus la o revoluție în domeniul sănătății umane. Pentru ca produsele farmaceutice să servească scopurilor pentru care au fost introduse în terapie, au fost dezvoltate metode de analiză pentru estimarea concentrației în substanțe active, excipienți și impurități.

Studiile de biodisponibilitate și farmacocinetică furnizează informații legate de comportamentul compusului medicamentos, inclusiv în medii biologice, confirmând mecanismul de acțiune propus, doza și schema de administrare, eficacitatea, siguranța și asocierea între beneficiul și riscul total al medicamentului.

Tehnicile instrumentale de detecție și cuantificare au un rol decisiv în controlul de calitate al medicamentelor și în studiul profilului biologic al acestora.

Validarea metodei este o problemă importantă în analiza substanțelor medicamentoase, în conformitate cu reglementările convenționale, cum ar fi Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) și International Conference of Harmonization (ICH).

Procesul confirmă că procedura de analiză utilizată este adecvată pentru utilizarea sa prestabilită și demonstrează fiabilitatea rezultatelor obținute. Metodologia de validare are rolul de a demonstra că metoda propusă corespunde utilizării pentru care a fost prevăzută. Prelucrarea statistică a rezultatelor unei analize oferă posibilitatea de a obține valoarea cea mai probabilă ce se află cât mai aproape de valoarea reală.

Principalele direcții pe care le-am abordat în activitatea de cercetare științifică desfășurată după obținerea în anul 2004 a titlului de *Doctor în domeniul Farmacie* vizează elaborarea și validarea de noi metode de analiză pentru substanțe medicamentoase, forme farmaceutice și principii active din plante medicinale precum și introducerea de noi reactivi analitici și senzori electrochimici pentru determinarea unor ioni și a unor compuși farmaceutici.

Teza de abilitare este structurată pe secțiuni care sintetizează aceste direcții de cercetare, respectând criteriile recomandate de CNATDCU.

Astfel, prima direcție de cercetare prezentată este intitulată “*Senzori electrochimici cu aplicații farmaceutice*”. Electrozii cu membrană selectivă ocupa un loc important în domeniul chimiei analitice datorită avantajelor pe care aceștia le oferă: construcție simplă și utilizare

facilă; indică rezultatele direct în activitate ionică; selectivitate și sensibilitate (pot fi utilizați pentru analize rapide pe probe complexe, care conțin cantități mici de analit); se pot determina specii importante, care nu pot fi măsurate prin alte metode.

Senzorii electrochimici sunt utilizați în analiza și controlul de calitate al substanțelor medicamentoase ca atare sau din forme farmaceutice, a materiilor prime și produșilor intermediari obținuți în procesele industriale sau a metaboliților în cazul analizelor biomedicale și al monitorizării terapiei.

Sunt prezentate rezultatele obținute în domeniul senzorilor electrochimici cu membrană bazată pe matrici de incluziune, care conțin diverși ionofori, utilizați pentru determinarea cantitativă a ranitidinei, nizatidinei, famotidinei, scopolaminei, lisinoprilului sau a unor metale grele.

Analiza metalelor grele reprezintă a altă direcție de cercetare descrisă în secțiunea *“Tehnici instrumentale avansate pentru analiza metalelor grele”*. Studiile noastre au urmărit elaborarea și validarea unor metode de determinare cantitativă prin spectroscopie de absorbție atomică (AAS) sau potențimetrie, după caz, pentru fiecare metal luat în studiu. A fost determinat conținutul în metale grele din unele sorturi de tutun și o serie de produse alimentare de origine vegetală, stabilind și influența tipului de sol asupra conținutului de metale grele din plante.

Cercetările au continuat cu evaluarea capacității reale a unor extracte vegetale apoase de a lega și favoriza eliminarea metalelor grele din organism ca alternativă la terapia clasică cu agenți de chelare.

Spectrul terapeutic și cel al aplicațiilor analitice pentru bazele Schiff a fost abordat în secțiunea *“Contribuții la dezvoltarea unor noi baze Schiff cu aplicații farmaceutice”*.

Bazele Schiff constituie o clasă importantă de compuși organici care prezintă o gamă largă de activități biologice, inclusiv antibacteriene, antifungice, antivirale, antimalarie, antiproliferative, anti-inflamatoare, anti-cancer, anti-HIV, antihelmintice și antipiretice. Sunt folosite ca liganzi chelativi în domeniul chimiei compușilor coordinativi, complexii lor metalici prezentând deasemenea interes medical sau analitic.

În studiile prezentate au fost sintetizate o serie de baze Schiff care au fost caracterizate prin analiză elementală, solubilitate, puncte de topire, spectre UV-VIS, spectre IR sau RMN.

Datorită capacității foarte bune de coordonare unele baze Schiff au fost folosite ca reactivi de complexare pentru instituirea de noi metode de analiză cantitativă spectrofotometrică a unor cationi metalici de interes bio-medical.

După sinteză, unii dintre liganzii Schiff liberi și complexii lor metalici au fost supuși unui screening al activității lor biologice *in vitro* asupra bacteriilor, fungilor sau al efectului antiinflamator.

Doua secțiuni distincte descriu cercetările întreprinse pentru completarea profilului analitic al fumaratului de bisoprolol și al lisinoprilului.

Secțiunea *“Contribuții la profilul analitic al fumaratului de bisoprolol”* este alocată unuiia dintre cele mai utilizate beta-blocante în tratamentul bolilor cardiovasculare. Studiile noastre au urmărit dezvoltarea unor noi metode de determinare cantitativă a fumaratului de bisoprolol prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) sau spectrofotometrie în

VIS. Metodele au fost validate și aplicate la estimarea cantitativă a bisoprololului din forme farmaceutice dozate sau lichide biologice.

Lisinoprilul este un medicament din clasa inhibitorilor enzimei de conversie a angiotensinei (ACE), utilizat în tratamentul hipertensiunii arteriale, insuficienței cardiace congestive, infarctului miocardic dar și în prevenirea complicațiilor renale ale diabetului.

Secțiunea *“Contribuții la profilul analitic al lisinoprilului”* include studiile care au urmărit dezvoltarea unor noi metode de determinare cantitativă a lisinoprilului prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) sau spectrofotometrie în VIS. Și aceste metode au fost validate și aplicate la estimarea cantitativă a lisinoprilului din forme farmaceutice dozate.

În secțiunea *“Metode analitice moderne utilizate pentru cuantificarea unor substanțe medicamentoase”* sunt descrise în sinteza câteva metode de determinare prin HPLC a unor compuși medicamentoși din medii biologice (alprazolam, clopidogrel) sau forme farmaceutice dozate (proxicam). Am studiat deasemenea și separarea prin cromatografie de schimb ionic a unor hidrolizate de hemoglobină.

Metode spectrofotometrice au fost aplicate și la determinare cantitativă a Fe(II) din forme farmaceutice sau a hidroxiureei din lichide biologice. Cedarea nitrului de miconazol din produse (filme) cu aplicare dermică a fost cuantificată prin spectrofotometrie în UV.

Rezultatele obținute în urma acestor cercetări s-au materializat prin publicarea unor articole în reviste de specialitate și participarea la manifestări științifice.

Ultima secțiune a tezei de abilitare *“Evoluția și dezvoltarea carierei profesionale, științifice și academice”* este dedicată unei sinteze a realizărilor științifice, didactice și academice în perioada postdoctorală și prezentării planurilor de evoluție și dezvoltare a carierei științifice și profesionale.