

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GH. ASACHI” IAȘI  
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ SI PROTECȚIA MEDIULUI**

# **STUDII PRIVIND SINTEZA ȘI CONDIȚIONAREA BISOPROLOLULUI**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Doctorand,  
Chim. Gianina-Gabriela Pește**

**Conducător științific,  
Prof. univ. dr. ing. Corneliu Oniscu**

**Iași - 2010**

UNIVERSITATEA TEHNICA "GHEORGHE ASACHI" IASI

RECTORATUL

.....  
.....  
Va facem cunoscut ca in ziua de ..... la ora ..... in  
..... va avea loc sustinerea publica  
a tezei de doctorat intitulata:

"STUDII PRIVIND SINTEZA SI CONDITIONAREA BISOPROLOLULUI"

elaborata de domnisoara chimist GIANINA-GABRIELA PESTE in vederea  
conferirii titlului stiintific de doctor.

Comisia de doctorat este alcatuita din:

|                                         |                       |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| Prof. Dr. Ing. DAN CASCAVAL             | Presedinte            |
| Universitatea Tehnica "Gh. Asachi" Iasi |                       |
| Prof. Dr. Ing. CORNELIU ONISCU          | Conducator stiintific |
| Universitatea Tehnica "Gh. Asachi" Iasi |                       |
| Prof. Dr. Chim. GABRIEL DROCHIOIU       | Referent oficial      |
| Universitatea "A. I. Cuza" Iasi         |                       |
| Conf. Dr. Ing. EUGEN HOROBA             | Referent oficial      |
| Universitatea Tehnica "Gh. Asachi" Iasi |                       |
| Dr. Ing. CS1 CRISTINA-VICTORINA VLASE   | Referent oficial      |
| Centrul de Evaluare a Medicamentului,   |                       |
| S.C. Antibiotice S.A. Iasi              |                       |

Va trimitem rezumatul tezei de doctorat, cu rugamintea de a ne comunica  
in scris, in doua exemplare, aprecierile dumneavoastra.

Cu aceasta ocazie, va invitam la sustinerea publica a tezei de doctorat .

RECTOR  
Prof. Univ. Dr. Ing. ION GIURMA



Secretar universitate,  
Ing. Cristina Nagat

## CUPRINS

### Partea I : STUDII DE LITERATURA PRIVIND SINTEZA SI CONDITIONAREA BISOPROLOLULUI

8

#### Cap. 1. STUDII DE LITERATURA PRIVIND MEDICAMENTELE CARDIOVASCULARE ANTIHIPERTENSIVE BETA-BLOCANTE

10

##### 1.1. Locul medicamentelor beta-blocante in terapia cardiovasculara

10

###### 1.1.1. Introducere

10

###### 1.1.2.Indicatii si strategii de utilizare a medicamentelor beta-blocante

11

##### 1.2. Realizari si perspective in clasa medicamentelor antihipertensive beta-blocante

13

###### 1.2.1. Aspecte privind clasificarea, structura chimica si mecanismele de actiune ale medicamentelor beta-blocante

13

###### 1.2.2. Relatii structura chimica-actiune biologica in clasa medicamentelor beta-blocante

18

###### 1.2.3. Toxicitatea si efectele secundare in clasa medicamentelor beta-blocante

21

###### 1.2.4 Metode de sinteza a derivatilor cu actiune beta-blocanta

22

###### 1.2.4.1.Procedee de sinteza plecand de la fenol

22

###### 1.2.4.2.Procedee de sinteza plecand de la alcool 4-hidroxibenzilic

26

###### 1.2.5.Directii de cercetare privind dezvoltarea si diversificarea structurala a derivatilor cu efect cardiovascular beta-blocant

33

###### 1.2.6.Compatibilitatea medicamentelor beta-blocante cu alte grupe de medicamente utilizate in terapia cardiovasculara

34

#### Cap. 2. FORME FARMACEUTICE ALE MEDICAMENTELOR BETA-BLOCANTE

35

##### 2.1.Formele farmaceutice ale medicamentelor beta-blocante si biodisponibilitatea acestora

35

##### 2.2. Evaluarea perioadelor de stabilitate a formelor farmaceutice

36

###### 2.2.1. Factori ce influenteaza stabilitatea formelor farmaceutice

36

###### 2.2.2. Metode de evaluare a stabilitatii formelor farmaceutice

38

#### Cap. 3. BIOECHIVALENTA FORMELOR FARMACEUTICE-MODALITATE DE EVALUARE A EFECTELOR BIOLOGICE

44

##### 3.1. Biodisponibilitatea si bioechivalenta efectelor biologice

44

##### 3.2. Metode de cuantificare a bioechivalentei si aspectele legate de realizarea studiilor de bioechivalenta

47

##### 3.3. Teste de dizolvare *in vitro* si metode de evaluare

55

##### 3.4.Corelatii *in vitro-in vivo* si determinarea factorului de similaritate

55

### Partea a-II-a: CONTRIBUTII SI CERCETARI ORIGINALE

57

#### Cap. 4. LOCUL BISOPROLOLULUI IN CLASA MEDICAMENTELOR BETA-BLOCANTE

60

##### 4.1.Bisoprolol. Structura, proprietati fizice, chimice, biologice

60

##### 4.2.Proprietatile farmacologice si mecanismul de actiune a bisoprololului

61

##### 4.3.Forme farmaceutice continand bisoprolol si biodisponibilitatea acestora

62

##### 4.4.Conditii de calitate pentru utilizarea farmaceutica a bisoprololului

62

#### Cap. 5. SINTEZA BISOPROLOLULUI DIN ALCOOL 4-HIDROXIBENZILIC

64

##### 5.1. REACTIA DE ETERIFICARE A ALCOOLULUI 4-HIDROXIBENZILIC CU 2-ISOPROPOXIETANOL

64

###### 5.1.1.Sinteza intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol

64

###### 5.1.2. Elaborarea metodei analitice de determinare a concentratiei alcoolului 4-hidroxibenzilic in solutie de 2-isopropoxietanol

65

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.3. Modelarea procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, utilizand Amberlyst15                                                    | 67  |
| 5.1.3.1. Modelarea procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15- faza de initiere                                      | 69  |
| 5.1.3.2. Modelarea procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15- faza de perfectare                                    | 73  |
| 5.1.4. Modelarea neuronală a procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, utilizand Amberlyst 15                                       | 77  |
| 5.1.4.1. Modelarea neuronală a procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15- faza de initiere                          | 82  |
| 5.1.4.2. Modelarea neuronală a procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15- faza de perfectare                        | 96  |
| 5.1.5. Tehnologia de obtinere a 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolului, prin reactia de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena                   | 107 |
| <br>5.2. STUDIUL REACTIEI DE CONDENSARE A INTERMEDIARULUI 4-[(2-ISOPROPOXIETOXI)METIL-FENOL] CU EPICLORHIDRINA                                                                                   | 108 |
| 5.2.1. Condensarea intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol] cu epiclorhidrina                                                                                                          | 108 |
| 5.2.2. Elaborarea metodei analitice de determinare a concentratiei epiclorhidrinei                                                                                                               | 108 |
| 5.2.3. Modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina                                                                                  | 111 |
| 5.2.3.1. Modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina-in absenta PEG-400                                                             | 112 |
| 5.2.3.2. Modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina-in prezenta PEG-400                                                            | 115 |
| 5.2.4. Tehnologia de obtinere a 2-[[4-(isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil] oxiranului, prin reactia de condensare a 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolului cu epiclorhidrina, in prezenta PEG-400 | 117 |
| 5.3. CONDENSAREA DERIVATULUI EPOXIDIC CU ISOPROPILAMINA SI OBTINEREA BISOPROLOLULUI BAZA                                                                                                         | 118 |
| 5.4. OBTINEREA BISOPROLOLULUI FUMARAT. SEPARAREA SI PURIFICAREA PRODUSULUI OBTINUT                                                                                                               | 118 |
| 5.5. STABILIREA STRUCTURII BISOPROLOLULUI FUMARAT SINTETIZAT                                                                                                                                     | 120 |
| 5.6. EVALUAREA CARACTERISTICILOR CALITATIVE SI CANTITATIVE PENTRU BISOPROLOLUL FUMARAT SINTETIZAT                                                                                                | 128 |
| <br><b>Cap. 6. FORME DE CONDITIONARE A BISOPROLOLULUI FUMARAT SI STABILITATEA ACESTORA</b>                                                                                                       | 133 |
| 6.1. Studii privind conditionarea bisoprololului fumarat sub forma de comprimate filmate                                                                                                         | 133 |
| 6.1.1. Evaluarea parametrilor reologici pentru pulberile de bisoprolol fumarat utilizate la realizarea comprimatelor filmate                                                                     | 133 |
| 6.1.2. Efectul dimensiunilor particulelor si naturii excipientilor asupra vitezei de eliberare a bisoprololului fumarat din comprimate                                                           | 138 |
| 6.1.2.1. Stabilirea dimensiunilor particulelor si a naturii aglutinantului in vederea obtinerii de comprimate de bisoprolol fumarat cu dizolvare conform USP 29                                  | 138 |
| 6.1.2.2. Modelarea procesului de dizolvare a comprimatelor de bisoprolol fumarat functie de cantitatea de aglutinant                                                                             | 141 |
| 6.2. Studii privind caracterizarea comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat                                                                                                             | 148 |
| 6.2.1. Descrierea comprimatului                                                                                                                                                                  | 148 |
| 6.2.2. Identificarea si determinarea continutului de bisoprolol fumarat                                                                                                                          | 148 |
| 6.2.3. Identificarea filmului OPADRY® II 85F24286                                                                                                                                                | 149 |
| 6.2.4. Determinarea substantelor inrudite                                                                                                                                                        | 149 |

|                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2.5. Dizolvarea comprimatelor de 10 mg bisoprolol fumarat                                                                                                                                                                      | 150 |
| 6.2.5.1. Testul de dizolvare efectuat in mediul prevazut de USP29                                                                                                                                                                | 150 |
| 6.2.5.2. Testul de dizolvare efectuat la pH 1.2                                                                                                                                                                                  | 154 |
| 6.2.5.3. Testul de dizolvare efectuat la pH 4.5                                                                                                                                                                                  | 157 |
| 6.2.5.4. Testul de dizolvare efectuat la pH 6.8                                                                                                                                                                                  | 160 |
| 6.2.6. Uniformitatea unitatilor dozate                                                                                                                                                                                           | 163 |
| 6.2.7. Masa medie                                                                                                                                                                                                                | 164 |
| 6.2.8. Contaminarea microbiana                                                                                                                                                                                                   | 164 |
| 6.3. Evaluarea stabilitatii comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol fumarat                                                                                                                                             | 165 |
| 6.3.1. Studiul stabilitatii comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol fumarat in timp real                                                                                                                                | 166 |
| 6.3.2. Studiul stabilitatii comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol fumarat in conditii izoterme de "imbatranire accelerata"                                                                                            | 170 |
| 6.3.3. Testarea fotostabilitatii comprimatelor de 10mg bisoprolol fumarat                                                                                                                                                        | 173 |
| <br><b>Cap. 7. EVALUAREA BIODISPONIBILITATII SI BIOECHIVALENTEI COMPRIMATELOR FILMATE BISOTENS® 10 MG BISOPROLOL FUMARAT (S.C. ANTIBIOTICE S.A.) VERSUS CONCOR® (Merck KgA) DUPA ADMINISTRARE ORALA LA 12 VOLUNTARI SANATOSI</b> | 174 |
| 7.1. Protocol de studiu. Rezumat                                                                                                                                                                                                 | 174 |
| 7.2. Testul de dizolvare <i>in vitro</i>                                                                                                                                                                                         | 175 |
| 7.2.1. Testul de dizolvare efectuat in mediul prevazut de USP29                                                                                                                                                                  | 175 |
| 7.2.2. Testul de dizolvare efectuat la pH 1.2                                                                                                                                                                                    | 178 |
| 7.2.3. Testul de dizolvare efectuat la pH 4.5                                                                                                                                                                                    | 181 |
| 7.2.4. Testul de dizolvare efectuat la pH 6.8                                                                                                                                                                                    | 184 |
| 7.3. Elaborarea si validarea metodei de determinare a bisoprololului din probele de plasma umana                                                                                                                                 | 187 |
| 7.4. Aplicarea metodei bioanalitice in scopul determinarii bisoprololului din probele de plasma umana                                                                                                                            | 194 |
| 7.4.1. Date primare si reprezentarea lor grafica                                                                                                                                                                                 | 194 |
| 7.4.2. Evaluarea statistica a bioechivalentei                                                                                                                                                                                    | 205 |
| <br><b>Anexa</b>                                                                                                                                                                                                                 | 206 |
| <br><b>Concluzii</b>                                                                                                                                                                                                             | 259 |
| <br><b>Bibliografie</b>                                                                                                                                                                                                          | 262 |

Rezumatul lucrarii prezinta, intr-o forma succinta, rezultatele originale obtinute si concluziile generale. La redactarea rezumatului, s-au pastrat aceleasi notatii pentru capitole, figuri si tabele utilizate in cadrul tezei.

## Introducere

Studiile experimentale efectuate in cadrul tezei de doctorat au abordat problematici de larg interes ale ingineriei chimice, si anume studiul sintezei bisoprololului din alcool 4-hidroxibenzilic, conditionarea substantei sintetizate sub forma de comprimate filmate, precum si studiul biodisponibilitatii si bioechivalentei formelor farmaceutice ce contin bisoprolol fumarat.

Lucrarea este structurata pe doua parti principale, prima parte cuprinde 3 capitole, iar cea de a doua parte contine 4 capitole. Este extinsa pe 269 pagini si contine un numar de 92 tabele, 96 figuri, 40 ecuatii si 160 indicatii bibliografice, dintre care 5 apartin autorului.

Prima parte a tezei de doctorat reda sintetic datele de literatura referitoare la medicamentele cardiovasculare beta-blocante. Astfel, au fost prezentate indicatiile si strategiile de utilizare ale beta-blocantelor, precum si aspecte privind clasificarea, structura chimica, mecanismele de actiune si relatiile structura chimica-actiune biologica in aceasta clasa terapeutica. De asemenea, au fost descrise principalele metode de sinteza a derivatilor beta-blocanti, ce includ procedee de sinteza plecand de la fenol si procedee de sinteza plecand de la alcool 4-hidroxibenzilic, fiecare din cele doua tipuri de metode fiind particularizate pentru bisoprolol.

Contributiile originale privind sinteza si conditionarea bisoprololului se regasesc in partea a doua a tezei de doctorat, capitolele 4-7.

Capitolul 4 prezinta locul bisoprololului in clasa beta-blocantelor, din punct de vedere a structurii, proprietatilor si mecanismului de actiune. De asemenea, au fost prezentate formele farmaceutice ce contin bisoprolol si conditiile de calitate necesare pentru utilizarea farmaceutica a acestuia, prevazute de principalele farmacopei internationale.

Capitolul 5 prezinta sinteza bisoprololului din alcool 4-hidroxibenzilic. Astfel, au fost studiate toate fazele sintezei bisoprololului fumarat, pana la obtinerea produsului final. In scopul cunoasterii exacte a conditiilor optime de reactie ce conduc la un randament maxim in produs util, au fost efectuate modelari statistice si neuronale, pentru principalele etape ale sintezei chimice. Pentru urmarirea gradului de avansare al reactiilor chimice studiate, au fost elaborate metode de analiza, pe fiecare faza de sinteza. Produsul obtinut a fost identificat si caracterizat prin metode spectrale IR, RMN, cromatografie de lichide cuplata cu detectie selectiva de masa (LC-MS).

Capitolul 6 prezinta rezultatele obtinute in urma efectuarii studiilor de conditionare a bisoprololului fumarat sintetizat, sub forma de comprimate filmate. Astfel, au fost studiatii parametrii reologici pentru pulberile de bisoprolol fumarat utilizate la realizarea comprimatelor filmate influenta dimensiunilor particulelor si naturii excipientilor asupra vitezei de eliberare a substantei active din comprimate. Pe baza datelor obtinute, s-au stabilit dimensiunile particulelor si aglutinantul optim in vederea obtinerii de comprimate cu dizolvare conform USP 29 si s-a efectuat modelarea procesului de dizolvare a comprimatelor de bisoprolol fumarat functie de cantitatea de aglutinant. Ulterior, au fost efectuate studii in vederea caracterizarii comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat obtinute si a evaluarii stabilitatii acestora.

Capitolul 7 reda rezultatele studiului de bioechivalenta a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat Bisotens® (S.C. Antibiotice S.A.) versus Concor® (Merck) dupa administrare orala la 12 voluntari sanatosi. Pentru determinarea concentratiei plasmatice a bisoprololului fumarat, a fost elaborata si validata o metoda bazata pe cromatografia de lichide cuplata cu detectia selectiva de masa. In urma aplicarii acestei metode bioanalitice, au fost determinati principalii parametri farmacocinetici, pe baza carora s-a efectuat evaluarea statistica a bioechivalentei celor doua produse farmaceutice.

Rezultatele cercetarilor proprii din cadrul tezei de doctorat s-au concretizat in elaborarea a 5 lucrari stiintifice publicate in reviste de specialitate cotate ISI.

## CONTRIBUTII SI CERCETARI ORIGINALE

### Cap. 4. LOCUL BISOPROLOLULUI IN CLASA MEDICAMENTELOR BETA-BLOCANTE

#### 4.1. Bisoprolol. Structura, proprietati fizice, chimice, biologice

In functionarea normala a organismului, inima ocupa un loc fundamental, deoarece ea asigura pomparea sangelui si distribuirea lui prin reseaua de vase si capilare in tot corpul. Medicamentele cardiovasculare actioneaza asupra inimii si a musculaturii sistemului vascular, prin modificarea ritmului si a debitului cardiac, precum si a distributiei sangelui in diverse ramuri ale sistemului circulator.

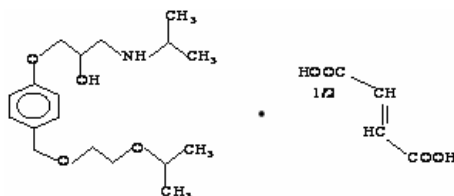
Medicamentele cu actiuni specific cardiovasculare se clasifica in urmatoarele grupe [1]:

- medicamente cardiotonice;
- medicamente aritmice;
- medicamente coronarodilatatoare (antianginoase);
- medicamente antihipertensive cu actiune centrala;
- medicamente antihipertensive cu actiune vasodilatatoare;
- medicamente beta-blocante;
- medicamente anticoagulante;
- medicamente hipolipemiante.

Dintre categoriile mai sus mentionate, un interes deosebit il prezinta medicamentele beta-blocante. Acestea au fost sistematizate in grupa aparte, deoarece ele au actiuni cardiovasculare multiple (antiaritmice, antihipertensive, antianoxice) si se obtin printr-o tehnologie comuna.

Un medicament pretios in terapia cardiovasculara beta-blocanta este bisoprololul. Acesta s-a remarcat prin proprietati farmacocinetice deosebite, evidentiata prin numeroase studii clinice, precum absorbtia si distributia rapida in organism, concentratii plasmatice maxime inregistrate in 2-4 ore, eficienta terapeutica si siguranta in administrare.

Din punct de vedere chimic, bisoprololul fumarat (2:1) este un derivat de fenoxiaminopropanol, cu urmatoarea structura chimica :



Formula moleculara:  $C_{18}H_{31}NO_4 \cdot 1/2 C_4H_4O_4$

Denumire: ( $\pm$ ) 1[[  $\alpha$ -(2-isopropoxi-etoxi)-p-tolil]oxi]-3-(isopropilamino)-2-propanol fumarat.

Se prezinta sub forma unui amestec racemic, responsabil de activitatea beta-blocanta fiind enantiomerul S(-) [95].

Proprietatile fizice ale bisoprololului sunt redacte in tabelul 13.

Tabelul 13: **Proprietatile fizice ale bisoprololului**

| Masa moleculara | Stare de agregare                                               | Culoare | Solubilitate                                                        | pKa | Coefficient de partitie (n-octanol/tampon fosfat, pH=7.4) |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------|
| 325,443         | - substanta solida, se prezinta sub forma de pulbere cristalina | alba    | -solubil in apa si metanol;<br>-usor solubil in etanol si cloroform | 9,5 | 4,8                                                       |

In solutii acide, la pH =4, prezinta doua maxime de absorbtie in domeniul UV, si anume absorbtia de la lungimea de unda 225 nm, caracteristica nucleului aromat, respectiv 273 nm, caracteristica catenei laterale propanolice (figura 5).

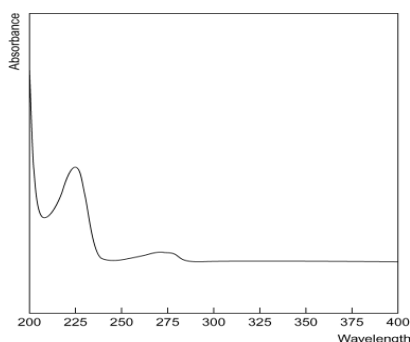


Figura 5 : **Spectrul de absorbtie al bisoprololului**

Proprietatile biologice ale bisoprololului fumarat sunt:

a) beta1-selectivitate

Comparativ cu alti agenti beta1-blocanti (atenolol, metoprolol, betaxolol), bisoprololul s-a dovedit a fi cel mai beta1-selectiv agent, fapt demonstrat prin studii *in vitro* si *in vivo* [96].

b) activitate simpatomimetica intrinseca

Bisoprololul nu manifesta activitate simpatomimetica intrinseca.

c) efect stabilizator de membrana

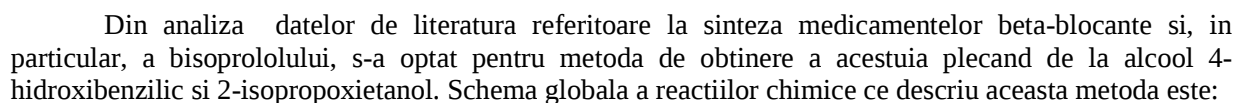
Bisoprololul nu manifesta efect stabilizator de membrana intr-un domeniu relevant pentru actiunea beta-blocanta.

Indicatii terapeutice ale bisoprololului fumarat [97]:

- tratamentul anginei pectorale, a ischemiei miocardice silentioase (intrucat scade numarul, durata si intensitatea atacurilor anginoase, in special pe cele matinale si nocturne), precum si in tratamentul infarctului miocardic;
- tratamentul hipertensiunii arteriale (scade eficient valorile tensiunii arteriale sistolice si diastolice, respectand ritmul circadian);
- tratamentul aritmiilor atriale si ventriculare (prin efectul sau antiaritmie).

Contraindicatii:

- insuficienta cardiaca decompensata;
- bloc atrioventricular de gradul II sau III;
- hiperreactivitate bronsica (de exemplu bronhopneumopatie cronica obstructiva, astm bronsic);
- bradicardie < 50/min;
- hipotensiune marcata;
- stadii avansate ale tulburarilor circulatorii periferice.

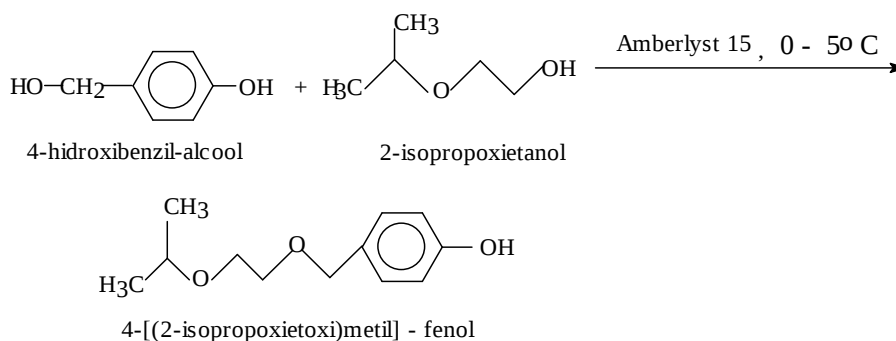


Sinteza bisoprololului din alcool 4-hidroxibenzilic si 2-isopropoxietanol presupune parcurerea urmatoarelor faze:

## 5.1. REACTIA DE ETERIFICARE A ALCOOLULUI 4-HIDROXIBENZILIC CU 2-ISOPROPOXIETANOL

### 5.1.1. Sinteza intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil]-fenol

Intermediarul 4-[(2-isopropoxietoxi)metil]-fenol se obtine prin reactia de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza acida eterogena, in prezenta de Amberlyst 15, conform reactiei chimice:



Aceasta reactia de eterificare poate conduce, pe langa produsul de reactie dorit, si la produse de reactie secundare. Din acest motiv, cunoasterea exacta a parametrilor de reactie a fost imperios necesara. In acest scop, s-a intreprins un studiu de modelare matematica, prin metoda planificarii experimentelor si utilizarii ecuatiilor de regresie.

Urmarirea gradului de avansare a reactiei de eterificare s-a realizat prin dozarea cantitativa a alcoolului 4-hidroxibenzilic, printr-o metoda cromatografica, ce a fost dezvoltata in cadrul cercetarilor intreprinse in prezenta teza si ale carei rezultate sunt prezentate mai jos.

### 5.1.2. Elaborarea metodei analitice de determinare a concentratiei alcoolului 4-hidroxibenzilic in solutie de 2-isopropoxietanol

Avansarea procesului chimic s-a urmarit prin determinarea concentratiei alcoolului 4-hidroxibenzilic in masa de reactie. Datele de literatura indica diverse posibilitati de dozare a acestei substante, HPLC sau GC-MS, in diverse conditii [104–110]. Pentru determinarea concentratiei alcoolului 4-hidroxibenzilic in solutie de 2-isopropoxietanol, s-a elaborat si validat o metoda HPLC, ale carei rezultate au constituit subiectul unui articol stiintific– *in press*, cu titlul “A new liquid chromatographic method for determination of 4-hydroxybenzyl alcohol in 2-isopropoxy ethanol solution” [111].

Parametrii operationali ai acestei metode sunt :

|                         |                                                 |
|-------------------------|-------------------------------------------------|
| Coloana cromatografica: | Chromolith RP-18e (4.6*100 mm) (Merck)          |
| Temperatura coloanei :  | 35°C                                            |
| Faza mobila:            | acid acetic 0,2 % : acetonitril = 60 : 40 (v/v) |
| Debit:                  | 1,2 ml/min                                      |
| Detectie:               | UV, la lungimea de unda 225 nm                  |
| Volum de injectie:      | 75 µl                                           |
| Tip de injectie:        | Automata                                        |
| Temperatura autosampler | 10°C                                            |

### 5.1.3. Modelarea procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, utilizand Amberlyst 15

Procesul de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, utilizand Amberlyst 15, s-a realizat in doua etape, distincte din punct de vedere termic:

- etapa 1 – la temperatura de 0-5°C;
- etapa 2 – la temperatura de 15-20°C.

Pe aceste considerente, modelarea s-a realizat pentru fiecare etapa distinct. Pentru aceasta, a fost necesara realizarea unui studiu preliminar, in urma caruia s-au stabilit parametri de baza, limitele lor de variatie, precum si influentele acestora asupra performantelor reactiei de eterificare. Parametrii ce influenteaza decisiv randamentele in eter sunt:

- Concentratia reactantilor, masurata prin raport molar alcool 4-hidroxibenzilic/ 2- isopropoxietanol
- Timpul de reactie, ore
- Temperatura, °C.

Dependenta randamentului de reactie functie de timp, la raport molar alcool 4-hidroxibenzilic/ 2-isopropoxietanol =1:1, 1:6 respectiv 1:13,5 este redata in figurile 7,8 si 9, cu precizarea ca, in toate cazurile, gradul de avansare a procesului a fost urmarit prin dozarea alcoolului 4-hidroxibenzilic, utilizand metoda descrisa in paragraful 5.1.2.

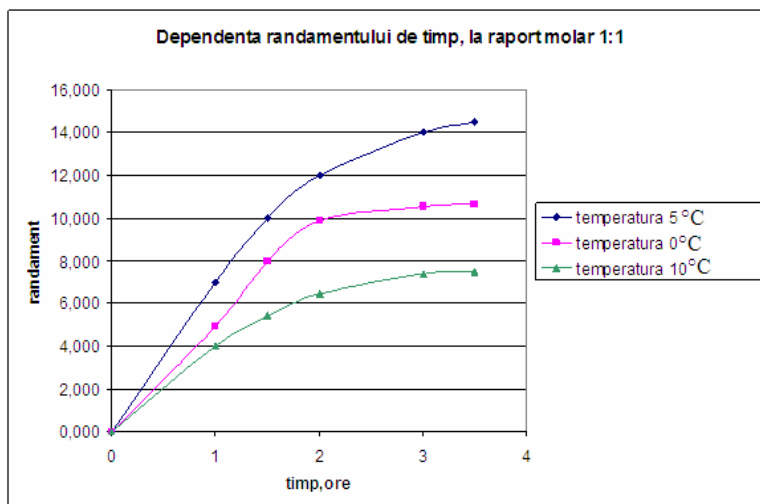


Figura 7: *Dependenta randament de reactie-timp, la raport molar 1:1, la diverse temperaturi*

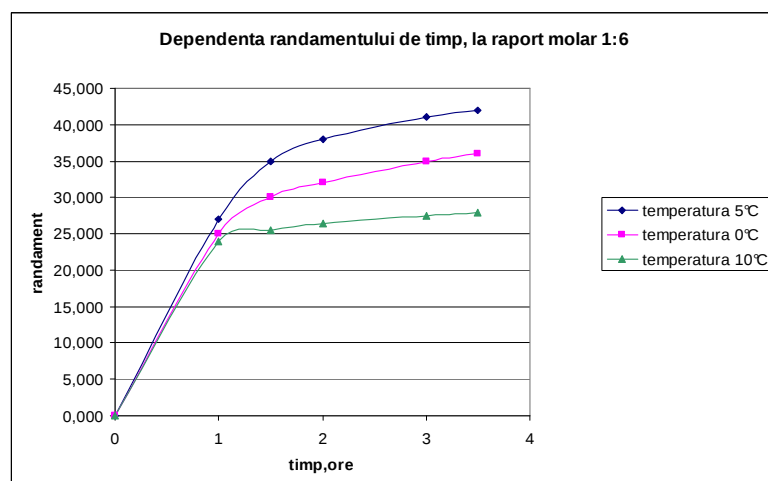


Figura 8: *Dependenta randament de reactie-timp, la raport molar 1:6, la diverse temperaturi*

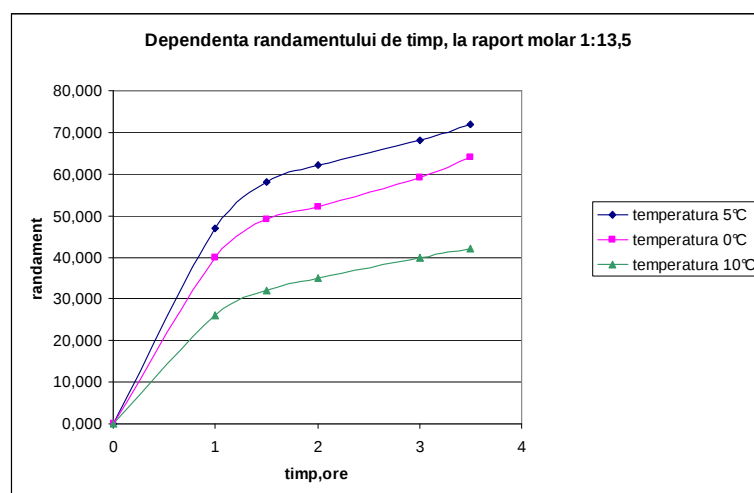


Figura 9: *Dependenta randament de reactie-timp, la raport molar 1:13,5, la diverse temperaturi*

Analiza datelor experimentale obtinute evidentiaza faptul ca randamentul in produs util creste odata cu cresterea raportului molar alcool 4-hidroxi-benzilic/2-isopropoxietanol. De asemenea, se remarca faptul ca, la temperaturi de peste 5°C, este favorizata formarea produsilor secundari, ceea ce duce la o scadere a randamentului in produs util, in toate cele trei cazuri studiate.

#### 5.1.3.1 Modelarea procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxi-benzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15 - faza de initiere

Urmărirea gradului de avansare a reacției de eterificare s-a efectuat prin dozarea alcoolului 4-hidroxi-benzilic, utilizând metoda descrisă în paragraful 5.1.2.

Randamentul reacției de eterificare, în faza de inițiere, depinde de următorii parametri independenți:

- raport molar 2-isopropoxietanol /alcool 4-hidroxi-benzilic;
- timp de reacție;
- temperatura de reacție.

Pentru realizarea modelării reacției, s-a ales ca program de experimentare un program central compus rotabil [112] și s-a propus ca model pentru estimarea randamentului o ecuație de regresie de gradul 2, de forma:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{33}x_3^2+b_{12}x_1x_2+b_{13}x_1x_3+b_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

În tabelele următoare, sunt prezentate valorile reale și codificate, precum și intervalele de variație ale parametrilor determinanți pentru reacție (tabelul 19) și, respectiv, programul de desfășurare al experimentelor și rezultatele obținute (tabelul 20).

Tabelul 19. *Nivelele variabilelor independente*

| Nr. crt. | Parametri determinanți pentru reacție                       | Codificarea parametrilor | Nivelul de codificare |    |     | Interval de variație |
|----------|-------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|----|-----|----------------------|
|          |                                                             |                          | -1                    | 0  | +1  |                      |
| 1.       | Raportul molar 2-isopropoxietanol/ alcool 4-hidroxibenzilic | $x_1$                    | 9                     | 12 | 15  | 3                    |
| 2.       | Timpul de reacție, ore                                      | $x_2$                    | 0,5                   | 2  | 3,5 | 1,5                  |
| 3.       | Temperatura de reacție, °C                                  | $x_3$                    | 0                     | 5  | 10  | 5                    |

Tabelul 20. *Matrice de experimentare (program central compus rotabil) și randamentele obținute*

| Nr. crt. | $x_1$  | $x_2$  | $x_3$  | $x_1^2$ | $x_2^2$ | $x_3^2$ | $x_1x_2$ | $x_1x_3$ | $x_2x_3$ | $y_{exp.}$ | $y_{calc.}$ |
|----------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|------------|-------------|
| 1.       | -1     | -1     | -1     | +1      | +1      | +1      | +1       | +1       | +1       | 24,40      | 24,48       |
| 2.       | +1     | -1     | -1     | +1      | +1      | +1      | -1       | -1       | +1       | 40,20      | 40,61       |
| 3.       | -1     | +1     | -1     | +1      | +1      | +1      | -1       | +1       | -1       | 36,10      | 35,67       |
| 4.       | +1     | +1     | -1     | +1      | +1      | +1      | +1       | -1       | -1       | 64,70      | 64,75       |
| 5.       | -1     | -1     | +1     | +1      | +1      | +1      | +1       | -1       | -1       | 16,40      | 16,75       |
| 6.       | +1     | -1     | +1     | +1      | +1      | +1      | -1       | +1       | -1       | 29,70      | 30,28       |
| 7.       | -1     | +1     | +1     | +1      | +1      | +1      | -1       | -1       | +1       | 27,70      | 27,69       |
| 8.       | +1     | +1     | +1     | +1      | +1      | +1      | +1       | +1       | +1       | 53,60      | 53,92       |
| 9.       | -1,682 | 0      | 0      | 2,828   | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 18,40      | 18,44       |
| 10.      | +1,682 | 0      | 0      | 2,828   | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 54,70      | 54,07       |
| 11.      | 0      | -1,682 | 0      | 0       | 2,828   | 0       | 0        | 0        | 0        | 19,70      | 19,04       |
| 12.      | 0      | +1,682 | 0      | 0       | 2,828   | 0       | 0        | 0        | 0        | 48,50      | 48,55       |
| 13.      | 0      | 0      | -1,682 | 0       | 0       | 2,828   | 0        | 0        | 0        | 53,80      | 53,76       |
| 14.      | 0      | 0      | +1,682 | 0       | 0       | 2,828   | 0        | 0        | 0        | 38,70      | 38,15       |
| 15.      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 70,90      | 69,67       |
| 16.      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 68,80      | 69,67       |
| 17.      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 69,40      | 69,67       |
| 18.      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 68,70      | 69,67       |
| 19.      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 69,90      | 69,67       |
| 20.      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 70,20      | 69,67       |

Utilizând datele experimentale obținute, s-au determinat, conform procedurii uzuale [113-114], coeficienții ecuației de regresie, rezultând următoarea ecuație de regresie pentru randament:

$$y = 69,67 + 10,59x_1 + 8,77x_2 - 4,64x_3 - 11,81x_1^2 - 12,68x_2^2 - 8,38x_3^2 + 3,175x_1x_2 - 0,65x_1x_3 - 0,125x_2x_3 \quad (2)$$

Analizând valorile coeficienților, se constată că raportul molar 2-isopropoxietanol/ alcool 4-hidroxibenzilic și timpul de reacție influențează favorabil reacția, în timp ce temperatura influențează negativ randamentul în produsul dorit, favorizând formarea produsilor secundari de reacție.

Pentru a determina valoarea maximă a funcției, se apelează la condițiile necesare de extrem, obținându-se un sistem de ecuații liniar și neomogen în necunoscutele  $x_1$ ,  $x_2$  și  $x_3$ :

$$\begin{cases} (3) \partial y / \partial x_1 = 10,59 - 23,62x_1 + 3,175x_2 - 0,65x_3 = 0 \\ (4) \partial y / \partial x_2 = 8,77 - 25,36x_2 + 3,175x_1 - 0,125x_3 = 0 \\ (5) \partial y / \partial x_3 = -4,64 - 16,76x_3 - 0,65x_1 - 0,125x_2 = 0 \end{cases}$$

Prin rezolvarea sistemului, se obtin valorile:

$$\begin{cases} x_1^0 = 0,51171 \\ x_2^0 = 0,41017 \\ x_3^0 = -0,298 \end{cases}$$

care, dupa decodificare, conduc la urmatoarele valori ale parametrilor luati in discutie:

$x_1 = 13,535$  mol 2-isopropoxietanol / mol alcool 4-hidroxibenzilic;

$x_2 = 156,9$  minute;

$x_3 = 3,5^\circ\text{C}$ .

Valoarea randamentului maxim obtinut cu aceste valori este  $y_{\max} = y(x_1, x_2, x_3) = 74,88\%$ .

Analiza de dispersie a modelului ales a condus la urmatoarele rezultate:

Tabelul 21. *Analiza de dispersie a experimentului compus central rotabil*

| Sursa de variatie           | Suma de patrute | Grade de libertate | Media de patrute |
|-----------------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| Termenii de ordin I         | 2877,012        | 3                  | 959              |
| Termenii de ordin II        | -54,643         | 6                  | -9,107           |
| Adecvanta modelului         | 5,6814          | 5                  | 1,136            |
| Erori de reproductibilitate | 3,3125          | 5                  | 0,662            |
| Total                       | 2831,36         | 19                 | -                |

Din tabelul 21, se observa ca termenul de ordinul I au influenta mult mai mare decat cei de ordinul II. Contributia erorilor reziduale si de reproductibilitate in suma de patrute este extrem de redusa (sub 0,2%), ceea ce indica o adecvanta foarte buna a modelului.

In figurile 10, 11 si 12, se prezintă grafic (utilizand o sectiune din programul MATLAB) raspunsurile date de ecuatia de regresie pentru  $x_1=0,51171$  (valoarea optima pentru parametrul raport molar 2-isopropoxietanol / alcool 4-hidroxibenzilic),  $x_2=156,9$  (valoarea optima pentru parametrul timp de reactie) si  $x_3=3,5$  (valoarea optima pentru parametrul temperatura).

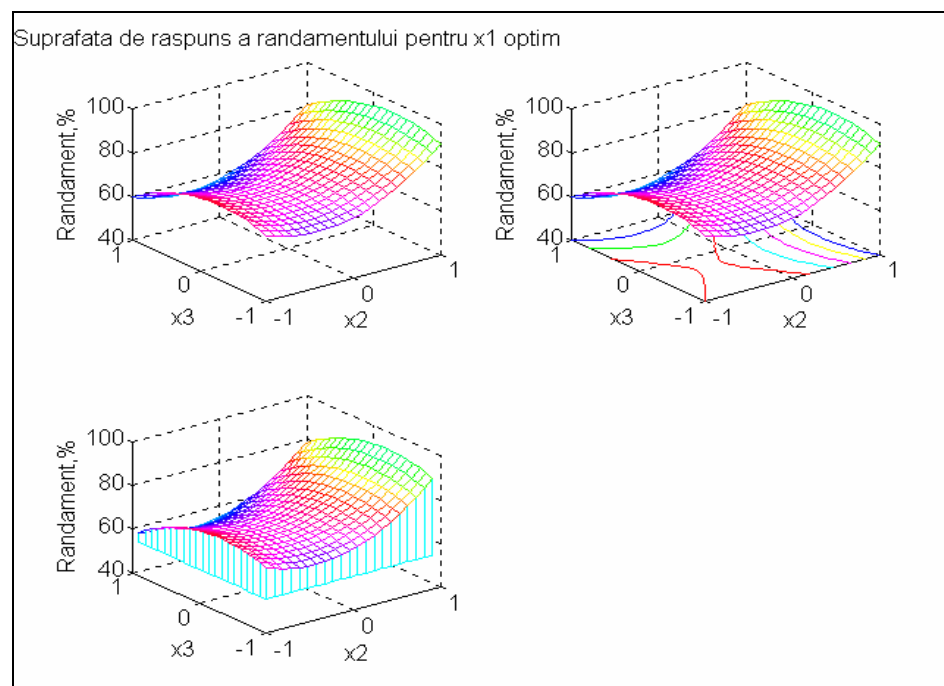


Figura 10: **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la raportul molar 2-isopropoxietanol / alcool 4-hidroxibenzilic optim**

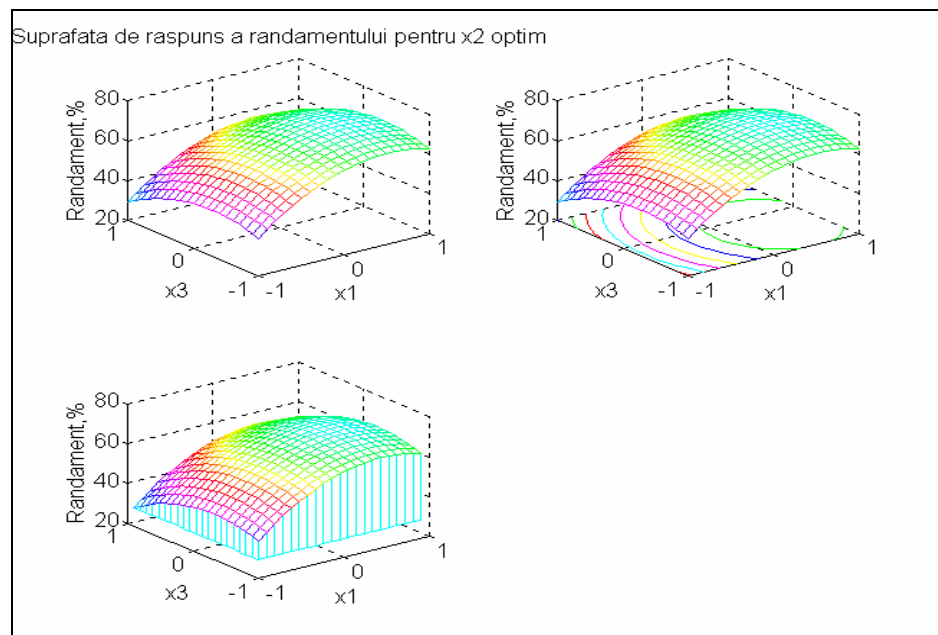


Figura 11: **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la timpul de reactie optim**

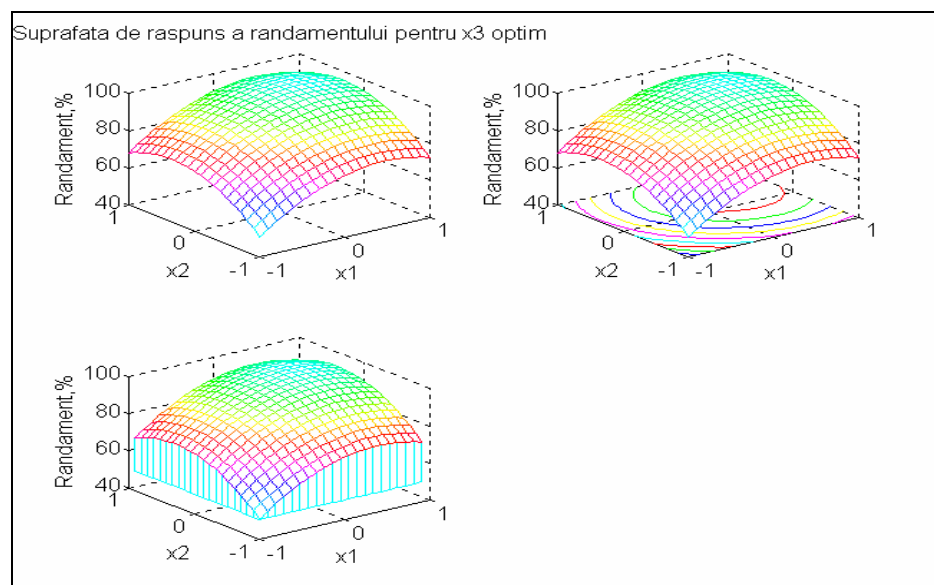


Figura 12: **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la temperatura de reactie optima**

### 5.1.3.2. Modelarea procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15 - faza de perfectare

Reactia de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, catalizata de Amberlyst 15, catalizator solid ce contine grupari sulfonice, se desfasoara in mai multe etape: difuzia 2-isopropoxietanolului (mediu de reactie) catre suprafata catalizatorului, difuzia alcoolului 4-hidroxibenzilic catre suprafata catalizatorului, activarea alcoolului 4-hidroxibenzilic sub forma de alcool protonat, reactia chimica intre cei doi reactanti, cu obtinerea produsului de reactie, desorbtiia acestuia de pe suprafata catalizatorului si difuzia produsului de reactie in faza lichida. Etapa desorbtiiei produsului de reactie de pe suprafata catalizatorului este favorizata de cresterea temperaturii, dar acest parametru influenteaza si obtinerea produsilor secundari de reactie. Din acest motiv, am realizat modelarea acestei faze, pentru a stabili exact acele valori ale parametrilor de reactie care sa defavorizeze formarea produsilor secundari (de ex., dimerii obtinuti prin reactiile de autocondensare a celor doi alcooli, 4-hidroxi-benzaldehida etc).

Experimentele preliminare au indicat dependenta randamentului reactiei, in faza de perfectare, de urmatorii parametri independenti: timp de reactie si temperatura de reactie, raportul molar dintre cei doi reactanti fiind stabilit in prima etapa.

S-a ales ca program de experimentare un program central compus rotabil si s-a propus ca model pentru estimarea randamentului o ecuatie de regresie de gradul 2, de forma:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{12}x_1x_2 \quad (7)$$

Si in acest caz, s-au stabilit valorile reale si codificate ale variabilelor (tabelul 22) si respectiv programul de desfasurare al experimentelor (tabelul 23).

Tabelul 22. *Nivelele variabilelor independente*

| Nr. crt. | Parametri determinanti pentru reactie | Codificarea parametrilor | Nivelul de codificare |    |    | Interval de variatie |
|----------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|----|----|----------------------|
|          |                                       |                          | -1                    | 0  | +1 |                      |
| 1.       | Timpul de reactie, ore                | $x_1$                    | 5                     | 10 | 15 | 5                    |
| 2.       | Temperatura de reactie, °C            | $x_2$                    | 15                    | 20 | 25 | 5                    |

Tabelul 23. *Matrice de experimentare (program central compus rotabil) si randamentele obtinute*

| Nr.crt. | $x_0$ | $x_1$  | $x_2$  | $x_1^2$ | $x_2^2$ | $x_1x_2$ | $y_{exp}$ | $y_{calc}$ |
|---------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|-----------|------------|
| 1.      | +1    | -1     | -1     | 1       | 1       | +1       | 88,7      | 88,47      |
| 2.      | +1    | +1     | -1     | 1       | 1       | -1       | 95,6      | 96,9       |
| 3.      | +1    | -1     | +1     | 1       | 1       | -1       | 89,3      | 87,67      |
| 4.      | +1    | +1     | +1     | 1       | 1       | +1       | 92,4      | 92,3       |
| 5.      | +1    | -1,414 | 0      | 2       | 0       | 0        | 83,2      | 85,57      |
| 6.      | +1    | +1,414 | 0      | 2       | 0       | 0        | 94,6      | 94,80      |
| 7.      | +1    | 0      | -1,414 | 0       | 2       | 0        | 94,1      | 94,39      |
| 8.      | +1    | 0      | +1,414 | 0       | 2       | 0        | 88,3      | 90,57      |
| 9.      | +1    | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 93,8      | 95,06      |
| 10.     | +1    | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 94,4      | 95,06      |
| 11.     | +1    | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 93,6      | 95,06      |
| 12.     | +1    | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 94,8      | 95,06      |
| 13.     | +1    | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 94,2      | 95,06      |

Efectuand calculele, se ajunge la urmatoarea ecuatie de regresie pentru randament:

$$y= 95,06+3,265x_1- 1,35x_2- 2,437x_1^2-1,287x_2^2-0,95x_1x_2 \quad (8)$$

Pentru a determina valoarea maxima a functiei, se apeleaza la conditiile necesare de extrem, obtinandu-se un sistem liniar si neomogen in necunoscutele  $x_1$  si  $x_2$  :

$$\begin{cases} (9) \quad \partial y / \partial x_1 = 3,265 - 2 \times 2,437x_1 - 0,95x_2 = 0 \\ (10) \quad \partial y / \partial x_2 = -1,35 - 2 \times 1,287x_2 - 0,95x_1 = 0 \end{cases}$$

Prin rezolvarea sistemului, se obtin valorile:

$$\begin{cases} x_1^0 = 0,832; \\ x_2^0 = -0,831 \end{cases}$$

care, dupa decodificare, conduc la urmatoarele valori ale parametrilor luati in discutie:

$$x_1 = 14 \text{ ore}$$

$$x_2 = 16^\circ\text{C}.$$

Valoarea randamentului maxim obtinut cu aceste valori este  $y_{\max} = y(x_1, x_2) = 96,98\%$ .

In figurile 13 si 14, se prezintă grafic (utilizand o secțiune din programul MATLAB) raspunsurile date de ecuatia de regresie pentru  $x_1=0,832$  (valoarea optima pentru parametrul timp de reactie) si  $x_2= -0,831$  (valoarea optima pentru parametrul temperatura).

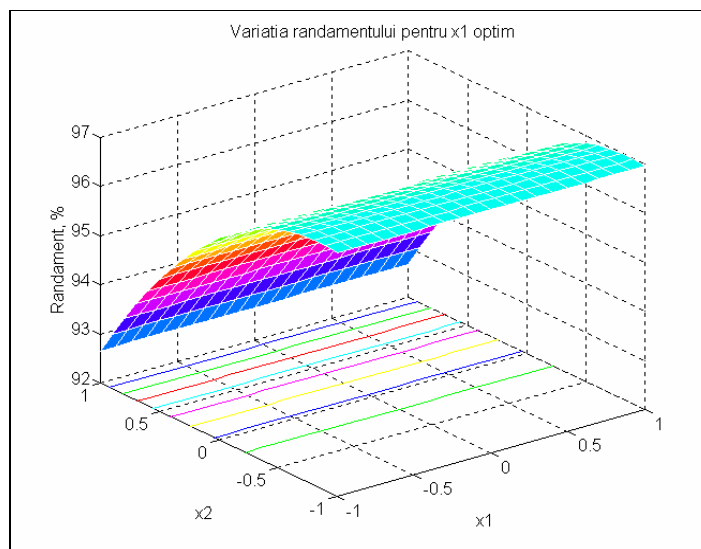


Figura 13: **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la timpul de reactie optim**

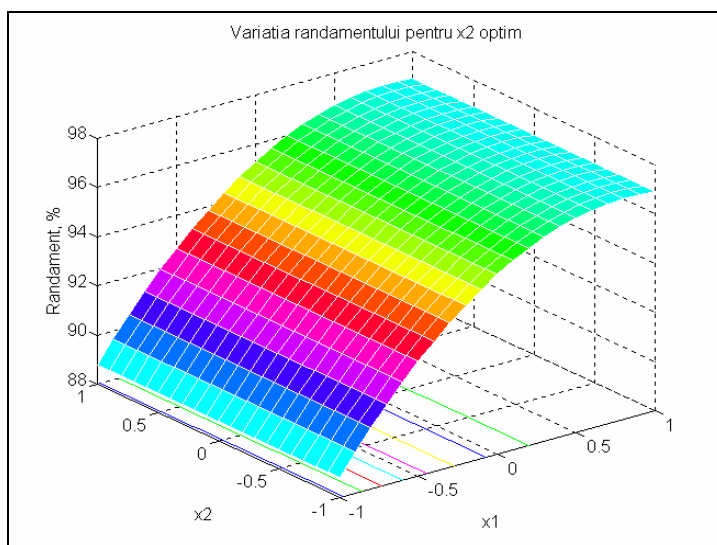


Figura 14: **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la temperatura de reactie optima**

În concluzie, pentru o valoare maximă a randamentului de reacție de 74,88%, în faza de inițiere, s-au obținut următoarele valori ale parametrilor independenți: raport molar 2-isopropoxietanol /alcool 4-hidroxibenzilic=13,535, timp de reacție = 156,9 minute și temperatura de reacție = 3,5 °C. În faza de perfectare a reacției, pentru o valoare maximă a randamentului de 96,985%, s-au obținut următoarele valori ale parametrilor independenți: timp de reacție = 14 ore și temperatura de reacție=16°C. Timpul total al reacției chimice de eterificare reprezintă suma timpurilor celor două etape distincte, respectiv 1116,9 minute.

Rezultatele modelării reacției de obținere a 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolului, prin reacția de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, în cataliză eterogenă, cu catalizator Amberlyst 15, au fost publicate într-un articol științific cu titlul "Mathematical Modeling of 4-[(2-isopropoxyethoxy)-methyl]phenol synthesis" [115].

#### 5.1.4. Modelarea neuronală a procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, în cataliză eterogenă, utilizând Amberlyst 15

Prin modelarea neuronală directă s-a urmărit simularea reacției de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol pentru cunoașterea cât mai completă a evoluției randamentului în produs, în interiorul și în exteriorul domeniului investigat experimental. În continuare, s-a realizat modelarea neuronală inversă pentru valori impuse ale randamentului, când rețeaua neuronală furnizează condițiile de operare necesare. În acest mod, utilizând și rezultatele modelării directe, s-a dorit obținerea condițiilor de reacție necesare pentru obținerea randamentului optim al procesului de sinteză studiat.

Similar modelării statistice, și modelarea neuronală a reacției de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, în cataliză eterogenă, cu Amberlyst 15, s-a efectuat distinct, pentru fiecare din cele două etape, inițiere și perfectare.

##### 5.1.4.1 Modelarea neuronală a procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, în cataliză eterogenă, cu Amberlyst 15 - faza de inițiere

###### Modelarea neuronală directă

Dezvoltarea modelelor neuronale s-a realizat utilizând 342 seturi de date experimentale. Dintre acestea, 90% au fost folosite la antrenarea rețelei și 10% au fost păstrate pentru faza de validare, constituind datele de verificare, nevazute, de modelul neuronal.

Pentru studiul reactiei in faza de initiere, intrarile rețelei neuronale sunt: raportul molar 2-isopropoxietanol/ alcool 4-hidroxibenzilic, timpul de reactie si temperatura. Iesirea este reprezentata de randamentul in produs. Astfel, *RNA* are trei marimi de intrare si o singura variabila de raspuns. Cea mai comuna structura de retea neuronală in investigatiile specifice ingineriei este de tip perceptron multistrat (*MLP*) [116].

Modelul optim s-a stabilit prin metoda incercarilor succesive, retinandu-se topologia pentru care eroarea de predictie este mai mica sau egala cu cea admisibila. Pentru toate straturile, s-au folosit functii de transfer de tip tangenta hiperbolica axon [120]:

$$f = \frac{1 - e^{-2x}}{1 + e^{-2x}} \quad (20)$$

Algoritmul de invatare cu cele mai bune rezultate pentru tipul de problema abordat este regula *Bar Delta Bar*. Antrenarea s-a efectuat in 10000 epoci. Precizia impusa a fost egala cu 0,000001.

Tabelul 25 contine diferite topologii ale rețelelor neuronale de tip *feed-forward* obtinute prin antrenare si performantele acestora: *MSE* (*Mean Square Error*, eroarea medie patratica), *r* (coeficientul de corelatie liniara dintre iesirea experimentală si cea furnizata de retea) si *MAE* (eroarea medie absoluta). Structura rețelei *MLP* (perceptron multistrat) este definita de numarul de neuroni din stratul de intrare, corespunzator celor trei variabile de intrare, stratul sau straturile intermediare si numarul de neuroni ascunsi si de numarul de neuroni din stratul de iesire, corespunzator variabilelor de iesire.

Tabelul 25: **Structura rețelei MLP**

| Performanta                          | MLP(3:3:1) | MLP(3:4:1) | MLP(3:5:1) |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| Eroarea medie patratica, MSE         | 1,09162769 | 0,74108875 | 0,75537184 |
| Eroarea medie absoluta, MAE          | 0,764581   | 0,674335   | 0,594155   |
| Coeficientul de corelatie liniara, r | 0,996535   | 0,997622   | 0,997624   |

Pe baza performantelor prezentate in tabelul 25, s-a stabilit ca modelul rețelei neuronale are un strat ascuns cu 5 neuroni si poate fi redat prin codul *MLP (3:5:1)*. Acest model este relativ simplu si prezinta performante bune la antrenare.

Cu modelul neuronal *MLP(3:5:1)* s-au obtinut predictii satisfacatoare fata de datele de antrenare. Eroarea relativa medie procentuala de 1,00466 % s-a calculat cu relatia:

$$e\% = \frac{y_{\text{exp}} - y_{\text{RNA}}}{y_{\text{exp}}} \cdot 100 \quad (21)$$

unde  $y_{\text{exp}}$  este randamentul experimental al reactiei si  $y_{\text{RNA}}$  este randamentul prognozat al reactiei chimice.

In figura 17, se prezinta datele experimentale versus datele estimate de *RNA*. Se observa o concordanta foarte buna.

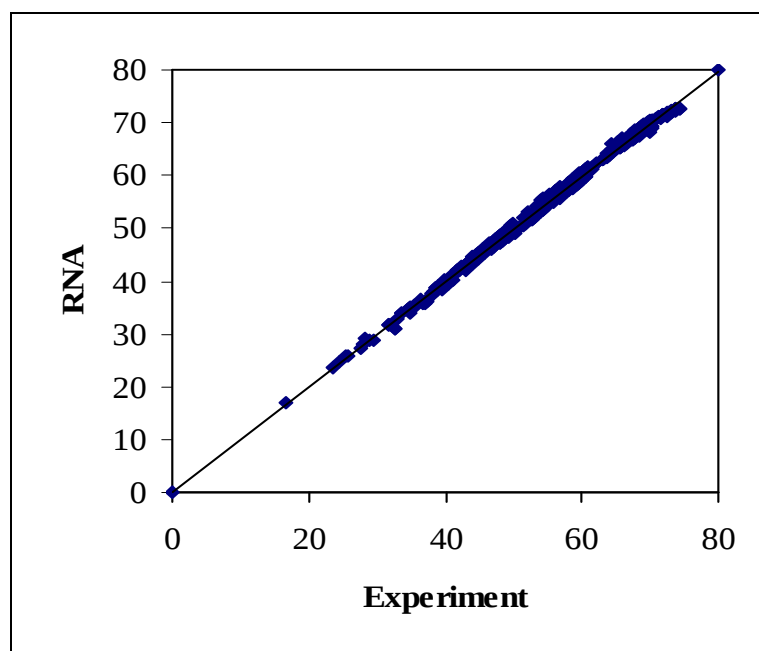


Figura 17: ***Randamentul experimental si predictiile obtinute cu modelul MLP (3:5:1) in faza de antrenare***

Modelarea neuronală directă furnizează rețeaua (grupul de formule) care descrie dependențele între datele experimentale care definesc procesul investigat. Apoi, modelul neuronal elaborat este aplicat, pentru câteva seturi de date experimentale, în scopul generării răspunsurilor necesare. Pentru validare, au fost utilizate date noi care nu au fost folosite în faza de antrenare a procesului. În cazul studiat, rețeaua *MLP(3:5:1)* a primit date de intrare neutilizate în procesul de antrenare și a generat valorile răspuns. Testarea modelului neuronal s-a efectuat pe 34 date experimentale noi, nefolosite la antrenare. Rezultate obținute sunt prezentate în tabelul 26 și figura 18.

Tabelul 26. ***Datele experimentale, predictiile fazei de validare și eroarea relativă***

| $x_1$ | $x_2$ | $x_3$ | Y     | Y <sub>Output</sub> | e%       |
|-------|-------|-------|-------|---------------------|----------|
| 10    | 1,5   | 8     | 37,71 | 37,61               | 0,277475 |
| 10    | 1,5   | 10    | 29,7  | 29,55               | 0,511657 |
| 12    | 2     | 0     | 51,68 | 52,77               | 2,106974 |
| 11    | 2     | 2     | 54,96 | 54,19               | 1,409753 |
| 11    | 2     | 4     | 55,56 | 54,68               | 1,580348 |
| 11    | 2     | 5     | 54,85 | 54,17               | 1,243257 |
| 11    | 2     | 6     | 53,47 | 52,56               | 1,694359 |
| 11    | 2     | 8     | 48,71 | 47,91               | 1,644865 |
| 11    | 2     | 10    | 41,26 | 41,23               | 0,063603 |
| 12    | 2     | 0     | 59,93 | 60,74               | 1,348115 |
| 12    | 2     | 2     | 63,19 | 63,01               | 0,277043 |
| 12    | 2     | 4     | 63,77 | 64,28               | 0,798076 |
| 12    | 2     | 5     | 63,06 | 64,39               | 2,111003 |
| 12    | 2     | 6     | 61,67 | 63,18               | 2,445108 |
| 12    | 2     | 8     | 56,89 | 57,11               | 0,392212 |
| 12    | 2     | 10    | 49,43 | 49,47               | 0,08317  |
| 13    | 2,5   | 0     | 65,36 | 65,02               | 0,527274 |
| 13    | 2,5   | 2     | 68,61 | 68,74               | 0,186967 |
| 13    | 2,5   | 4     | 69,17 | 69,43               | 0,374814 |

|    |     |    |       |          |          |
|----|-----|----|-------|----------|----------|
| 13 | 2,5 | 5  | 68,45 | 69,07    | 0,901338 |
| 13 | 2,5 | 6  | 67,06 | 67,79    | 1,090499 |
| 13 | 2,5 | 8  | 62,26 | 62,07    | 0,303    |
| 12 | 2,5 | 10 | 54,78 | 54,80    | 0,035097 |
| 13 | 2,5 | 0  | 67,97 | 67,27    | 1,031037 |
| 13 | 2,5 | 2  | 71,2  | 71,02    | 0,246632 |
| 13 | 2,5 | 4  | 71,75 | 71,39    | 0,495543 |
| 13 | 2,5 | 5  | 71,02 | 70,99    | 0,044837 |
| 13 | 2,5 | 6  | 69,62 | 69,91    | 0,419102 |
| 13 | 2,5 | 8  | 64,81 | 64,87    | 0,098222 |
| 13 | 2,5 | 10 | 57,31 | 57,77    | 0,804876 |
| 13 | 2,5 | 0  | 67,77 | 67,10    | 0,987417 |
| 13 | 2,5 | 2  | 70,98 | 70,86    | 0,166859 |
| 13 | 2,5 | 4  | 71,52 | 71,25    | 0,373114 |
| 13 | 2,5 | 5  | 70,78 | 70,84    | 0,089633 |
| 13 | 2,5 | 6  | 69,37 | 69,74    | 0,537354 |
| 13 | 2,5 | 8  | 64,54 | 64,61    | 0,108    |
| 13 | 2,5 | 10 | 57,02 | 57,43    | 0,726515 |
| 12 | 2,5 | 0  | 64,7  | 64,44    | 0,40857  |
| 13 | 2,5 | 2  | 67,95 | 68,04    | 0,135922 |
| 13 | 2,5 | 4  | 68,46 | 68,74    | 0,413226 |
| 13 | 2,5 | 5  | 67,72 | 68,37    | 0,956467 |
| 13 | 2,5 | 6  | 66,3  | 66,99    | 1,045446 |
| 13 | 2,5 | 8  | 61,45 | 61,07    | 0,618898 |
|    |     |    |       | E%medie= | 0,723574 |

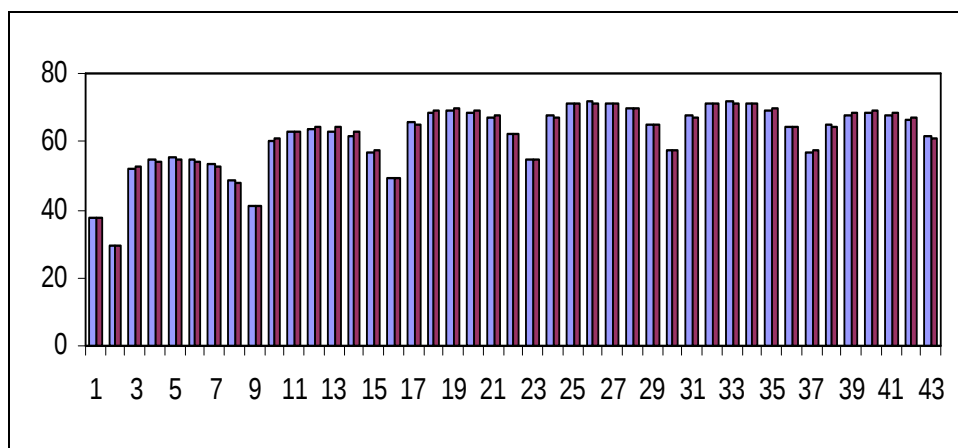


Figura 18: *Randamentul experimental si predictiile obtinute cu modelul MLP(3:5:1) in faza de validare*

Se poate observa o concordanta aproape perfecta intre datele experimentale si cele obtinute cu retea MLP(3:5:1).

Rezultatele bune obtinute in etapa de validare permit utilizarea modelului neuronal pentru a efectua predictii corespunzatoare unor conditii de operare neexperimentate. In acest scop, s-au considerat valori ale variabilelor independente in jurul optimului posibil de 75%, pentru randamentul in produs. Rezultatele obtinute se prezinta in figurile 19-21.

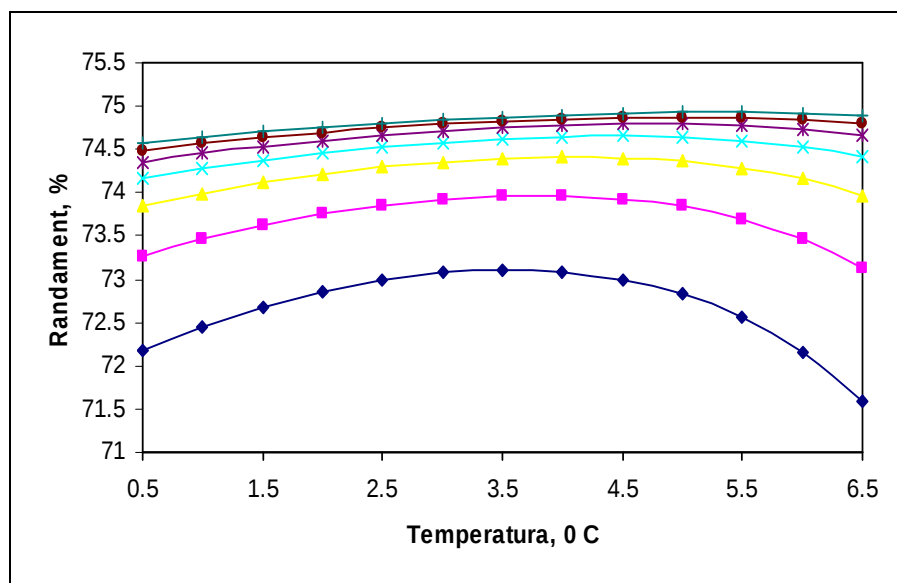


Figura 19: *Influenta temperaturii asupra randamentului la o durata de reactie de 140 min si raportul molar de: 13,5 - albastru, 14 - cian, 14,5 - galben, 15 - bleu, 15,5- grenă, 16- maro, 16,5-verde*

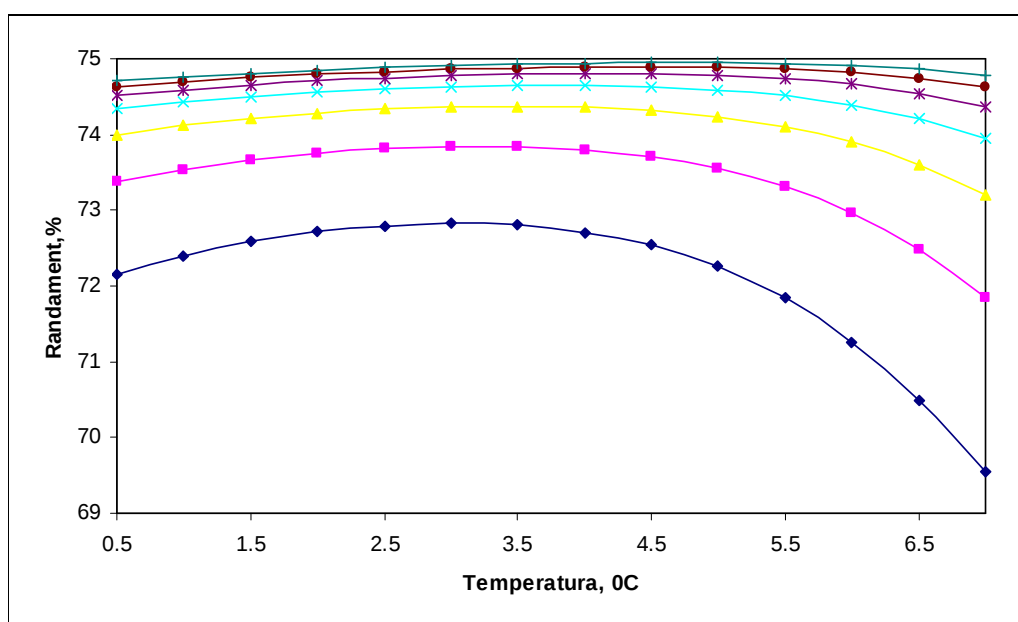


Figura 20: *Influenta temperaturii asupra randamentului la o durata de reactie de 160 min si raportul molar de: 13,5 - albastru, 14 - cian, 14,5 - galben, 15 - bleu, 15,5- grenă, 16- maro, 16,5-verde*

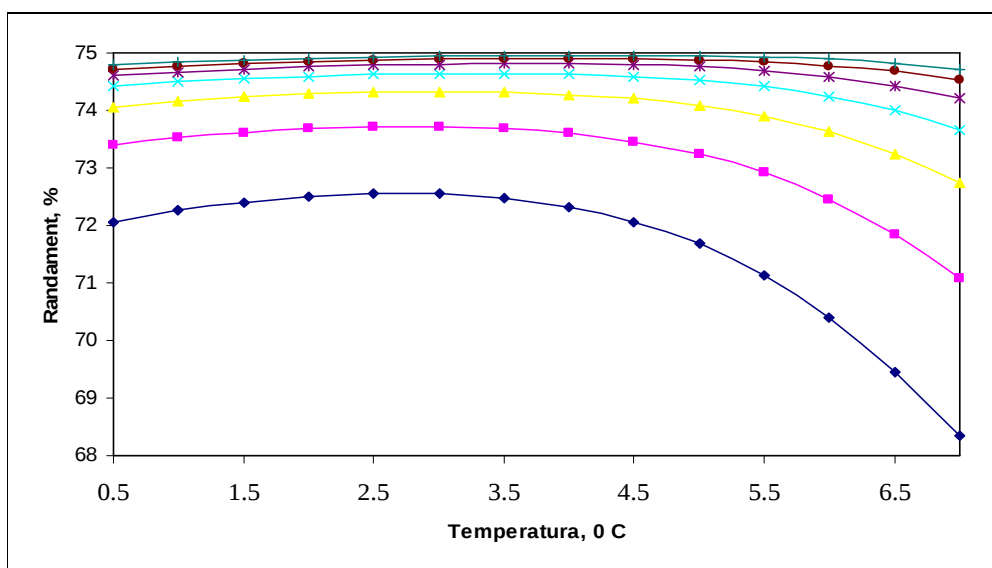


Figura 21: *Influenta temperaturii asupra randamentului la o durata de reactie de 180 min si raportul molar de: 13,5 - albastru, 14 - cian, 14,5 - galben, 15 - bleu, 15,5- grenă, 16- maro, 16,5-verde*

Din figurile de mai sus, se observa ca, la cresterea temperaturii peste 3,5°C, randamentul scade, asa cum s-a constatat si la proiectarea experimentului. Aceeasi diagrama arata si ca cresterea timpului de reactie peste 180 minute si a raportului molar al reactantilor peste 16 nu mai influenteaza randamentul reactiei.

#### 5.1.4.2. Modelarea neuronală a procesului de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, cu Amberlyst 15 - faza de perfectare

##### Modelarea neuronală directă

Metodologia de modelare aplicata in aceasta lucrare foloseste rețele neuronale simple, cu unul sau doua straturi ascunse, care se utilizeaza pentru studiul influentei temperaturii si timpului de reactie asupra randamentului reactiei terminale. Pentru determinarea modelului neuronal, cele 231 seturi de date au fost impartite in 208 pentru antrenare si 23 pentru testare. S-au luat in considerare doua intrari (timpul de reactie si temperatura) si o iesire (randamentul reactiei).

Procedeul utilizat la determinarea topologiei rețelei neuronale este cel al incercarilor succesive. S-au considerat diferite rețele neuronale la care s-au variat numarul de straturi ascunse, numarul de neuroni in fiecare strat si s-au analizat performantele antrenarilor (eroare medie patratica, corelatie, eroare procentuala).

Parametrii modelarii neuronale sunt:

- functia de activare – tangenta hiperbolica;
- algoritmul de invatare- delta Bar Delta;
- numarul maxim de epoci-10.000;
- precizia-0,000001.

Au fost testate rețele neuronale tip *perceptron multistrata si feedforward generalizata*. Topologia rețelei, numarul straturilor ascunse si al neuronilor de pe fiecare dintre acestea, s-a stabilit in faza de antrenare pentru mai multe rețele. Pe baza performantelor prezentate in tabelul 29, s-a stabilit ca modelul rețelei neuronale are un strat ascuns cu 3 neuroni si poate fi redat prin codul *MLP (2:3:1)*.

Parametrii statistici ce caracterizeaza antrenarea rețelei  $MLP(2:3:1)$ : coeficientul liniar de corelație ( $R$ ), eroarea medie patratică ( $MSE$ ) și eroarea medie absoluta ( $MAE$ ) (tabelul 30) indica faptul ca modelul neuronal descrie bine reactia studiata.

Tabelul 30. *Parametrii statistici pentru antrenarea rețelei MLP*

| Performanta                          | MLP(2:3:1) | MLP(2:5:1) | MLP(2:9:1) | GFF(2:3:1) | GFF(2:5:1) |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Eroarea medie patratică, MSE         | 0,052513   | 0,059066   | 0,056308   | 0,053209   | 0,053657   |
| Eroarea medie absoluta, MAE          | 0,162583   | 0,1791     | 0,171782   | 0,163648   | 0,165925   |
| Coeficientul de corelatie liniara, r | 0,995221   | 0,994666   | 0,994895   | 0,995159   | 0,995122   |

Performatele antrenarii se evidentiaza in figura 24.

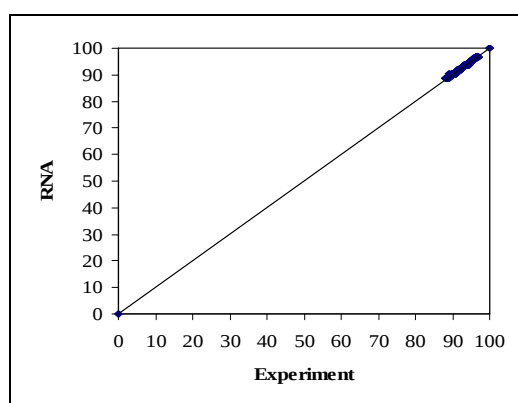


Figura 24: *Performantele etapei de antrenare*

Utilitatea modelelor neuronale este determinata de rezultatele etapei de validare. Pentru validare, au fost utilizate date noi care nu au fost folosite in faza de antrenare a procesului. In cazul studiat, rețeaua  $MLP(2:3:1)$  a primit date de intrare neutilizate in procesul de antrenare și a generat valorile raspuns. Rezultate obtinute sunt prezentate in figura 25.

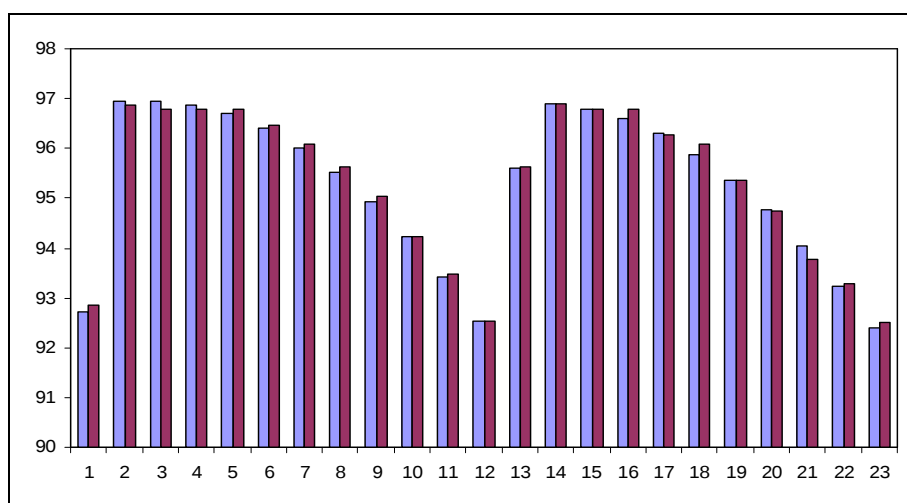


Figura25: *Randamentul reactiei terminale determinat experimental si predictiile modelului neuronal MLP(2:3:1) in etapa de validare*

Rezultatele bune obtinute in etapa de validare au permis utilizarea modelului neuronal pentru a efectua predictii corespunzatoare unor conditii noi, neexperimentate anterior. Pentru cunoasterea cat mai completa a procesului studiat, in vederea conducerii optimale a acestuia, s-au considerat valori ale variabilelor independente in jurul optimului posibil de 97%, pentru randamentul in produs. Rezultatele obtinute se prezinta in figura 26.

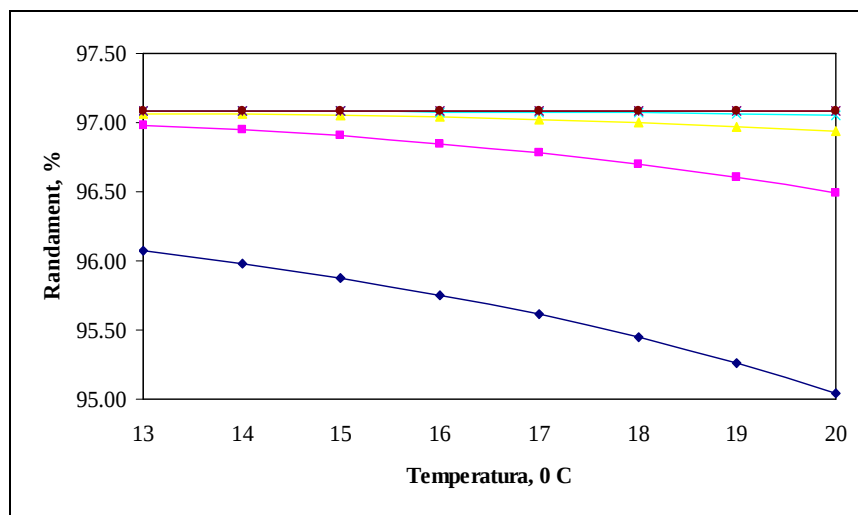


Figura 26: **Predictiile modelului neuronal MLP(2:3:1) la variatia temperaturii si a duratei de reactie: 11 ore -albastru, 13 ore-cian, 14 ore-galben, 15 ore-verde, 16 ore-marou.**

Din figura 26, se observa ca, la cresterea temperaturii, randamentul scade, asa cum s-a constatat si la proiectarea experimentului. Aceeasi diagrama arata si ca cresterea timpului de reactie peste 14 ore nu mai influenteaza randamentul reactiei. In concluzie, simularea efectuata cu ajutorul modelului neuronal MLP(2:3:1) confirma obtinerea randamentului optim de aproximativ 97% la un timp de reactie de 14 ore si o temperatura de 16 °C, ceea ce concorda cu modelarea statistica efectuata anterior. Rezultatele simularii neuronale indica, de asemenea, si ca optimul este stabil pentru variatii ale temperaturii de  $\pm 1$  °C pentru durata de 14 ore.

#### 5.1.5. Tehnologia de obtinere a 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolului, prin reactia de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena

Pe baza rezultatelor obtinute in urma modelarii reactiei de eterificare a alcoolului 4-hidroxibenzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, utilizand catalizatorul Amberlyst 15, s-a propus urmatorul mod de lucru, pentru faza de laborator:

Intr-un balon de reactie de 500 ml, se introduc 250 ml (2,183 mol) 2-isopropoxietanol si 20 g Amberlyst15, pe baie de gheata, mentinuta la temperatura de 3,5°C, sub agitare energica. 20 g alcool 4-hidroxibenzilic (0,161 mol) se adauga, in portiuni de 1,78 g, timp de 5 ore. Amestecul de reactie se agita, la temperatura de 3,5°C, timp de 158 minute, dupa care se aduce la temperatura camerei (16°C) si se agita energic inca 14 ore. Dupa expirarea timpului de reactie, amestecul de reactie se filtreaza, catalizatorul recuperat spalandu-se pe filtru cu 15 ml 2-isopropoxietanol. Filtratul se trateaza cu 0,85 g carbonat de potasiu si se agita energic 30 minute. Dupa expirarea acestui timp, excesul de carbonat de potasiu se filtreaza, iar amestecul de reactie se distila, recuperandu-se astfel excesul de 2-isopropoxietanol.

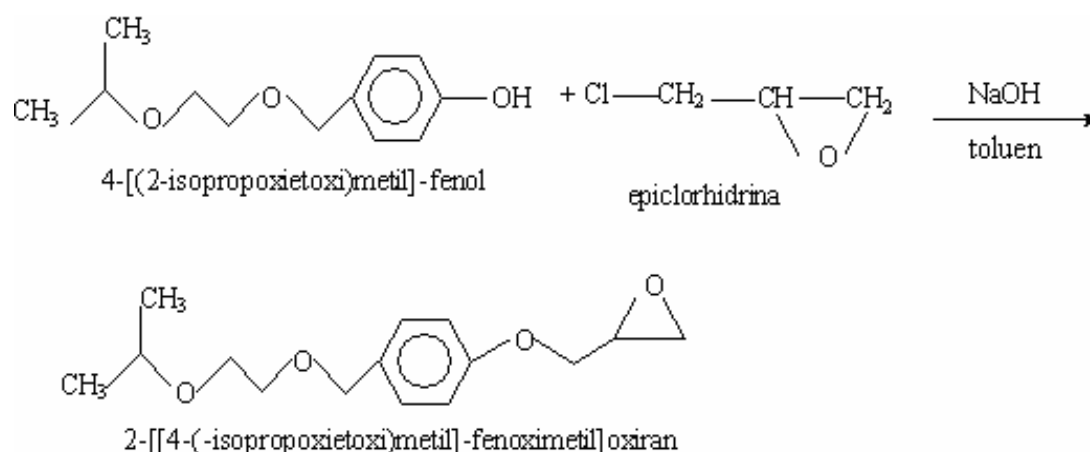
Intr-o palnie de separare, 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolul obtinut se reia in 120 ml toluen, si se spala de 3 ori cu un volum de 120 ml apa/spalare. Extractul toluenic se separa si se trateaza cu o solutie de hidroxid de sodiu (preparata in prealabil prin solvirea a 4,8 g hidroxid de sodiu in 72 ml apa),

obtinandu-se 36,20 g 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolat de sodiu, intermediar ce va fi utilizat in etapa urmatoare.

## 5.2. STUDIUL REACTIEI DE CONDENSARE A INTERMEDIARULUI 4-[(2-ISOPROPOXIETOXI)METIL-FENOL] CU EPICLORHIDRINA

### 5.2.1. Condensarea intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol] cu epiclorhidrina

Aceasta reactie consta in alchilarea la gruparea fenolica a derivatului obtinut in etapa precedenta, cu epiclorhidrina, in mediu bazic, in prezenta unui hidroxid alcalin, obtinandu-se 2-[[4-(-isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil]oxiran, conform reactiei chimice:



Pentru a stabili corect parametrii de realizare a proceselor chimice, s-a realizat un studiu de modelare matematica, prin metoda planificarii experimentelor si utilizarii ecuatiilor de regresie. Urmarierea gradului de avansare a reactiei se realizeaza prin dozarea cantitativa a epichlorhidrinei, iar pentru aceasta am elaborat o metoda cromatografica, ce a fost dezvoltata in cadrul cercetarilor intreprinse.

### 5.2.2 Elaborarea metodei analitice de determinare a concentratiei epichlorhidrinei

Avansarea procesului chimic s-a urmarit prin determinarea concentratiei epichlorhidrinei in masa de reactie. Datele de literatura indica diverse posibilitati de dozare a epichlorhidrinei, HPLC sau GC-MS, in diverse medii [121–125]. Pentru determinarea concentratiei epichlorhidrinei in masa de reactie, s-a elaborat o metoda de analiza bazata pe cromatografia de lichide de inalta presiune, avand urmatoorii parametri operationali:

Coloana cromatografica: Zorbax Eclipse XDB CN, 4.6 \* 100mm (Agilent)

Temperatura coloanei : 35°C

Faza mobila: apa pt. cromatografie : acetonitril = 60 : 40 (v/v)

Debit: 1,2 ml/min

Detectie: fluorescenta, la lungimea de unda de excitatie 262 nm, si lungimea de unda de emisie 490 nm

Volum de injectie: 75 µl

Tip de injectie: Automata

Temperatura autosampler: 10°C

Substantele si reactivii chimici folositi in aplicarea acestei metode sunt prezentati in tabelul 35.

Tabelul 35. **Substante si reactivi chimici utilizati pentru determinarea epiclorhidrinei**

| Substanta / Reactiv chimic                 | Puritate/ Provenienta |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| epiclorhidrina                             | Merck                 |
| dioxan                                     | Merck                 |
| Acetonitril                                | HPLC                  |
| Metanol                                    | HPLC                  |
| Apa pentru cromatografie                   | Eu. Ph.               |
| Acid 9,10 dimetoxioxiantracen -2- sulfonic | Merck                 |

Instrumentul cromatografic utilizat pentru determinarea concentratiei epiclorhidrinei este descris in tabelul 36.

Tabelul 36. **Caracteristicile instrumentului analitic utilizat pentru determinarea epiclorhidrinei**

| Instrument        | Marca/ Model                    |
|-------------------|---------------------------------|
| Autosampler       | Agilent Technologies Seria 1100 |
| Microdegazor      | Agilent Technologies Seria 1100 |
| Pompa cuaternara  | Agilent Technologies Seria 1100 |
| Termostat coloana | Agilent Technologies Seria 1100 |
| Detector UV       | Agilent Technologies Seria 1100 |

Validarea metodei de determinare a epiclorhidrinei a constat in verificarea caracteristicilor esentiale a unei metode analitice: liniaritate, limita de cuantificare, acuratete si precizie.

### 5.2.3. Modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina

Reactia de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina decurge in mediu de toluen, in prezenta hidroxidului de sodiu. De asemenea, in scopul imbunatatirii randamentului de reactie, s-a folosit, drept catalizator de transfer de faza, polietilen glicol (PEG-400). In ultimii ani, solutiile apoase de polietilenglicol H-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH (PEG) au fost folosite in numeroase reactii chimice organice. Toxicitatea scazuta, volatilitatea scazuta, stabilitatea ridicata la temperaturi inalte de pana la 200°C), stabilitatea in medii acide si bazice, precum si biodegradabilitatea acestor compusi reprezinta doar cateva avantaje ale utilizarii lor, alaturi de costul redus si usurinta in manipulare [129].

Astfel, am propus modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina atat in absenta, cat si in prezenta PEG-400, comparand ulterior randamentele de reactie, in cele doua situatii.

#### 5.2.3.1. Modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina- in absenta PEG-400

##### a) Programarea experientelor. Variabile si codificari

Experimentele preliminare precum si datele din literatura au indicat dependenta randamentului reactiei de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina, in absenta PEG -400, de urmatoorii parametri independenti: timp de reactie si temperatura de reactie.

S-a ales ca program de experimentare un program central compus rotabil si s-a propus ca model pentru estimarea randamentului o ecuatie de regresie de gradul 2, de forma:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{12}x_1x_2 \quad (22)$$

In tabelele urmatoare, sunt prezentate valorile reale si codificate ale variabilelor (tabelul 38) si respectiv programul de desfasurare al experimentelor (tabelul 39).

Tabelul 38. *Nivelurile variabilelor independente*

| Nr. crt. | Parametri determinanti pentru reactie | Codificarea parametrilor | Nivelul de codificare |    |     | Interval de variatie |
|----------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|----|-----|----------------------|
|          |                                       |                          | -1                    | 0  | +1  |                      |
| 1.       | Timpul de reactie, ore                | $x_1$                    | 0,5                   | 1  | 1,5 | 0,5                  |
| 2.       | Temperatura de reactie, °C            | $x_2$                    | 40                    | 60 | 80  | 20                   |

b) Obtinerea ecuatiei de regresie si interpretarea rezultatelor

Efectuand calculele conform procedurii uzuale, se ajunge la urmatoarea ecuatie de regresie pentru randament:

$$y = 75 - 0,7125x_1 - 14,01x_2 - 16,366x_1^2 - 16,954x_2^2 - 8,925x_1x_2 \quad (23)$$

Tabelul 39. *Matrice de experimentare (program central compus rotabil) si randamentele obtinute*

| Nr.crt. | $x_1$  | $x_2$  | $x_1^2$ | $x_2^2$ | $x_1x_2$ | $y_{exp.}$ | $y_{calc.}$ |
|---------|--------|--------|---------|---------|----------|------------|-------------|
| 1.      | -1     | -1     | +1      | +1      | +1       | 46,50      | 47,48       |
| 2.      | +1     | -1     | +1      | +1      | -1       | 62,10      | 63,90       |
| 3.      | -1     | +1     | +1      | +1      | -1       | 37,30      | 37,31       |
| 4.      | +1     | +1     | +1      | +1      | +1       | 17,20      | 18,03       |
| 5.      | -1,414 | 0      | 2       | 0       | 0        | 43,60      | 43,27       |
| 6.      | +1,414 | 0      | 2       | 0       | 0        | 42,75      | 41,26       |
| 7.      | 0      | -1,414 | 0       | 2       | 0        | 62,50      | 60,90       |
| 8.      | 0      | +1,414 | 0       | 2       | 0        | 21,50      | 21,28       |
| 9.      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 75,00      | 75,00       |
| 10.     | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 73,90      | 75,00       |
| 11.     | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 74,60      | 75,00       |
| 12.     | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 75,40      | 75,00       |
| 13.     | 0      | 0      | 0       | 0       | 0        | 76,10      | 75,00       |

Pentru a determina valoarea maxima a functiei, se apeleaza la conditiile necesare de extrem, obtinandu-se un sistem liniar si neomogen in necunoscutele  $x_1$  si  $x_2$  :

$$\begin{cases} (24) \partial y / \partial x_1 = -0,7125 - 32,732x_1 - 8,925x_2 = 0 \\ (25) \partial y / \partial x_2 = -14,01 - 8,925x_1 - 33,908x_2 = 0 \end{cases}$$

Prin rezolvarea sistemului, se obtin valorile:

$$\begin{cases} x_1^0 = 0,0979 \\ x_2^0 = -0,439 \end{cases}$$

care, dupa decodificare, conduc la urmatoarele valori ale parametrilor luati in discutie:

- timp de reactie: 1,05 ore (63 minute);
- temperatura: 51,2°C.

Valoarea maximului este data de  $y_{max} = y(x_1, x_2) = 78,04\%$ .

In figurile 30 si 31, se prezinta grafic (utilizand o sectiune din programul MATLAB) raspunsurile date de ecuatie de regresie pentru  $x_1 = 0,0979$  (valoarea optima pentru parametrul timp de reactie),  $x_2 = -0,439$  (valoarea optima pentru parametrul temperatura) .

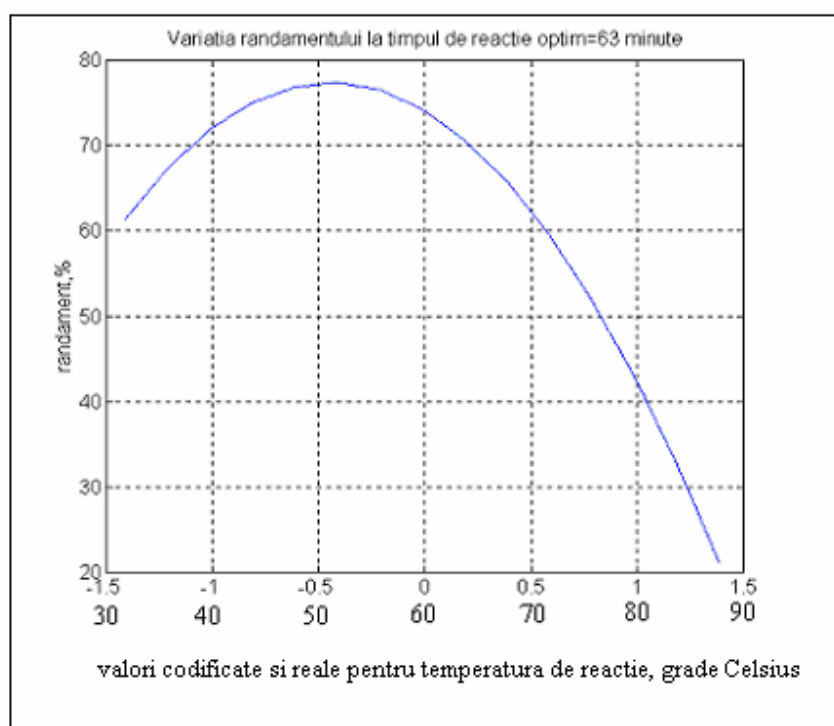


Figura 30 : **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la timpul de reactie optim**

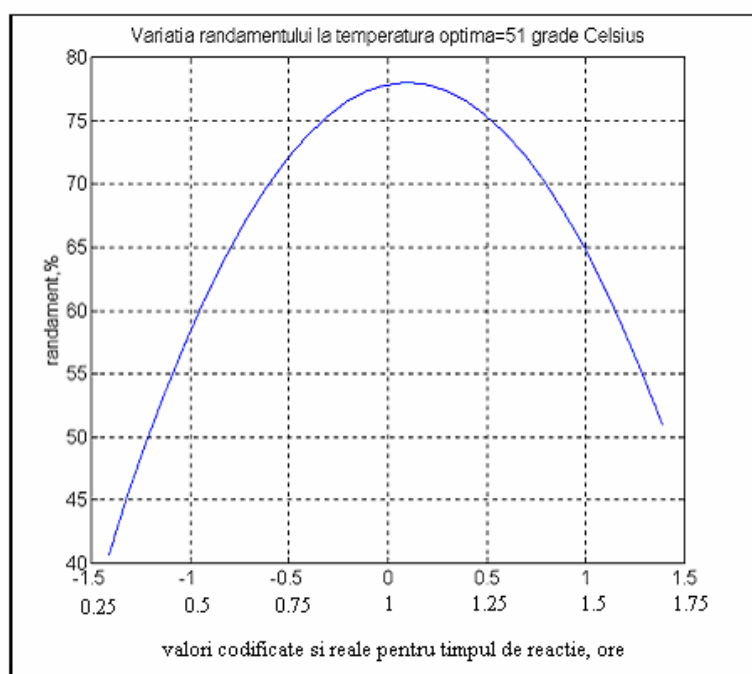


Figura 31 : **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la temperatura de reactie optima**

### 5.2.3.2. Modelarea procesului de condensare a intermediarului 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol cu epiclorhidrina - in prezenta PEG-400

#### a) Programarea experimentelor. Variabile si codificari

Experimentele preliminare, precum si datele din literatura, au indicat dependenta randamentului reactiei de condensare, in prezenta PEG-400, de urmatoorii parametri independenti:

- Timp de reactie;
- Temperatura de reactie;
- Raport molar PEG-400 / 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol.

S-a ales ca program de experimentare un program central compus rotabil si s-a propus ca model pentru estimarea randamentului o ecuatie de regresie de gradul 2, de forma:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (26)$$

In tabelele urmatoare, sunt prezentate valorile reale si codificate ale variabilelor (tabelul 40) si, respectiv, programul de desfasurare al experimentelor (tabelul 41).

Tabelul 40. *Nivelurile variabilelor independente*

| Nr. crt. | Parametri determinanti pentru reactie                     | Codificarea parametrilor | Nivelul de codificare |      |      | Interval de variatie |
|----------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|------|------|----------------------|
|          |                                                           |                          | -1                    | 0    | +1   |                      |
| 1.       | Timpul de reactie, ore                                    | $x_1$                    | 0,5                   | 1    | 1,5  | 0,5                  |
| 2.       | Temperatura de reactie, °C                                | $x_2$                    | 40                    | 60   | 80   | 20                   |
| 3.       | Raportul molar Isopropoxietanol/ alcool 4-hidroxibenzilic | $x_3$                    | 0,20                  | 0,35 | 0,50 | 0,15                 |

#### c) Obținerea ecuației de regresie și interpretarea rezultatelor

Efectuand calculele conform procedurii uzuale, se ajunge la urmatoarea ecuatie de regresie pentru randament:

$$\hat{y} = 78,09 + 0,13x_1 - 10x_2 + 5,49x_3 - 11,34x_1^2 - 11,54x_2^2 - 8,31x_3^2 - 8,81x_1x_2 + 2,31x_1x_3 + 1,01x_2x_3 \quad (27)$$

Tabelul 41. *Matrice de experimentare (program central compus rotabil) si randamentele obtinute*

| Nr. crt. | $x_1$  | $x_2$  | $x_3$ | $x_1^2$ | $x_2^2$ | $x_3^2$ | $x_1x_2$ | $x_1x_3$ | $x_2x_3$ | $y_{exp.}$ | $y_{calc.}$ |
|----------|--------|--------|-------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|------------|-------------|
| 1.       | -1     | -1     | -1    | +1      | +1      | +1      | +1       | +1       | +1       | 45,95      | 45,79       |
| 2.       | +1     | -1     | -1    | +1      | +1      | +1      | -1       | -1       | +1       | 58,77      | 59,05       |
| 3.       | -1     | +1     | -1    | +1      | +1      | +1      | -1       | +1       | -1       | 40,97      | 41,39       |
| 4.       | +1     | +1     | -1    | +1      | +1      | +1      | +1       | -1       | -1       | 19,76      | 19,41       |
| 5.       | -1     | -1     | +1    | +1      | +1      | +1      | +1       | -1       | -1       | 50,27      | 50,13       |
| 6.       | +1     | -1     | +1    | +1      | +1      | +1      | -1       | +1       | -1       | 72,17      | 72,63       |
| 7.       | -1     | +1     | +1    | +1      | +1      | +1      | -1       | -1       | +1       | 50,20      | 49,77       |
| 8.       | +1     | +1     | +1    | +1      | +1      | +1      | +1       | +1       | +1       | 37,10      | 37,03       |
| 9.       | -1,682 | 0      | 0     | 2,828   | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 45,49      | 45,80       |
| 10.      | +1,682 | 0      | 0     | 2,828   | 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 45,89      | 46,24       |
| 11.      | 0      | -1,682 | 0     | 0       | 2,828   | 0       | 0        | 0        | 0        | 62,59      | 62,27       |
| 12.      | 0      | +1,682 | 0     | 0       | 2,828   | 0       | 0        | 0        | 0        | 27,66      | 28,63       |

|     |   |   |        |   |   |       |   |   |   |       |       |
|-----|---|---|--------|---|---|-------|---|---|---|-------|-------|
| 13. | 0 | 0 | -1,682 | 0 | 0 | 2,828 | 0 | 0 | 0 | 45,74 | 45,36 |
| 14. | 0 | 0 | +1,682 | 0 | 0 | 2,828 | 0 | 0 | 0 | 63,52 | 63,82 |
| 15. | 0 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 77,42 | 78,09 |
| 16. | 0 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 78,00 | 78,09 |
| 17. | 0 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 77,92 | 78,09 |
| 18. | 0 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 77,91 | 78,09 |
| 19. | 0 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 77,77 | 78,09 |
| 20. | 0 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 78,37 | 78,09 |

Pentru a determina valoarea maxima a functiei, se apeleaza la conditiile necesare de extrem, obtinandu-se un sistem liniar si neomogen in necunoscutele  $x_1$ ,  $x_2$  si  $x_3$  :

$$\begin{cases} (28) \quad \partial y / \partial x_1 = 0,13 - 22,68x_1 - 8,81x_2 + 2,31x_3 = 0 \\ (29) \quad \partial y / \partial x_2 = -10 - 23,08x_2 - 8,81x_1 + 1,01x_3 = 0 \\ (30) \quad \partial y / \partial x_3 = 5,49 - 16,62x_3 + 2,31x_1 + 1,01x_2 = 0 \end{cases}$$

Prin rezolvarea sistemului, se obtin valorile:

$$\begin{cases} x_1^0 = 0,2373 \\ x_2^0 = -0,5094 \\ x_3^0 = 0,3308 \end{cases}$$

care, dupa decodificare, conduc la urmatoarele valori ale parametrilor luati in discutie:

- timp de reactie: 1,12 ore;
- temperatura: 50°C;
- raport molar PEG-400- 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol]: 0,4

Valoarea maximului este data de  $y_{\max} = y(x_1, x_2, x_3) = 81,56\%$ .

Se constata ca utilizarea PEG-400 a permis cresterea randamentului de reactie de la 78,04% la 81,56%.

In figura 32, se reprezinta grafic, utilizand o sectiune din programul MATLAB, raspunsurile date de ecuatia de regresie pentru  $x_1 = 0,2373$  (valoarea optima pentru timpul de reactie),  $x_2 = -0,5094$  (valoarea optima pentru temperatura) si  $x_3 = 0,4$  (valoarea optima pentru raportul molar PEG-400- 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol]).

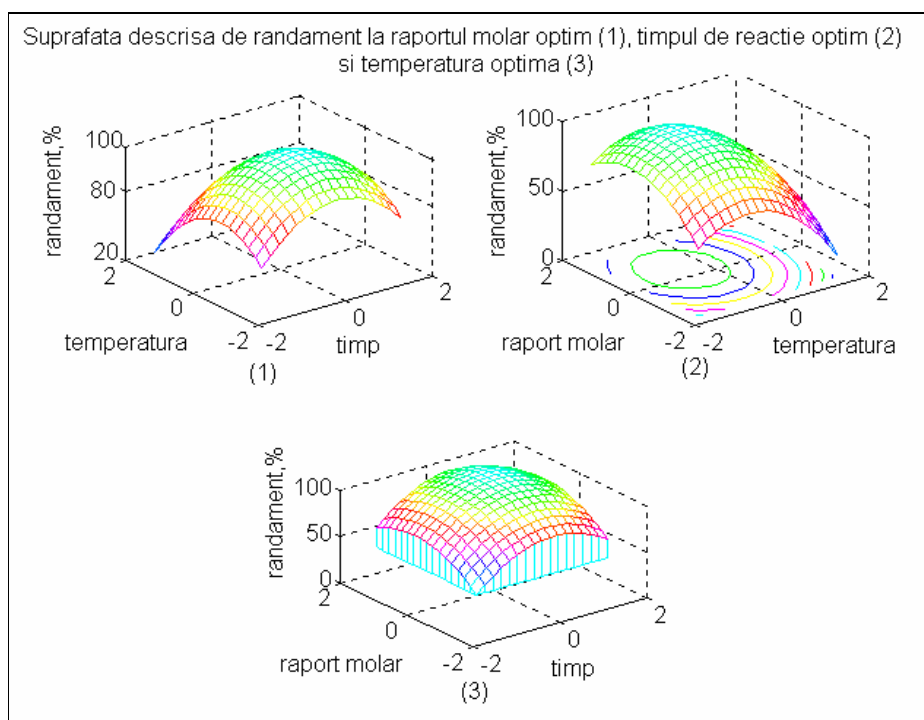


Figura 32: **Reprezentarea grafica a ecuatiei de regresie la raportul molar PEG-400- 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol (1), timpul de reactie(2) si temperatura de reactie (3) optime**

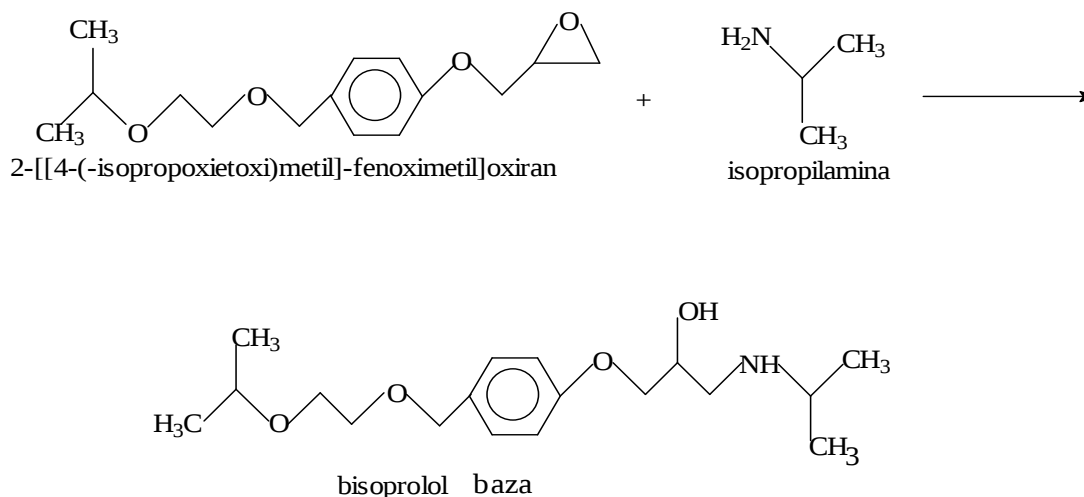
#### 5.2.4. Tehnologia de obtinere a 2-[[4-(-isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil]oxiranului, prin reactia de condensare a 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolului cu epiclорhidrina, in prezenta PEG-400

Pe baza rezultatelor obtinute in urma modelarii reactiei de condensare a 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolului cu epiclорhidrina, s-a concluzionat ca, in cazul utilizarii PEG-400 drept catalizator de transfer de faza, randamentul de reactie are o valoare mai mare decat in cazul neutilizarii lui. De asemenea, folosirea PEG-400 a condus la o usoara scadere a temperaturii de reactie. Prin urmare, s-a propus urmatorul mod de lucru:

36,20 g (0,156 mol) 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenolat de sodiu, obtinut in etapa anterioara, se trateaza cu 28g PEG-400 (0,062 mol) si 15 g (0,16 mol) epiclорhidrina. Amestecul de reactie se incalzeste la temperatura de 50°C, si se agita energic, timp de 67 minute. Dupa perfectarea reactiei, amestecul de reactie se raceste si se extrage in 30 ml toluen. Ulterior, extractul toluenic se trateaza cu 3,4 g hidroxid de sodiu (0,06 mol), agitandu-se energic, timp de 30 minute. Dupa expirarea acestui timp, amestecul de reactie se spala de trei ori cu apa (30 ml apa / spalare). Extractul toluenic se separa si, ulterior, se distila toluenul, obtinandu-se cantitatea de 34,90 g 2-[[4-(-isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil]oxiran. Randament de reactie: 81,56%.

### 5.3. CONDENSAREA DERIVATULUI EPOXIDIC CU ISOPROPILAMINA SI OBTINEREA BISOPROLOLULUI BAZA

Aceasta reactie are ca rezultat obtinerea bisoprololului baza, prin condensarea 2-[[4-(-isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil]oxiranului, obtinut in etapa anterioara, cu isopropilamina, conform reactiei chimice:



In mod practic, aceasta reactie s-a realizat astfel:

Intr-un vas de reactie de 500 ml, se introduc 34,90 g 2-[[4-(-isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil]oxiran si 60 ml metanol. In acest amestec, se adauga 0,45 g borohidrura de sodiu, in portiuni de 0,045 g, sub agitare energica, timp de o ora. Dupa expirarea acestui timp, se adauga 13 ml ( 0,15mol ) isopropilamina. Amestecul de reactie se agita energic si se incalzeste la reflux, timp de 3 ore. Ulterior, amestecul de reactie se distila, indepartandu-se astfel excesul de isopropilamina si metanol. Uleiul rezidual se extrage in 45 ml cloroform si se spala de trei ori cu apa (45 ml apa / spalare). Extractul cloroformic se depune pe un suport de alumina, timp de 4-6 ore, dupa care se spala cu inca 45 ml cloroform. Noul extract cloroformic se distila, obtinandu-se astfel 41,75 g bisoprolol baza. Randament de reactie: 79,91%.

### 5.4. OBTINEREA BISOPROLOLULUI FUMARAT. SEPARAREA SI PURIFICAREA PRODUSULUI OBTINUT

Pentru a putea fi conditionat sub forma de comprimate cu eliberare imediata si, ulterior, utilizat in terapeutica, administrat sub forma orala, este necesara obtinerea bisoprololului sub forma unor saruri farmaceutic acceptabile. Acizii organici ce pot fi utilizati in sinteza unor astfel de saruri pot fi alifatici sau aromatici, carboxilici si/sau sulfonici [130].

Cercetarile intreprinse au avut drept scop obtinerea bisoprololului fumarat, din bisoprololul baza, prin tratarea acestuia cu acid fumaric, conform reactiei chimice:



Tabelul 46. *Valorile obtinute pentru parametrii de calitate ai bisoprololului fumarat*

| Nr. crt. | PARAMETRI                                                                                                                    | CRITERII DE ADMISIBILITATE                                                                                       | REZULTATE                                                |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 1.       | Aspect                                                                                                                       | Pulbere cristalina de culoare alba                                                                               | corespunde                                               |
| 2.       | Solubilitate                                                                                                                 | Usor solubil in alcool, acid acetic si cloroform; foarte usor solubil in apa, metanol, acetona si acetat de etil | corespunde                                               |
| 3.       | Identificare IR                                                                                                              | Conform standard                                                                                                 | corespunde                                               |
| 4.       | Apa, max. %                                                                                                                  | 0,5                                                                                                              | 0,20                                                     |
| 5.       | Metale grele, max. %                                                                                                         | 0,002                                                                                                            | <0,002                                                   |
| 6.       | Reziduu calcinare, max. %                                                                                                    | 0,10                                                                                                             | 0,05                                                     |
| 7.       | Substante inrudite<br>-Impuritati A si E<br>-total impuritati, max. %<br>-Impuritati A si G<br><br>-total impuritati, max. % | A : <0,3%<br>E : <0,2%<br>-Alte impuritati: <0,1%-0,5<br>- G: <0,5%<br>-A: <0,3%<br>-Alte impuritati: <0,1%-0,5  | -0,104<br>-0,093<br>-0,031<br>-0,417<br>-0,234<br>-0,152 |
| 8.       | Rotatie optica specifica, $\alpha_D^{20}$                                                                                    | -2 - +2°                                                                                                         | -1,95                                                    |
| 9.       | Continut in bisoprolol fumarat,%<br>(raportat la substanta uscata)                                                           | 99-101%                                                                                                          | 100,19                                                   |
| 10.      | Continut in acid fumaric,%<br>raportat la substanta uscata                                                                   | 14,8-15,4                                                                                                        | 15,10                                                    |

## Cap. 6. FORME DE CONDITIONARE A BISOPROLOLULUI FUMARAT SI STABILITATEA ACESTORA

### 6.1. Studii privind conditionarea bisoprololului fumarat sub forma de comprimate filmate

#### 6.1.1. Evaluarea parametrilor reologici pentru pulberile de bisoprolol fumarat utilizate la realizarea comprimatelor filmate

Pentru realizarea comprimatelor filmate de bisoprolol fumarat, s-au utilizat urmatorii excipienti : celuloza microcristalina tip 102, amidon pregelatinizat, croscarmeloza sodica, dioxid de siliciu coloidal anhidru, stearat de magneziu si filme formate din alcool polivinilic partial hidrolizat, dioxid de titan (E 171), macrogol 4000/macrogol 3350, talc, si oxizi de fier (E 172).

S-a studiat reologia pulberilor care au fost supuse comprimarii. Astfel, s-a testat comportarea pulberilor omogenizate (inainte de comprimare), obtinute prin urmatoarele variante tehnologice:

1. varianta 1 (pulbere pentru compresie directa):

omogenizare→lubrifiere

2. varianta 2 (pulbere obtinuta prin granulare umeda):

omogenizare→granulare umeda→uscare→calibrare→lubrifiere

3. varianta 3 (pulbere obtinuta prin granulare uscata):

omogenizare→compactare→lubrifiere

S-au realizat comprimate filmate continand 5, respectiv 10 mg bisoprolol fumarat, prin comprimarea pulberilor omogenizate cu substanta activa si procesate conform variantelor 1-3. Compozitiile de lucru sunt prezentate in tabelul 50.

Tabelul 50. **Compozitia pulberilor utilizate la conditionarea bisoprololului fumarat sub forma de comprimate**

| A. Comprimate filmate 5 mg (nucleu)                                                                                                                                                                                                                                                                                        | B. Comprimate filmate 10 mg (nucleu)                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Varianta 1</i></p> <p>-bisoprolol fumarat compactat echivalent cu 5 mg bisoprolol fumarat</p> <p>- celuloza microcristalina</p> <p>-amidon pregelatinizat</p> <p>-croscarmeloza sodica</p> <p>-dioxid de siliciu coloidal anhidru</p> <p>-stearat de magneziu</p>                                                    | <p><i>Varianta 1</i></p> <p>-bisoprolol fumarat compactat echivalent cu 10 mg bisoprolol fumarat</p> <p>- celuloza microcristalina</p> <p>-amidon pregelatinizat</p> <p>-croscarmeloza sodica</p> <p>-dioxid de siliciu coloidal anhidru</p> <p>-stearat de magneziu</p>                                                    |
| <p><i>Varianta 2</i></p> <p>-bisoprolol fumarat pulbere echivalent cu 5 mg bisoprolol fumarat</p> <p>- celuloza microcristalina</p> <p>-amidon pregelatinizat</p> <p>-croscarmeloza sodica</p> <p>-dioxid de siliciu coloidal anhidru</p> <p>-stearat de magneziu</p> <p>-polivinilpirolidona (solutie in isopropanol)</p> | <p><i>Varianta 2</i></p> <p>-bisoprolol fumarat pulbere echivalent cu 10 mg bisoprolol fumarat</p> <p>- celuloza microcristalina</p> <p>-amidon pregelatinizat</p> <p>-croscarmeloza sodica</p> <p>-dioxid de siliciu coloidal anhidru</p> <p>-stearat de magneziu</p> <p>-polivinilpirolidona (solutie in isopropanol)</p> |
| <p><i>Varianta 3</i></p> <p>-bisoprolol fumarat compactat echivalent cu 5 mg bisoprolol fumarat</p> <p>- celuloza microcristalina</p> <p>-amidon pregelatinizat</p> <p>-croscarmeloza sodica</p> <p>-dioxid de siliciu coloidal anhidru</p> <p>-stearat de magneziu</p>                                                    | <p><i>Varianta 3</i></p> <p>-bisoprolol fumarat compactat echivalent cu 10 mg bisoprolol fumarat</p> <p>- celuloza microcristalina</p> <p>-amidon pregelatinizat</p> <p>-croscarmeloza sodica</p> <p>-dioxid de siliciu coloidal anhidru</p> <p>-stearat de magneziu</p>                                                    |

Parametrii reologici obtinuti pentru pulberile astfel formulate sunt prezentati in tabelul 51.

Tabelul 51. **Parametrii de curgere a pulberilor de bisoprolol fumarat realizate prin cele 3 variante**

| Nr. crt. | Varianta de lucru | Tip de comprimant | Dens.vol. (g/ml) |           | Diametrul orificiului critic (mm) | Unghi de repaus (grd.) | Compresibilitate (%) | Indice compus de curgere |
|----------|-------------------|-------------------|------------------|-----------|-----------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
|          |                   |                   | initial a        | la tasare |                                   |                        |                      |                          |
| 1.       | V1                | A                 | 0,28             | 0,47      | 15                                | 43                     | 31,5                 | 62,1                     |
| 2.       | V2                | A                 | 0,32             | 0,42      | 11                                | 36                     | 19                   | 78,3                     |

|    |    |   |      |      |      |    |      |      |
|----|----|---|------|------|------|----|------|------|
| 3. | V3 | A | 0,29 | 0,49 | 12,5 | 40 | 28,4 | 66,7 |
| 4. | V1 | B | 0,38 | 0,69 | 15,5 | 48 | 33,6 | 61,8 |
| 5. | V2 | B | 0,43 | 0,61 | 11,5 | 39 | 23,2 | 77,6 |
| 6. | V3 | B | 0,40 | 0,72 | 12,5 | 44 | 30,5 | 65,5 |

În urma analizării rezultatelor obținute, se constată următoarele:

-Conform studiului realizat, cea mai bună curgere o are pulberea realizată prin varianta 2 (granulare umedă), confirmată și de obținerea prin această variantă a celor mai uniforme comprimate, atât din punct de vedere al dozei/comprimat, cât și din punct de vedere a uniformității masei.

-Ca urmare a corelațiilor stabilite între valorile indicelui compus de curgere și comportarea la comprimare a pulberilor realizate prin cele trei variante, se poate considera că acest indice este un indicator prezumtiv privind comportamentul unui amestec de pulberi ce va fi supus comprimării.

-În cazul comprimatelor cu eliberare imediată (fildate), indicele compus de curgere trebuie acceptat cu moderatie, deoarece, pe lângă testele de uniformitate, comprimatele trebuie să corespundă și testelor de dezagregare și dizolvare, comportare independentă de valoarea indicelui compus de curgere.

#### **6.1.2. Efectul dimensiunilor particulelor și naturii excipientilor asupra vitezei de eliberare a bisoprololului fumarat din comprimate**

Cercetările întreprinse au urmărit influența dimensiunii particulelor de substanță activă, precum și a naturii aglutinantului, asupra vitezei de dizolvare *in vitro* a comprimatelor de bisoprolol fumarat obținute prin procedeul de granulare umedă; studiile efectuate au avut ca obiectiv selectarea variantei optime de formulare în vederea obținerii de comprimate cu biodisponibilitate superioară. De asemenea, s-a urmărit stabilirea unui model matematic empiric care să permită evaluarea profilului de dizolvare în funcție de cantitatea de aglutinant, excipient care influențează hotărâtor dizolvarea comprimatelor realizate prin procedee de granulare umedă. Utilizând modelul matematic, s-a stabilit cantitatea de aglutinant care asigură realizarea de comprimate cu un profil de dizolvare foarte apropiat de cel al medicamentului inovator.

##### **6.1.2.1. Stabilirea dimensiunilor particulelor și a naturii aglutinantului în vederea obținerii de comprimate de bisoprolol fumarat cu dizolvare conform USP 29**

Pentru a studia influența naturii aglutinantului în vederea obținerii de comprimate de bisoprolol fumarat cu dizolvare conform USP 29, s-au folosit următorii aglutinanti: metilceluloză, polivinilpirolidonă K30 (PVP) și gelatină albă, precum și restul excipientilor din formulare, respectiv celuloză microcristalină, amidon pregelatinizat, croscarmeloză sodică, dioxid de siliciu coloidal anhidru, stearat de magneziu. Compoziția comprimatelor de bisoprolol fumarat este prezentată în tabelul 52.

Tabelul 52. *Compoziția comprimatelor de 10 mg bisoprolol fumarat*

| Nr. crt. | Ingredient                         | Masă / comprimat (mg) | % / comprimat (raportat la nucleu) |
|----------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 1.       | Bisoprolol fumarat                 | 10,00                 | 8,340                              |
| 2.       | Celuloză microcristalină           | 52,57                 | 43,805                             |
| 3.       | Aglutinant                         | 0,96                  | 0,800                              |
| 4.       | amidon pregelatinizat              | 52,57                 | 43,805                             |
| 5.       | croscarmeloză sodică               | 2,64                  | 2,200                              |
| 6.       | dioxid de siliciu coloidal anhidru | 0,96                  | 0,8                                |
| 7.       | stearat de magneziu                | 0,30                  | 0,250                              |

|    |                                  |        |     |
|----|----------------------------------|--------|-----|
|    | Masa totala comprimat neacoperit | 120    | 100 |
| 8. | Film Opadry® II 85F 24297        | 4,20   | -   |
|    | Total                            | 124,20 | -   |

In studiu, s-a utilizat urmatoarea aparatura:

- granulator umed de laborator tip Erweka;
- calibrator cu bare oscilante tip Erweka;
- masina de comprimat monopost;
- tester de dizolvare Pharmatest;
- aparat HPLC Agilent 1200.

Granularea umeda s-a realizat dupa urmatorul procedeu general: bisoprololul fumarat pulbere s-a omogenizat cu aproximativ jumatate din cantitatea de celuloza microcristalina, apoi s-a granulat cu solutia apoasa de aglutinant. Dupa uscare la umiditate de 12-15%, granulatul s-a calibrat pe sita de 0,8mm si s-a omogenizat cu restul excipientilor. Pulberea granulata s-a supus apoi comprimarii la forta medie, obtinandu-se comprimate biconvexe cu diametrul de 7 mm.

Dizolvarea comprimatelor s-a efectuat conform metodei descrise in USP 29, pe aparatul 2. Testul s-a desfasurat utilizand 900 ml apa distilata, la temperatura de  $37 \pm 5^\circ\text{C}$  si o viteza de agitare de 75 rotatii/minut. Esantioanele pentru analiza (s-au prelevat probe de cate 5 ml) au fost colectate manual la intervale de timp bine definite, pe parcursul a 20 minute, si au fost filtrate pe filtru de  $0,45 \mu\text{m}$ . Volumul de proba prelevat a fost inlocuit cu acelasi volum de apa distilata, la temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Dupa dilutia coresunzatoare cu apa distilata, concentratia in bisoprolol fumarat a fost determinata, utilizand o metoda HPLC, avand urmatoorii parametri:

Instrument analitic: Agilent Technologies seria 1200;  
 Coloana cromatografica: Chromolith Speed Rod RP-18e (4.6\*50 mm) (Merck);  
 Temperatura coloanei:  $25^\circ\text{C}$ ;  
 Faza mobila: tampon fosfat monopotasie 0.02M, pH 3: acetonitril:metanol= 60:14:26 (v/v);  
 Debit: 1 ml/min;  
 Detectie: UV, la lungimea de unda 227 nm;  
 Volum de injectie: 20  $\mu\text{l}$ ;  
 Tip de injectie: automata;  
 Temperatura autosampler:  $20^\circ\text{C}$ .

Conditia de dizolvare, conform USP 29: *minim 80% bisoprolol fumarat dizolvat in 20 minute.*

Rezultatele obtinute la dizolvarea comprimatelor realizate prin granularea pulberii de bisoprolol fumarat, in conditiile efectuarii granularii cu fiecare din cele trei tipuri de solutii de aglutinanti, sunt prezentate in tabelul 54.

**Tabelul 54. Dizolvarea comprimatelor de bisoprolol fumarat obtinute prin granularea umeda cu pulbere de substanta activa , utilizand diversi aglutinanti**

| Nr. crt. | Timp (min) | % bisoprolol fumarat dizolvat |      |               |
|----------|------------|-------------------------------|------|---------------|
|          |            | metilceluloza                 | PVP  | gelatina alba |
| 1.       | 5          | 19,5                          | 35,4 | 18,4          |
| 2.       | 10         | 40,2                          | 55,8 | 34,2          |
| 3.       | 15         | 59,5                          | 71,2 | 52,5          |
| 4.       | 20         | 69,8                          | 84,7 | 62,2          |

Profilele de dizolvare obtinute pentru fiecare dintre cele trei pulberi sunt prezentate in figura 41.

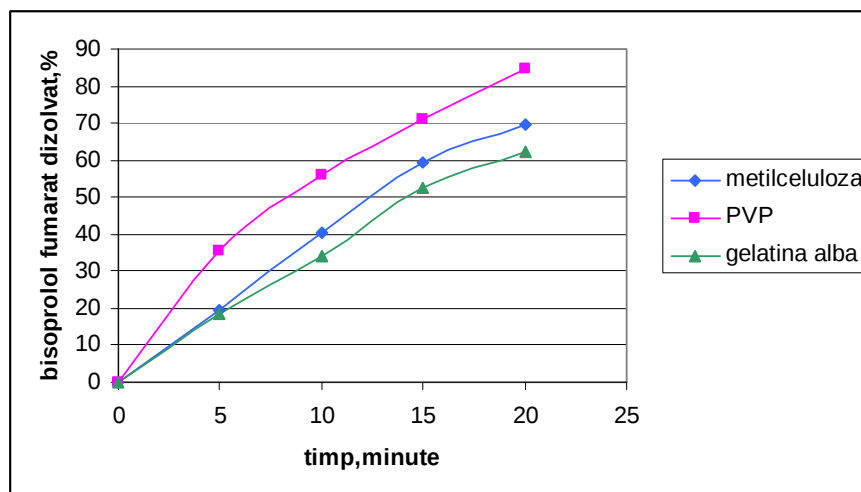


Figura 41: *Profilele de dizolvare ale comprimatelor de bisoprolol fumarat obtinute prin granulare umeda, cu pulbere de substanta activa, utilizand diversi aglutinanti*

Analizand datele obtinute, se constata ca conditia de dizolvare o indeplinesc doar comprimatele realizate cu PVP. Comprimatele realizate cu metilceluloza si gelatina alba prezinta o dizolvare necorespunzatoare. Deoarece PVP este un aglutinant accesibil si asigura dizolvarea cea mai buna, s-a studiat comportarea la dizolvare a comprimatelor de bisoprolol fumarat in functie de cantitatea de PVP utilizata la granulare.

#### 6.1.2.2. Modelarea procesului de dizolvare a comprimatelor de bisoprolol fumarat functie de cantitatea de aglutinant

In scopul modelarii procesului de dizolvare a comprimatelor de bisoprolol fumarat functie de cantitatea de aglutinant, s-a utilizat una dintre variantele de modelare empirica bazata pe un numar relativ redus de date experimentale. Astfel, s-a urmarit stabilirea unui model matematic pentru dizolvarea comprimatelor de bisoprolol fumarat obtinute din granulate cu PVP, pe baza rezultatelor experimentale obtinute la dizolvarea comprimatelor continand 0,8%, 1,5%, respectiv 3% PVP.

In cazul utilizarii unei cantitati de aglutinant mai mica de 0,8%, procentul de particule neaglutinate depaseste 30%, cu implicatii negative asupra curgerii. Un procent de aglutinant mai mare de 3% are drept consecinta cresterea fortei de coeziune intre particule, ceea ce duce la cresterea duritatii comprimatelor si, implicit, a timpului de dezagregare.

Scopul modelarii este stabilirea cantitatii de aglutinant care conduce la un profil de dizolvare apropiat de cel al medicamentului de referinta. Modelarea realizata s-a bazat pe regresia liniara; ecuatiile de dizolvare a bisoprololului fumarat din comprimate redau dependenta vitezei de dizolvare de timp si de continutul in PVP. Modelul stabilit permite evaluarea comportarii la dizolvare a comprimatelor de bisoprolol fumarat pentru orice valoare a concentratiei de PVP din intervalul studiat, respectiv 0,8-3%.

Profilul de dizolvare a fost determinat conform USP 29. Cantitatea de bisoprolol fumarat dizolvat s-a determinat prin metoda HPLC descrisa anterior.

Comprimatele s-au realizat conform formulei prezentate, cresterea sau scaderea cantitatii de PVP facandu-se pe seama diluantului (celuloza microcristalina). Astfel, s-au realizat comprimate de 10 mg bisoprolol fumarat cu un continut de 0,8 mg PVP/ comprimat (0,8%), 1,8 mg PVP/comprimat (1,5%), respectiv 3,6 mg PVP/comprimat (3%).

Pentru a stabili modelul matematic prin regresie liniara pe baza rezultatelor experimentale obtinute in urma dizolvarii comprimatelor cu continuturile de PVP precizate mai sus, este necesara parcurgerea urmatoarelor etape:

1. Se determina profilul de dizolvare pentru cele trei formulari;

- Prin interpolarea datelor experimentale, se stabileste un model cinetic liniar de tipul:  

$$y = mx + n \quad (31)$$
  - Se determina cea mai buna corelatie intre concentratia in PVP si panta dreptelor, respectiv intersectia acestora cu ordonata si se calculeaza ecuatie de regresie;
  - Se introduc panta si intersectia cu ordonata in ecuatie generala;
  - Se verifica modelul obtinut prin compararea valorilor calculate pe baza acestuia cu cele obtinute experimental si se determina adecvanta modelului pentru intervalul de incredere considerat, respectiv 95%;
- S-au obtinut urmatoarele rezultate:
- Profilele de dizolvare pentru cele trei tipuri de comprimate de bisoprolol fumarat (comprimate test) comparativ cu cel al produsului de referinta sunt prezentate in tabelul 55.

Tabelul 55. **Profilele de dizolvare a celor trei tipuri de comprimate cu bisoprolol fumarat (comprimate test) comparativ cu cel al comprimatelor de referinta**

| Timp (min) | % bisoprolol fumarat dizolvat |                 |           |         |
|------------|-------------------------------|-----------------|-----------|---------|
|            | Comprimate referinta          | Comprimate test |           |         |
|            |                               | PVP 0,8%        | PVP 1,5 % | PVP 3 % |
| 5          | 43,4                          | 31,3            | 42,9      | 44,7    |
| 10         | 66,2                          | 50,5            | 64,4      | 67,1    |
| 15         | 79,6                          | 65,3            | 77,8      | 81,6    |
| 20         | 87,4                          | 80,6            | 85,3      | 88,8    |
| 30         | 96,3                          | 86,7            | 94,9      | 97,5    |
| 40         | 100,1                         | 91,1            | 96,6      | 103,9   |

Reprezentarea grafica a profilelor de dizolvare este prezentata in figura 42.

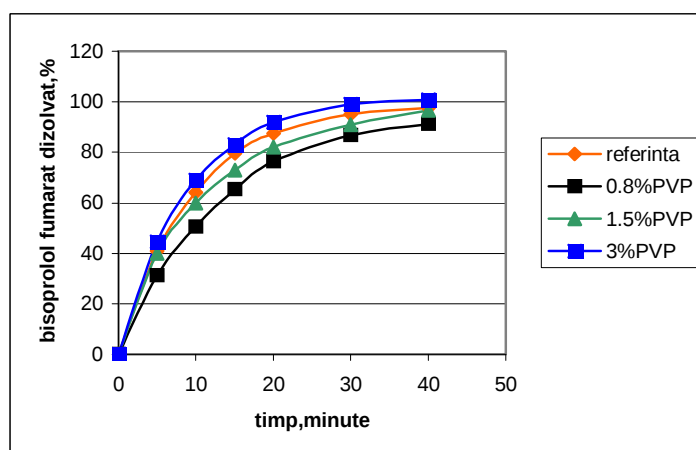


Figura 42: **Profilele de dizolvare ale comprimatelor de bisoprolol fumarat obtinute cu diverse proportii de aglutinanti comparativ cu produsul referinta**

- Prin interpolarea datelor experimentale, se obtin urmatoarele ecuatii liniarizate de tip Higuchi [149]:

-Pentru referinta:

$$A_{dizR} = 18,857\sqrt{t} + 7,7771 \quad (32)$$

(coeficient de corelatie = 0,9552)

-Pentru comprimatele cu PVP 0,8%:

$$A_{diz1} = 16,244\sqrt{t} + 4,6463 \quad (33)$$

(coeficient de corelatie = 0,9577)

-Pentru comprimatele cu PVP 1,5 %:

$$A_{diz2} = 16,582\sqrt{t} + 5,6376 \quad (34)$$

(coeficient de corelatie = 0,9526)

-Pentru comprimatele cu PVP 3%:

$$A_{diz3} = 18,376\sqrt{t} + 8,8674 \quad (35)$$

(coeficient de corelatie = 0,9557)

in care  $A_{diz}$  = %bisoprolol fumarat dizolvat si  $t$  = timp (minute)

Liniarizarea a fost posibila deoarece toti coeficientii de corelatie au valori mai mari de 0,95. Reprezentarea grafica a dreptelor de interpolare este redata in figura 43.

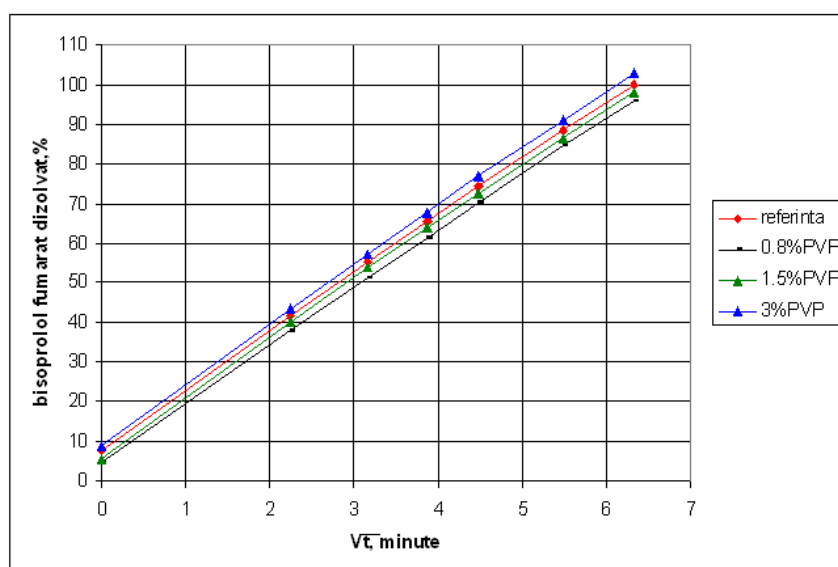


Figura 43: **Reprezentarea grafica a modelelor cinetice de tip Higuchi**

3. Pentru determinarea ecuatiilor de corelatie intre concentratia PVP si panta, respectiv intercept, se utilizeaza valorile obtinute din ecuatiile precedente.

| Continut de PVP, % | Panta (m) | Intercept (n) |
|--------------------|-----------|---------------|
| 1                  | 16,244    | 4,6463        |
| 3                  | 16,582    | 5,6376        |
| 5                  | 18,376    | 8,8674        |

Se obtin urmatoarele corelatii:

-Pentru panta:

$$\bar{y} = 1,0052 \times C_{PVP} + 15,292 \quad (36)$$

(coeficient de corelatie = 0,9718)

-Pentru intercept:

$$\bar{y} = 1,9558 \times C_{PVP} + 2,9285 \quad (37)$$

(coeficient de corelatie = 0,9919)

in care  $C_{PVP}$  = continutul de PVP din comprimate, %.

Reprezentarea grafica a ecuatiilor obtinute este redada in figura 44.

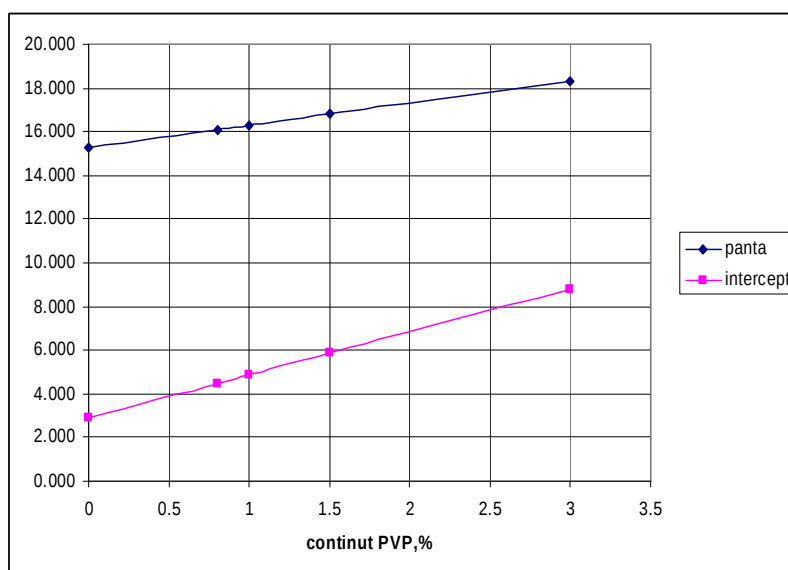


Figura 44: **Grafica ecuatiilor pentru panta si intercept**

4. Se introduc expresiile obtinute pentru panta si intercept in ecuatia (1), in care  $x = \sqrt{t}$ . Se obtine ecuatia generala:

$$\bar{y} = (1,0052 \times C_{PVP} + 15,292) \times \sqrt{t} + (1,9558 \times C_{PVP} + 2,9285) \quad (38)$$

5. Pentru verificarea modelului matematic stabilit, s-a procedat astfel: s-au realizat comprimate de bisoprolol fumarat prin granulare cu 2% PVP. Ulterior, utilizand modelul matematic, s-a calculat procentul de bisoprolol fumarat dizolvat, dupa care comprimatele au fost supuse testului de dizolvare *in vitro*, determinandu-se astfel profilul de dizolvare experimental.

Valorile calculate si, respectiv, cele obtinute experimental au fost utilizate pentru calculul adecvantei modelului (tabelul 56).

Tabelul 56. **Valori ale procentului de bisoprolol fumarat dizolvat calculate conform ecuatiei generale si rezultatele experimentale pentru profilele de dizolvare**

| Timp, minute | % bisoprolol fumarat dizolvat |                    | Diferente dintre valorile calculate si experimentale, % |
|--------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------|
|              | calculat                      | experimental       |                                                         |
| 5            | 45,53                         | 43,16              | 2,37                                                    |
| 10           | 61,55                         | 59,62              | 1,93                                                    |
| 15           | 73,85                         | *69,25;70,48;70,95 | 3,77                                                    |
| 20           | 84,22                         | 81,54              | 2,68                                                    |
| 30           | 101,61                        | 99,73              | 1,88                                                    |
| 40           | 105,27                        | 102,39             | 2,88                                                    |

\*valori obtinute la experimentele replicate

In figura 45, sunt reprezentate comparativ profilele de dizolvare (calculat si experimental) pentru comprimatele de bisoprolol fumarat cu 2% PVP.

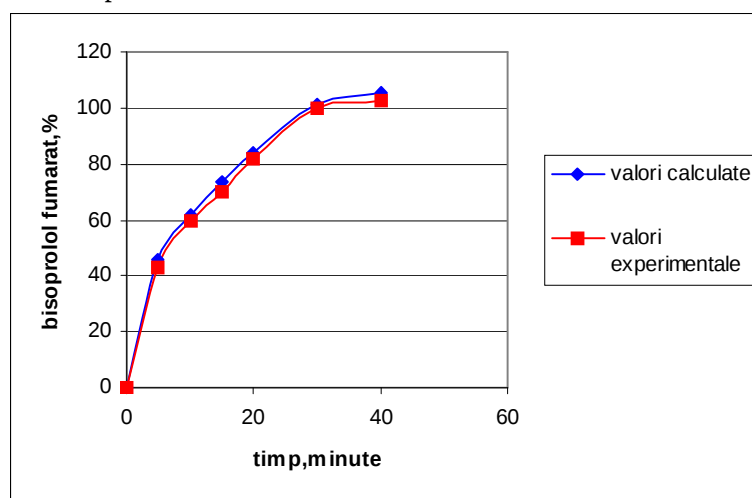


Figura 45: **Profilele de dizolvare (calculat si experimental) pentru comprimatele de bisoprolol fumarat cu 2% PVP**

Se observa ca profilele calculate sunt foarte apropiate de cele obtinute experimental. Pentru confirmarea utilizarii modelului matematic pe intreg intervalul studiat, s-a calculat adecvanta acestuia cu ajutorul testului Fischer, pentru un interval de incredere de 95% . Pentru experientele replicate s-au efectuat trei determinari la timpul  $t = 15$  minute; analiza de adecvanta a luat in considerare doua grade de libertate. Dispersiile datorate erorilor de experienta ( $s_1^2$ ) si, respectiv, abaterii valorilor calculate pe baza modelului matematic fata de cele obtinute experimental ( $s_2^2$ ) au valorile:

$$s_1^2 = 42,566$$

$$s_2^2 = 7,094$$

Valoarea pentru testul Fischer se calculeaza cu relatia:

$$F_{calc.} = s_2^2 / s_1^2 \quad (39)$$

$$F_{calc.} = 0,167$$

Valoarea critica pentru distributia Fischer, pentru un interval de incredere de 95%, este:

$$F_{(95\%, 2, 5)} = 19,296$$

Deoarece  $F_{\text{calc}} \ll F_{(95\%,2,5)}$ , rezulta ca modelul este adecvat.

Analizand figura 43, se constata ca profilul de dizolvare al comprimatelor de referinta se situeaza intre cele ale comprimatelor realizate cu 1,5% PVP, respectiv cu 3% PVP. Pentru a stabili continutul de PVP din comprimatele de bisoprolol fumarat care sa asigure un profil de dizolvare cat mai apropiat de cel al produsului de referinta, s-a calculat, conform ecuatiei generale, profilul de dizolvare pentru comprimate cu un continut de PVP intre 1,6 si 2,8 %, respectiv cu 1,6%, 2,2%, 2,5% si 2,8 %PVP.

Profilele de dizolvare calculate comparativ cu profilul de dizolvare experimental al referintei sunt reprezentate in figura 46. Se observa ca, pentru obtinerea unui profil apropiat de cel al referintei, este necesara utilizarea in formula comprimatelor a unei cantitati de PVP cuprinsa intre 2,5 si 2,8%. Pentru 2,7% PVP, comprimatele au dizolvarea practic identica cu a produsului de referinta (figura 47).

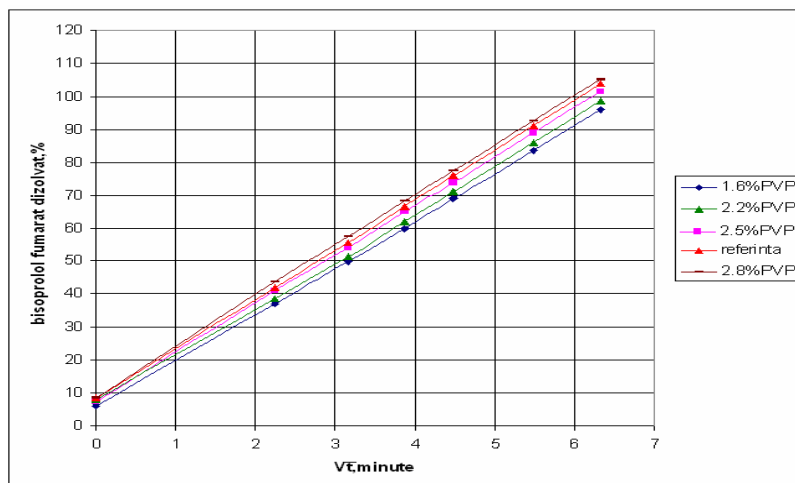


Figura 46: **Profilele de dizolvare calculate pentru comprimatele de bisoprolol fumarat cu diferite cantitati de PVP (1,6-2,8%) comparativ cu cel al produsului de referinta**

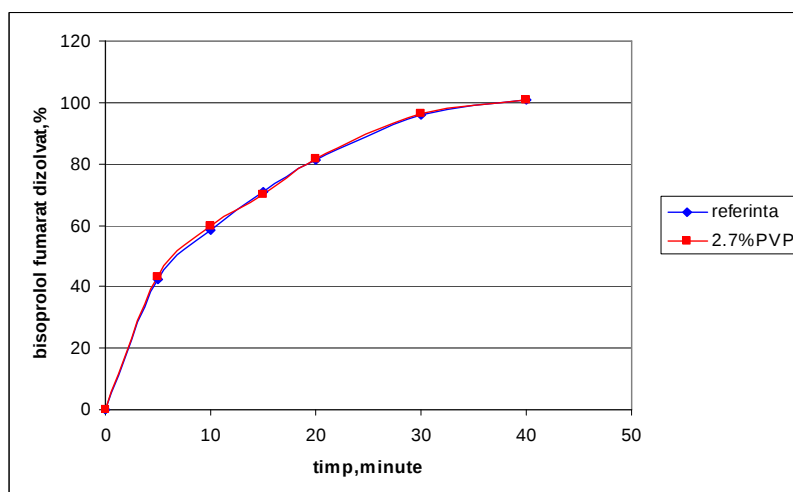


Figura 47: **Profilul de dizolvare al comprimatelor cu 2,7% PVP comparativ cu cel al produsului de referinta**

Studiile efectuate au condus la urmatoarele concluzii:

1. Natura si cantitatea de aglutinant utilizata la formularea comprimatelor de bisoprolol fumarat influenteaza comportarea la dizolvare a comprimatelor realizate;
2. Studiul efectuat a permis selectarea ca optima pentru realizarea de comprimate varianta care utilizeaza PVP, ca aglutinant;
3. S-a stabilit un model matematic care permite evaluarea profilului de dizolvare al comprimatelor in functie de cantitatea de PVP utilizata in granulara umeda;
4. S-a verificat experimental modelul matematic stabilit si s-a confirmat adecvanta modelului cu ajutorul testului Fischer;
5. Pe baza modelului stabilit, s-a determinat cantitatea optima de aglutinant (2,7%), ce asigura comprimatelor test o dizolvare practic similara cu a comprimatelor de referinta;
6. Optimizarea profilului de dizolvare *in vitro* al comprimatelor de bisoprolol fumarat reprezinta premisa realizarii unui produs farmaceutic cu biodisponibilitate superioara, bioechivalent cu produsul de referinta.

### 6.3. Evaluarea stabilitatii comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol fumarat

Testele de stabilitate a comprimatelor de 10 mg bisoprolol fumarat, pe termen lung, (la  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  si umiditate relativa  $60 \pm 5\%$ ) si pe termen scurt (imbatrânire accelerata la  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  si umiditate relativa  $75 \pm 5\%$ ) au fost realizate pe trei serii de produs, la intervale de trei luni, pe durata a 12 luni, conform legislatiei in vigoare [150]. Pentru evaluarea perioadei de stabilitate a comprimatelor de 10 mg bisoprolol fumarat, s-a utilizat procedeul izoterm pe termen lung, bazat, in principal, pe viteza de degradare a substantei active. Prin interpolarea valorilor experimentale obtinute, s-a stabilit modelul matematic al procesului de degradare a bisoprololului fumarat si, respectiv, de crestere a continutului in produși de degradare. Deoarece analizele efectuate pe perioada testului au aratat o variabilitate foarte mica între cele trei serii analizate, pentru stabilirea modelului matematic s-au utilizat valorile medii. Evaluarea stabilitatii prin acest procedeu asigura, de regula, un timp de stabilitate mai redus fata de cel real cu 1-2 ani [151]. Parametrii calitativi si cantitativi evaluati in cadrul studiilor de stabilitate au fost stabiliti si caracterizati in paragraful 6.2.

#### 6.3.1. Studiul stabilitatii comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol fumarat in timp real

Valorile medii ale rezultatelor testarilor pe termen lung, pe trei serii de produs, sunt prezentate in tabelul 68. In decurs de 12 luni de conservare in ambalaj, la  $25^\circ\text{C}$ , continutul in bisoprolol fumarat, mg/comprimat, scade cu maxim 3,6 %. Aspectul comprimatelor nu s-a modificat pe întreaga perioada de conservare.

Tabelul 68. *Modificarea in timp a parametrilor cantitativi ai comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol (valori medii pe trei serii)*

| Timp, luni                                              | 0     | 3     | 6     | 9     | 12    |
|---------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Continut in bisoprolol fumarat, mg/comprimat filmat     | 9,964 | 9,890 | 9,780 | 9,700 | 9,680 |
| Substante inrudite- suma, max. %                        | 0,149 | 0,201 | 0,248 | 0,283 | 0,320 |
| Log continut in bisoprolol fumarat, mg/comprimat filmat | 0,998 | 0,995 | 0,990 | 0,989 | 0,986 |

Reprezentand grafic variatiile in timp a logaritmului concentratiei de bisoprolol fumarat (mg/comprimat filmat), s-a obtinut curba prezentata in figura 61. Se constata ca cinetica degradarii bisoprololului fumarat poate fi asimilata ca fiind de ordinul 1; liniarizarea degradarii s-a realizat prin interpolarea datelor obtinute experimental cu ajutorul unei functii cubice, obtinandu-se urmatoarea ecuatie de regresie:

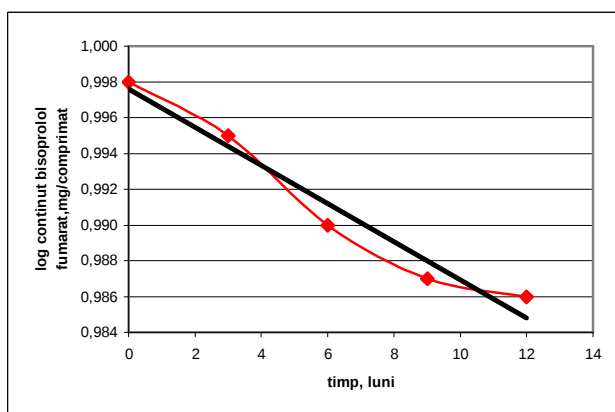


Figura 61: *Curba de degradare a bisoprololului fumarat la pastrarea în condiții izoterme la 25°C și reprezentarea ecuației de regresie*

$$\log c = -0,0011 \times t + 0,9976$$

(coeficient de corelație 0.9588)

în care: c= continutul în bisoprolol fumarat, mg/comprimat  
t= timpul, luni.

Valorile experimentale și calculate din ecuația de regresie care au stat la baza calculului sunt prezentate în tabelul 69.

Tabelul 69. *Valori experimentale și calculate pentru continutul în bisoprolol fumarat, mg/comprimat*

| x          | 0     | 3     | 6     | 9     | 12    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $y_{exp}$  | 9,964 | 9,890 | 9,780 | 9,700 | 9,680 |
| $y_{calc}$ | 9,945 | 9,870 | 9,795 | 9,721 | 9,647 |

C<sub>si</sub>, exprimată ca sumă, max. %, poate fi asimilată după o cinetică de ordin zero, descrisă de ecuația:

$$C_{si} = 0,0141 \times t + 0,1554$$

(coeficient de corelație 0,9924)

În figura 62, este reprezentată dreapta de interpolare.

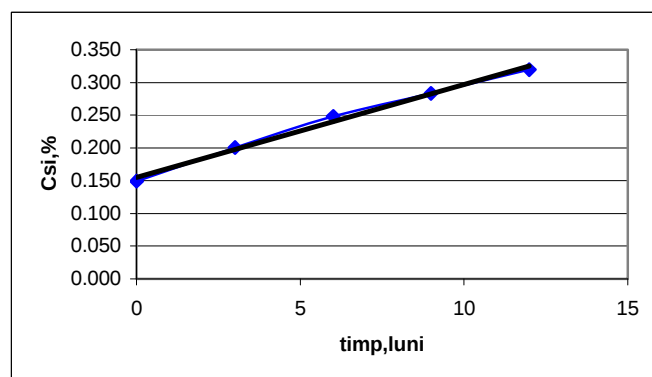


Figura 62 : ***Cresterea continutului in substante inrudite , Csi, suma, max.% si reprezentarea ecuatiei de regresie***

Evaluarea grafica a perioadei de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat pe baza determinarilor efectuate pe durata a 12 luni este prezentata in figura 63 (a si b), pentru urmatoarele conditii limita indeplinite simultan:

- continut minim de bisoprolol fumarat, mg/comprimat: 9,50;
- continut maxim de substante inrudite, suma max.%: 0,5.

Analizand graficele prezentate in figura mentionata, se evalueaza ca perioada de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat, avand compozitia prezentata anterior, in conditii de pastrare in ambalaj tip blister din folie PVC – aluminiu introdus in cutie plianta din carton, la 25°C, se situeaza, cu o probabilitate de minim 95%, la cca 24 luni (2 ani).

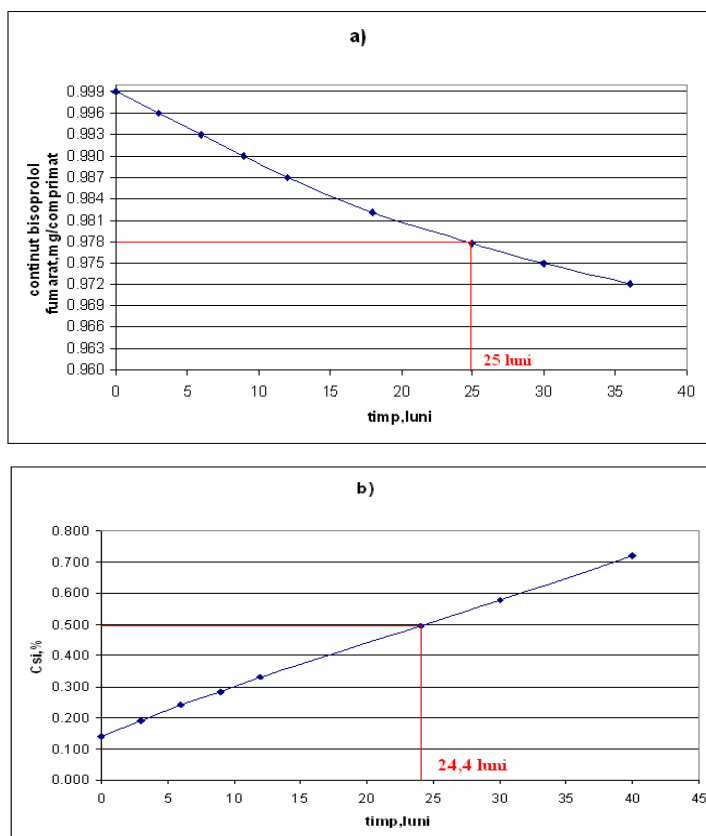


Figura 63: ***Evaluarea grafica a perioadei de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat***

### 6.3.2. Studiul stabilitatii comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol fumarat in conditii izoterme de “imbatranire accelerata”

Valorile medii ale rezultatelor testarilor conform procedurii izoterm, la  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  si umiditate relativa  $75 \pm 5\%$ , timp de 6 luni, pe trei serii de produs, sunt prezentate in tabelul 71. In aceste conditii, continutul in bisoprolol fumarat, mg/comprimat, scade cu maxim 6,3 %. Aspectul comprimatelor nu s-a modificat pe intreaga perioada de conservare.

Tabelul 71. *Modificarea in timp a parametrilor cantitativi ai comprimatelor filmate continand 10 mg bisoprolol (valori medii pe trei serii)*

| Timp, luni                                          | 0      | 1     | 2     | 4     | 6     |
|-----------------------------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Continut in bisoprolol fumarat, mg/comprimat filmat | 10,066 | 9,923 | 9,847 | 9,614 | 9,526 |
| Substante inrudite- suma, max. %                    | 0,285  | 0,303 | 0,333 | 0,363 | 0,422 |

Prin interpolarea datelor experimentale, s-au obtinut urmatoarele ecuatii de regresie:

- pentru scaderea continutului de substanta activa, ecuatie de regresie de gradul 2 (figura 64):

$$c = 0,0084 \times t^2 - 0,1417 \times t + 10,068$$

(coeficient de corelatie 0,9926)

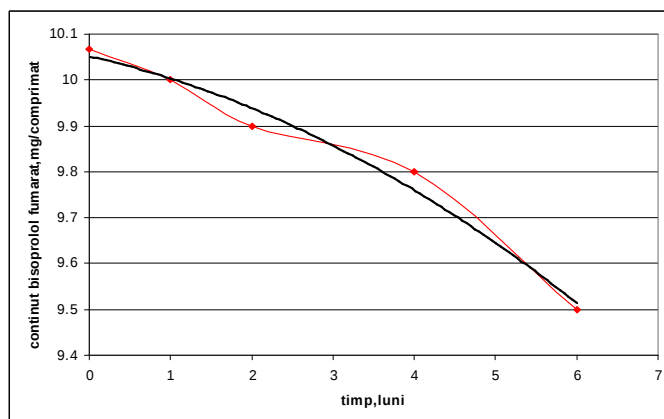


Figura 64: *Curba degradarii bisoprololului fumarat la pastrarea in conditii izoterme la  $40^\circ\text{C}$  si reprezentarea ecuatiei de regresie*

- pentru  $C_{si}$ , ecuatie de regresie de gradul 1 (figura 65):

$$C_{si} = 0,0224 \times t + 0,2819$$

(coeficient de corelatie 0,9900)

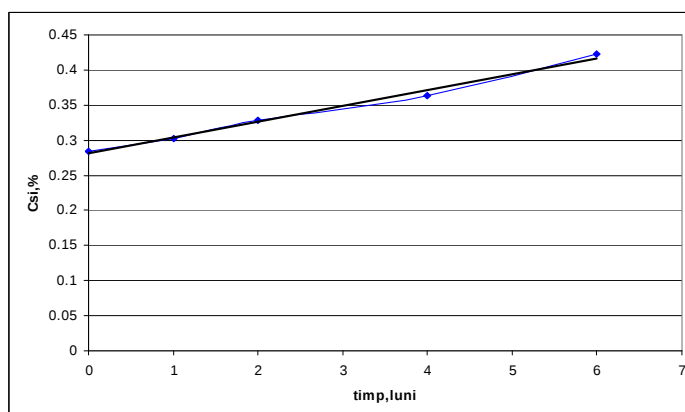


Figura 65: *Cresterea continutului in substante inrudite , Csi, suma, max.% si reprezentarea ecuatiei de regresie*

Evaluarea grafica a perioadei de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat pe baza determinarilor efectuate pe durata a 6 luni este prezentata in figura 66 (a si b), pentru urmatoarele conditii limita indeplinite simultan:

- continut minim de bisoprolol fumarat, mg/comprimat: 9,50;
- continut maxim de substante inrudite, suma max.%, 0,5.

Analizand graficele prezentate, se evalueaza ca perioada de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat, avand compozitia prezentata anterior, in conditii de pastrare in ambalaj tip blister din folie PVC–aluminiu introdus in cutie plianta din carton, la 40°C si u.r. 75±5%, se situeaza la cca 24 luni (2 ani). Rezultatele obtinute in conditii de testare accelerata confirma datele de stabilitate in timp real.

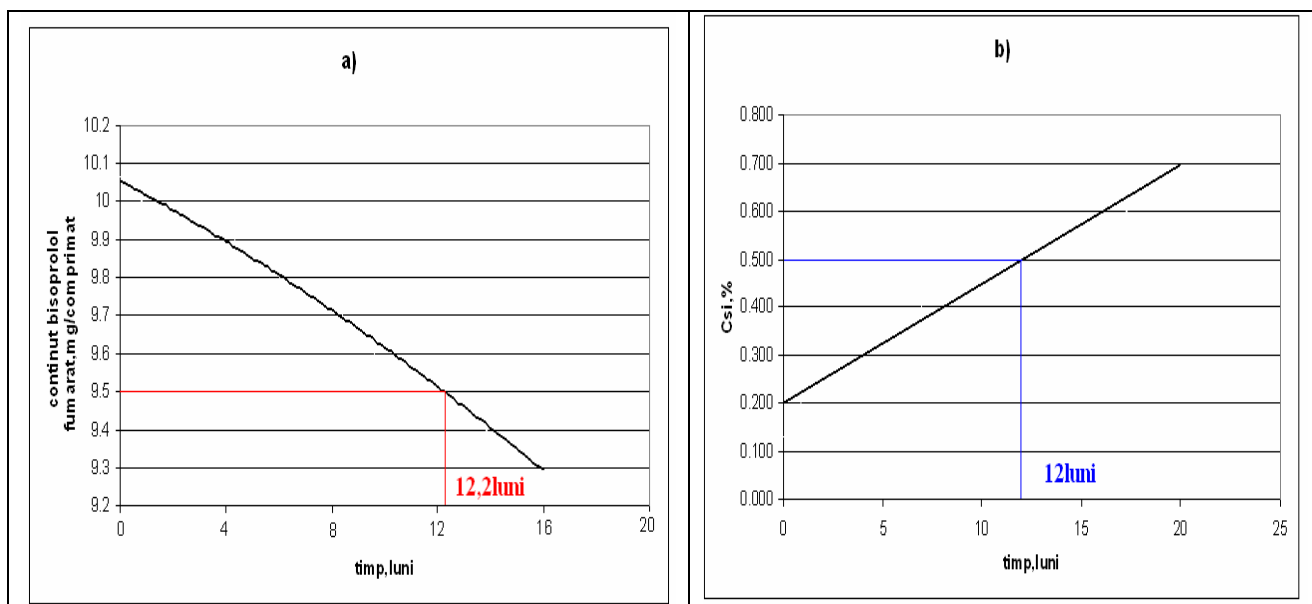


Figura 66: *Evaluarea grafica a perioadei de stabilitate la 40 °C a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat*

## **Cap. 7. EVALUAREA BIODISPONIBILITATII SI BIOECHIVALENTEI COMPRIMATELOR FILMATE DE BISOTENS® 10 MG BISOPROLOL FUMARAT VERSUS CONCOR® (Merck KgA) DUPA ADMINISTRARE ORALA LA 12 VOLUNTARI SANATOSI**

### **7.1. Protocol de studiu. Rezumat**

Studiul a avut ca scop compararea profilelor farmacocinetice si a biodisponibilitatii dupa administrare orala la 12 voluntari sanatosi a comprimatelor filmate Bisotens® (S.C. Antibiotice S.A.Iasi) continand 10 mg bisoprolol fumarat (produs test), comparativ cu comprimatele filmate de referinta Concor® (Merck KgA), continand 10 mg bisoprolol fumarat.

Studiul s-a realizat pe un grup de 12 voluntari sanatosi de rasa Caucaziana (5 femei si 7 barbati), cu o medie de varsta de 20,75 ani, avand inaltimea medie de 1,76 m, greutatea medie corporala de 68,12 kg si un indice de masa corporala de 21,86 kg/m<sup>2</sup>.

Pe baza concentratiilor plasmatice ale bisoprololului, determinate prin metoda cromatografica, au fost calculati urmatorii parametri farmacocinetici:  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $ASC_{0-t}$  si  $ASC_{0-\infty}$ . Valorile  $ASC$  si  $C_{max}$  au fost transformate logaritmice inainte de analiza statistica. Criteriile de evidentiare a bioechivalentei luate in considerare au fost:

- Raportul  $C_{max}$  trebuie sa se situeze in domeniul 80-125, pentru un interval de incredere de 90%;
- Raportul  $ASC$  trebuie sa se situeze in domeniul 80-125 %, pentru un interval de incredere de 90%.

Parametrii farmacocinetici au fost determinati cu ajutorul programului Kinetica, versiunea 5.0. (InnaPhase Corporation, SUA). Evaluarea diferentei  $T_{max}$  s-a realizat cu testul non-parametric Kruskal Wallis. Analiza de varianta (ANOVA) s-a condus pentru efectele ce tin de secventa si de tratament.

### **7.3. Elaborarea si validarea metodei de determinare a bisoprololului din probele de plasma umana**

Datele de literatura indica posibilitatea determinarii cantitative a bisoprololului fumarat din fluide biologice [154-158]. In acest context, s-a dezvoltat si validat o metoda bioanalitica LC-MS de determinare a concentratiilor plasmatice de bisoprolol, utilizand metoprololul ca standard intern, ale carei rezultate au facut subiectul a doua articole stiintifice publicate, cu titlurile: “ *A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma samples*” [159], si “*Experimental research for determination of bisoprolol fumarate in human plasma samples using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique*” [160].

Metoda bioanalitica a fost aplicata in scopul determinarii concentratiilor plasmatice ale bisoprololului fumarat, in cadrul studiului de bioechivalenta dezvoltat in cadrul Centrului de Evaluare al Medicamentului, S.C. Antibiotice S.A. Iasi. Acest studiu a avut ca scop compararea profilelor farmacocinetice si a biodisponibilitatii dupa administrare orala la 12 voluntari sanatosi a comprimatelor filmate Bisotens® continand 10 mg bisoprolol fumarat (produs test), comparativ cu comprimatele filmate de referinta Concor® (Merck KgA), continand 10 mg bisoprolol fumarat.

#### **7.4.1. Date primare si reprezentarea lor grafica**

Rezultatele obtinute in etapa analitica au fost prelucrate cu ajutorul programului specific Kinetica 5.0. (InnaPhase Corporation, SUA).

Valorile obtinute pentru principalii parametrii farmacocinetici sunt redade in tabelul 90 (produs test), respectiv tabelul 91 (produs referinta).

Tabelul 90. **Valorile parametrilor farmacocinetici obtinute dupa prelucrarea statistica a datelor primare - produs test**

| Codificare subiect | Secventa | Doza, mg | Cmax, ng/ml | Tmax, h | ASC <sub>0-t</sub> (ng/ml*h) | ASC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*h) | T <sub>1/2</sub> |
|--------------------|----------|----------|-------------|---------|------------------------------|------------------------------|------------------|
| S01                | RT       | 10       | 38.27       | 2.50    | 516.26                       | 661.16                       | 15.51            |
| S02                | TR       | 10       | 67.47       | 0.50    | 742.16                       | 766.96                       | 7.14             |
| S03                | RT       | 10       | 38.30       | 1.50    | 433.62                       | 455.50                       | 8.33             |
| S04                | TR       | 10       | 54.05       | 2.50    | 518.09                       | 561.95                       | 10.01            |
| S05                | RT       | 10       | 42.09       | 2.00    | 450.19                       | 473.35                       | 8.20             |
| S06                | TR       | 10       | 46.72       | 1.50    | 529.18                       | 576.03                       | 10.34            |
| S07                | RT       | 10       | 41.92       | 1.50    | 500.88                       | 530.76                       | 9.20             |
| S08                | TR       | 10       | 37.47       | 2.50    | 510.28                       | 568.69                       | 11.45            |
| S09                | TR       | 10       | 46.93       | 3.50    | 620.05                       | 667.13                       | 8.78             |
| S10                | RT       | 10       | 39.48       | 2.00    | 884.70                       | 904.06                       | 7.98             |
| S11                | TR       | 10       | 41.99       | 2.50    | 986.79                       | 1009.94                      | 7.56             |
| S12                | RT       | 10       | 54.02       | 2.00    | 693.29                       | 721.40                       | 7.42             |
| Media              | -        | -        | 45.73       | 2.04    | 615.46                       | 658.08                       | 9.33             |
| SD                 | -        | -        | 8.91        | 0.75    | 176.80                       | 169.39                       | 2.34             |
| CV,%               | -        | -        | 19.48       | 36.86   | 28.73                        | 25.74                        | 25.07            |
| N                  |          |          | 12.00       | 12.00   | 12.00                        | 12.00                        | 12.00            |
| Min                |          |          | 37.47       | 0.50    | 433.62                       | 455.50                       | 7.14             |
| Max                |          |          | 67.47       | 3.50    | 986.79                       | 1009.94                      | 15.51            |

Tabelul 91. **Valorile parametrilor farmacocinetici obtinute dupa prelucrarea statistica a datelor primare - produs referinta**

| Codificare subiect | Secventa | Doza, mg | Cmax, ng/ml | Tmax, h | ASC <sub>0-t</sub> (ng/ml*h) | ASC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*h) | T <sub>1/2</sub> |
|--------------------|----------|----------|-------------|---------|------------------------------|------------------------------|------------------|
| S01                | RT       | 10       | 33.76       | 3.00    | 483.96                       | 511.05                       | 8.08             |
| S02                | TR       | 10       | 37.47       | 2.50    | 510.28                       | 568.69                       | 11.45            |
| S03                | RT       | 10       | 33.92       | 2.00    | 415.73                       | 444.19                       | 8.93             |
| S04                | TR       | 10       | 42.09       | 2.00    | 450.19                       | 473.35                       | 8.20             |
| S05                | RT       | 10       | 47.19       | 1.00    | 508.06                       | 528.24                       | 7.25             |
| S06                | TR       | 10       | 41.92       | 1.50    | 500.88                       | 530.76                       | 9.20             |
| S07                | RT       | 10       | 57.05       | 1.50    | 673.14                       | 698.88                       | 7.48             |
| S08                | TR       | 10       | 42.87       | 1.50    | 455.00                       | 480.03                       | 8.37             |
| S09                | TR       | 10       | 39.48       | 2.00    | 457.71                       | 477.07                       | 7.98             |
| S10                | RT       | 10       | 40.25       | 2.50    | 1075.50                      | 1099.09                      | 7.47             |
| S11                | TR       | 10       | 47.44       | 3.50    | 1139.73                      | 1162.32                      | 7.57             |
| S12                | RT       | 10       | 50.63       | 4.50    | 1060.67                      | 1092.52                      | 9.37             |
| Media              | -        | -        | 42.84       | 2.29    | 644.24                       | 672.18                       | 8.45             |
| SD                 | -        | -        | 6.83        | 0.99    | 277.81                       | 276.96                       | 1.18             |
| CV,%               | -        | -        | 15.94       | 43.10   | 43.12                        | 41.20                        | 13.91            |
| N                  | -        | -        | 12.00       | 12.00   | 12.00                        | 12.00                        | 12.00            |
| Min                | -        | -        | 33.76       | 1.00    | 415.73                       | 444.19                       | 7.25             |
| Max                | -        | -        | 57.05       | 4.50    | 1139.73                      | 1162.32                      | 11.45            |

#### 7.4.2. Evaluarea statistica a bioechivalentei

Valorile medii ale principalilor parametri farmacocinetici si rapoartele lor sunt prezentate in tabelul 92.

Tabelul 92. *Valorile medii ale principalilor parametri farmacocinetici*

| Parametrul                   | Test                |        | Referinta           |        | Raportul mediu* | Interval de confidenta 90% ** |
|------------------------------|---------------------|--------|---------------------|--------|-----------------|-------------------------------|
|                              | Media $\pm$ SD      | CV (%) | Media $\pm$ SD      | CV (%) |                 |                               |
| $C_{max}$ (ng /ml)           | 45.73 $\pm$ 8.91    | 19.48  | 42.84 $\pm$ 6.83    | 15.94  | 106.295         | 94.565 – 119.48               |
| $ASC_{0-t}$ (ng * h/ml)      | 615.46 $\pm$ 176.80 | 28.73  | 644.24 $\pm$ 277.81 | 43.12  | 99.285          | 89.989 – 109.540              |
| $ASC_{0-\infty}$ (ng * h/ml) | 658.08 $\pm$ 169.39 | 25.74  | 672.18 $\pm$ 276.96 | 41.20  | 101.716         | 91.293 – 113.333              |
| $T_{max}$ (h)                | 2.04 $\pm$ 0.75     | 36.86  | 2.29 $\pm$ 0.99     | 43.10  | -               | -                             |
| $T_{1/2}$ (h)                | 9.33 $\pm$ 2.34     | 25.07  | 8.45 $\pm$ 1.18     | 13.91  | -               | -                             |

\*Media geometrica a valorilor logaritmuate

\*\* Pentru valori logaritmuate

Intrucat:

- rapoartele intre parametrii farmacocinetici, ca valori medii, sunt situate in intervalul 80-125%
- testele neparametrice pentru  $T_{max}$  (Kruskal Wallis Design) (vezi anexa) indica diferente nesemnificative

rezulta ca cele doua produse, test si referinta, sunt bioechivalente.

### CONCLUZII (Selectiv)

Cercetarile intreprinse si rezultatele obtinute in cadrul prezentei teze au condus la urmatoarele concluzii:

1. Metodele de sinteza ale reprezentantilor acestei clase terapeutice, inclusiv ale bisoprololului fumarat, sunt accesibile in conditiile obisnuite pentru sinteza compusilor organici.

2. Sinteza bisoprololului fumarat din alcool 4-hidroxi-benzilic si 2-isopropoxietanol decurge in urmatoarele etape: reactia de eterificare a alcoolului 4-hidroxi-benzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, in prezenta de Amberlyst 15, condensarea derivatului obtinut, 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol, cu epiclorhidrina (realizata in absenta si in prezenta PEG-400, drept catalizator cu transfer de faza), obtinerea bisoprololului baza prin condensarea derivatului epoxidic obtinut cu isopropilamina, obtinerea bisoprololului fumarat din bisoprolol baza.

3. Studiile preliminare efectuate au demonstrat dependenta reactiei de eterificare a alcoolului 4-hidroxi-benzilic cu 2-isopropoxietanol, in cataliza eterogena, de urmatoarii parametri independenti: raportul molar al reactantilor, timpul si temperatura reactiei.

**4.** Modelările statistice realizate distinct pentru cele două faze ale reacției, inițiere și perfectare, au condus la următoarele valori, pentru cei trei parametri:

- în faza de inițiere: raport molar 2-isopropoxietanol /alcool 4-hidroxibenzilic=13,535; timp de reacție = 156,9 minute și temperatura de reacție= 3,5 °C (pentru o valoare maximă a randamentului de reacție 74,88%);

- în faza de perfectare: timp de reacție =14 ore și temperatura de reacție= 16 °C (pentru o valoare maximă a randamentului de 96,985%). Timpul total al reacției chimice de eterificare reprezintă suma timpurilor celor două etape distincte, respectiv 1116,9 minute.

**5.** Aceste rezultate au fost confirmate și prin modelarea neuronală a reacției de eterificare. Astfel, în faza de inițiere, randamentul maxim este de 74,9% și se obține în următoarele condiții: raport molar al reactanților = 15,5; temperatura = 3,5°C și timpul de reacție = 2,7 ore.

În faza de perfectare a reacției, simularea efectuată cu ajutorul modelului neuronal *MLP(2:3:1)* confirmă obținerea randamentului optim de aproximativ 97%, la un timp de reacție de 14 ore și o temperatură de 16 °C.

**6.** Reacția de condensare a derivatului obținut în prima etapă, 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol], cu epiclorhidrina, a fost realizată în mediu bazic, atât în absență, cât și în prezența PEG-400 (catalizator cu transfer de fază). Modelările statistice realizate distinct în cele două situații, au demonstrat că, în absența PEG-400, se obține un randament maxim de reacție 78,04 %, în următoarele condiții: timp de reacție= 1,05 ore (63 minute) și temperatura de reacție = 51,2°C. În prezența PEG-400, se obține un randament de reacție maxim de 81,56%, în următoarele condiții: timp de reacție= 1,12 ore, temperatura= 50°C și raport molar PEG-400- 4-[(2-isopropoxietoxi)metil-fenol]= 0,4.

Utilizarea catalizatorului cu transfer de fază a condus la o creștere a randamentului reacției de condensare, de la 78,04 % la 81,56%.

**7.** Reacția de condensare a derivatului epoxidic obținut anterior, 2-[[4-(isopropoxietoxi)metil]-fenoximetil]oxiranul cu isopropilamina decurge în mediu de metanol și conduce la obținerea bisoprololului bază, cu un randament de 79,91%.

**8.** Obținerea bisoprololului fumarat s-a realizat prin tratarea bisoprololului bază obținut anterior cu acid fumaric, în mediu de acetona, cu un randament de reacție de 75,80%.

**9.** Natura și cantitatea de aglutinant utilizată la formularea comprimatelor de bisoprolol fumarat influențează comportarea la dizolvare a comprimatelor realizate;

**10.** Cercetările efectuate au permis selectarea, ca optimă pentru realizarea de comprimate, varianta care utilizează PVP, ca aglutinant;

**11.** S-a stabilit un model matematic care permite evaluarea profilului de dizolvare al comprimatelor în funcție de cantitatea de PVP utilizată în granulara umedă. Pe baza modelului stabilit, s-a determinat cantitatea optimă de aglutinant (2,7%), ce asigură comprimatelor test o dizolvare practic similară cu a comprimatelor de referință;

**12.** Optimizarea profilului de dizolvare *in vitro* al comprimatelor de bisoprolol fumarat reprezintă premisa realizării unui produs farmaceutic cu biodisponibilitate superioară, bioechivalent cu produsul de referință.

**13.** Testele de stabilitate a comprimatelor de 10 mg bisoprolol fumarat, pe termen lung, (la  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  și umiditate relativă  $60 \pm 5\%$ ) și pe termen scurt (îmbătrânire accelerată la  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  și umiditate relativă  $75 \pm 5\%$ ) au fost realizate la intervale de trei luni, pe durata a 12 luni. Astfel, perioada de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat, în condiții de păstrare în ambalaj tip blister din folie PVC – aluminiu introdus în cutie pliantă din carton, la 25°C, se situează, cu o probabilitate

de minim 95%, la cca 24 luni. Perioada de stabilitate a comprimatelor filmate de 10 mg bisoprolol fumarat, in conditii de pastrare in ambalaj tip blister din folie PVC – aluminiu introdus in cutie plianta din carton, la 40°C si u.r.  $75 \pm 5\%$ , se situeaza la cca 24 luni. Rezultatele obtinute in conditii de testare accelerata au confirmat datele de stabilitate in timp real. De asemenea, in urma expunerii UV-VIZ comprimatelor de bisoprolol fumarat realizate, toti parametrii calitativi si cantitativi controlati s-au situat in limitele de admisibilitate.

**14.** Studiul de bioechivalenta pentru Bisotens<sup>®</sup> comprimate filmate 10 mg bisoprolol fumarat (S.C. Antibiotice S.A.) versus Concor<sup>®</sup> comprimate filmate 10 mg bisoprolol fumarat (Merck, KgA.) s-a desfasurat la Centrului de Evaluare a Medicamentului din cadrul S.C. Antibiotice S.A. Iasi.

**15.** Rapoartele intre principalii parametrii farmacocinetici, ca valori medii, au fost situate in intervalul 80-125%, iar testele neparametrice pentru  $T_{max}$  (Kruskal Wallis Design) au indicat diferente nesemnificative, ceea ce semnifica ca cele doua produse, test si referinta, sunt bioechivalente.

## ACTIVITATEA STIINTIFICA DIN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

### Articole publicate in reviste cotate ISI

1. Gabriela Peste, Nela Bibire, Mihai Apostu, Aurel Vlase, Corneliu Oniscu, *A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma samples*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2009, nr.1, Article ID 736327, 8 pages, 2009;
2. Gabriela Peste, Corneliu Oniscu, Aurel Vlase, *Experimental research for determination of bisoprolol fumarate in human plasma samples using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique*, Roumanian Biotechnological Letters, 2010, 2, 15, 5140-5145.
3. Corneliu Oniscu, Cristina Victorina Vlase, Geanina-Gabriela Peste, "A new high performance liquid chromatographic method for determination of bisoprolol in plasma samples", Roumanian Biotechnological Letters, 2007, 12, 1, 3079-3084;
4. Gabriela Peste, Nela Bibire, Rodica Diaconescu, Corneliu Oniscu, *Mathematical Modeling of 4-[(2-isopropoxyethoxy)-methyl]phenol synthesis*, Farmacia (Buc.), 2010, 58, (4), 428;
5. Gabriela Peste, Nela Bibire, Rodica Diaconescu, Corneliu Oniscu, *A new liquid chromatographic method for determination of 4-hydroxybenzyl alcohol in 2-isopropoxy ethanol solution*, Farmacia (Buc.), 2010, 58 – **in press**.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Oniscu C., *Chimia si Tehnologia Medicamentelor*, Editura Tehnica, Bucuresti, 1988, 410-413;
95. Moffat A., Osselton M., Widdop B., 3<sup>rd</sup> edition, *Bisoprolol: Clarke's Analysis of Drug and Poisons*;
96. Haffner et al., *A Metabolic Assessment of The Beta1 Selectivity of Bisoprolol*, J. Hum. Hypertens., 1992, 6(5): 397-400;
97. Metra M., Nodari S., Bordonali T., Milani P., Lombardi C., Bugatti S., Fontanella B., Verzura G., Danesi R., Dei Cas L., *Bisoprolol in the treatment of chronic heart failure: from pathophysiology to clinical pharmacology and trial results*, Ther Clin Risk Manag., 2007 August, 3(4): 569–578;
98. Leopold G., Ungethüm W., Pabst J., Simane Z., Bühring K. U., Wiemann H., *Pharmacodynamic profile of bisoprolol, a new beta 1-selective adrenoceptor antagonist*, Br. J. Clin. Pharmacol., 1986, September, 22(3): 293–300;
99. Jovanovic D., Cusic S., Rancic D., Srnic D., Perkovic-Vukcevic N., *A Pharmacokinetic Comparison of Generic Tablets Containing Bisoprolol with the Innovator Formulation in Healthy Volunteers*, Journal of Clinical Pharmacology, 2006, 46:1217-1222;
101. <http://www.drugs.com/pro/bisoprolol-hydrochlorothiazide.html>;
104. H. Deng, C. -L. Liu, H. -X. Zhang, M. -C. Liu, P. -L. Zhu, *Development of HPLC method for the determination of gastrodin and para-hydroxybenzyl alcohol in tall gastrodia tuber on the polyglycol-C<sub>8</sub> column*, Analytical Letters, 2001, Vol. 34, Issue 4, 615 – 626;
105. Li HX, Ding MY, Yu JY, *Simultaneous determination of p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzyl alcohol, 4-(beta-D-glucopyranosyloxy)-benzyl alcohol, and sugars in Gastrodia elata blume measured as their acetylated derivatives by GC-MS*, J. Chromatogr. Sci., 2001 Jun, 39(6):251-4;
106. Ke-Xin Liu, Guo-Zhu Han, Ya-Lun Chang, Cheng-Ye Su, Nan-Yuan Tang, Yu-Ren Chen, *Simultaneous determination of gastrodin and its metabolite by HPLC*, Biomedical Chromatography, 2005, Vol. 2, Issue 1, 17-19;
107. Hong-Xia Li, Ming-Yu Ding, Jian-Yuan Yu, *Studies on the Reaction of p-Hydroxybenzyl Alcohol and Hydroxyl Radicals*, J. Chromatogr. Sci., 2001, 39(9):393-396;
108. Hecht Stephen S., Carmella Steven, Hoffmann Dietrich, *Chemical Studies on Tobacco Smoke - LIV Determination of Hydroxybenzyl Alcohols and Hydroxyphenyl Ethanol in Tobacco and Tobacco Smoke*, Journal of Analytical Toxicology, 1978, Vol. 2, Nr. 2, pp. 56-59 (4);
109. Arun Kumar Sinha, Subash Chandra Verma, Upendra Kumar Sharma, *Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in Vanilla planifolia*, Journal of Separation Science, 2007, Vol. 30 Issue 1, 15 – 20;
110. Jamoussi B., Bedoui A., Hassine B. Ben, Abderraba A., *Analyses of phenolic compounds occurring in olive oil mill wastewaters by GC-MS*, Toxicological & Environmental Chemistry, 2005, Vol. 87, Issue 1, 45 – 53;
111. Gabriela Peste, Nela Bibire, Rodica Diaconescu, Corneliu Oniscu, *A new liquid chromatographic method for determination of 4-hydroxybenzyl alcohol in 2-isopropoxy ethanol solution*, Farmacia (Buc.), 2010, 58 – in press;
112. Simionovici M., Carstea A., Vladescu C., *Cercetarea farmacologica si prospectarea medicamentelor*, Ed. Medicala, Bucuresti, 1983;
113. Mihail R., *Introducere in strategia experimentarii cu aplicatii din tehnologia chimica*, Ed. Stiintifica si Enciclopedica, Bucuresti, 1976;
114. Liteanu C., Raca I., *Optimizarea proceselor analitice*, Ed. Academiei, RSR, Bucuresti, 1985;
115. Gabriela Peste, Nela Bibire, Rodica Diaconescu, Corneliu Oniscu, *Mathematical Modeling of 4-[(2-isopropoxyethoxy)-methyl]phenol synthesis*, Farmacia (Buc.), 2010, 58, (4), 428;
121. M. C. Bruzzoniti, S. Andresek, M. Novic, D. Perrachon, C. Sarzanini, *Determination of epichlorohydrin by sulfite derivatization and ion chromatography: characterization of the sulfite derivatives by ion chromatography–mass spectrometry*, Journal of Chromatography, 23 April 2004, Vol. 1034, Issues 1-2, 243-247;
122. J. Novák, M. Bleha, J. Čoupek, *Reaction of epichlorohydrin with methanol investigated by gel chromatography*, Die Angewandte Makromolekulare Chemie, 2003, Vol. 64, Issue 1, 187-196;

123. Sarzanini C., Bruzzoniti M.C., Mentasti E., *Determination of epichlorohydrin by ion chromatography*, Journal of Chromatography, 2000, vol. 884, n° 1-2 (339 p.) (7 ref.), 251-259;
124. M. Lasa, R. Garcia, E. Millán, *A Convenient Method for Epichlorohydrin Determination in Water Using Headspace–Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography*, Journal of Chromatographic Science, August 2006, Vol. 44, Number 7, 438-443;
125. Sung J.H. , Lee Y.H., Park H.J., *New method for determination of epichlorohydrin in epoxy-coated cans by oxolane derivatization and gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 2008 Aug 1;1201(1):100-5. Epub 2008 Jun 11;
129. Ji Chen, S. K. Spear, J. G. Huddleston, R. D. Rogers, *Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media*, Green. Chem., 2005, 7, 64-82;
130. Stark et al., *Multiparticulate bisoprolol formulation*, United States Patent 6,733,789, 2004;
138. European Pharmacopoeia , 6<sup>th</sup> edition, 2007;
149. Higuchi T., *Mechanism of sustained action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices*, J Pharm Sci. 1963;52:1145–1149;
150. European Drug Master File-Requirements-Appendix V: *Note for Guidance Stability tests on Active ingredients and finished products*, Jan. 1989; ICH Harmonised Tripartite Guideline Stability Testing of New Drugs and Product, 1983;
151. EMEA, CPMP/QWP/556 P96, *Note for Guidance Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products*, 1998;
154. M.D. Hernando, M. Petrovic, A.R. Fernandez –Alba, D. Barcelo, *Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for  $\beta$  –blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples*, Journal of Chromatography A, 2004, 1046, 133-140;
155. Shuijun Li, Gangyi Liu, Jingying Jia, Yun Liu, Cheng Pan, Chen Yu, Yongbao Cai, Jianying Ren, *Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography- tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography.B ISSN, 2007, 847, 2, 174-181;
156. Bhatt J., Subbaiah G., Kambli S., Shah B., Patel M., Saxena A., Baliga A., Nigam S., Parekh H., Yadav G., *A high throughput and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MMS/MS) method for the estimation of bisoprolol in human plasma using multiplex technique*, Journal of Chromatography. B ISSN 1570-0232 , 2007, 852, 1-2, 374-381;
157. Liu Mingyuan, Zhang Dan, Sun Yantong, Wang Yingwu, Liu Zeyuan, Gu Jingkai, *Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric determination of bisoprolol in human plasma*, Biomedical Chromatography : BMC 2007;21(5):508-13;
158. Gang-yi Liu, Wei Wang, Jing-ying Jia, Chuan Lu, Yan-mei Liu, Meng-qi Zhang, Yun Liu, Shui-jun Li, Chen Yu, *Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma using d5-bisoprolol as the internal standard*, Biomedical Chromatography, 2009, Vol.9999, Issue 9999;
159. Gabriela Peste, Nela Bibire, Mihai Apostu, Aurel Vlase, Corneliu Oniscu, *A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma samples*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2009, nr.1, Article ID 736327, 8 pages, 2009;
160. Gabriela Peste, Corneliu Oniscu, Aurel Vlase, *Experimental research for determination of bisoprolol fumarate in human plasma samples using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique*, Roumanian Biotechnological Letters, 2010, 2, 15, 5140-5145.