

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**DEZVOLTAREA UNOR METODE DE ANALIZĂ PENTRU
CONTROLUL CALITĂȚII MEDICAMENTELOR
DE UZ VETERINAR**

Doctorand:

Georgeta Simona STAN

Conducător doctorat:

Prof. dr. Irinel Adriana BADEA

2018

Cuprins

(corespunzător tezei de doctorat)

INTRODUCERE	5
PARTEA TEORETICĂ	9
CAPITOLUL 1. METODE DE ANALITICE FOLOSITE ÎN CONTROLUL CALITĂȚII SUBSTANȚELOR ACTIVE DIN COMPOZIȚIA UNOR MEDICAMENTE DE UZ VETERINAR	9
1.1. Caracteristici ale substanțelor active și ale excipienților	9
1.2. Metodele pentru determinarea substanțelor active și a excipienților care fac obiectul acestui studiu	13
1.2.1. Metode compendiale	13
1.2.2. Metode publicate în literatura de specialitate	25
1.3. Concluzii	54
CAPITOLUL 2. CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND DEZVOLTAREA UNOR METODE CROMATOGRAFICE ȘI SPECTROMETRICE	56
2.1. Dezvoltarea metodelor cromatografice	56
2.1.1. Proprietățile fizico-chimice ale analiților	57
2.1.2. Mărimi cromatografice fundamentale	59
2.1.3. Proprietățile fazelor staționare	61
2.2. Dezvoltarea metodelor spectrometrice	66
2.2.1. Analiza unui amestec multicomponent	66
2.2.2. Spectrometria derivată	67
PARTEA EXPERIMENTALĂ ORIGINALĂ	70
CAPITOLUL 3. DEZVOLTAREA UNOR METODE CROMATOGRAFICE PENTRU CONTROLUL CALITĂȚII MEDICAMENTELOR DE UZ VETERINAR	70
3.1. Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea substanțelor active din CTP12	70
3.1.1. Materiale, echipamente și metodologie	71
3.1.2. Rezultate și discuții	73
3.1.3. Concluzii	91
3.2. Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea carprofenului și a vitaminelor B1, B6 și B12 din Artro-Vet	92
3.2.1. Materiale, echipamente și metodologie	94
3.2.2. Rezultate și discuții	96
3.2.3. Concluzii	110

3.3. Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea fenicolilor	111
3.3.1. Materiale, echipamente și metodologie	112
3.3.2. Rezultate și discuții	114
3.3.3. Concluzii	122
CAPITOLUL 4. DEZVOLTAREA UNOR METODE SPECTROMETRICE PENTRU CONTROLUL CALITĂȚII MEDICAMENTELOR DE UZ VETERINAR	123
4.1. Dezvoltarea unei metode de determinare spectrometrică a substanțelor active din CTP 12	123
4.1.1. Materiale, echipamente și metodologie	123
4.1.2. Rezultate și discuții	124
4.1.3. Concluzii	140
4.2. Elaborarea unei metode pentru determinarea spectrometrică a substanțelor din Enteroguard	141
4.2.1. Materiale, echipamente și metodologie	142
4.2.2. Rezultate și discuții	144
4.2.3. Concluzii	154
CONCLUZII GENERALE	155
BIBLIOGRAFIE	160
LISTA DE LUCRĂRI	184

INTRODUCERE

Formele farmaceutice pentru uz veterinar, spre deosebire de cele de uz uman, conțin mai multe substanțe active. Acest fapt poate părea puțin uzual celor implicați în industria medicamentelor de uz uman, dar trebuie luat în considerare faptul că animalele sunt retive și de aceea este necesară administrarea, printr-o singură injecție a mai multor principii active. Prin urmare, cele mai multe forme farmaceutice conțin mai mult de două substanțe active. Acestea li se adaugă uneori și excipienții care pot interfera în determinarea compușilor mai sus menționați.

În prezent, în cele mai multe dintre documentațiile tehnice ale produselor medicinale veterinare, producătorii propun câte o metodă analitică pentru fiecare specie activă și pentru anumiți excipienți. În acest fel timpul necesar analizei unui produs finit este foarte mare. La acesta se adaugă costurile pentru reactivi, echipamente, utilități, de cele mai multe ori multiplicare, cel puțin cu numărul de substanțe active.

Având în vedere aceste considerente, de economisire a resurselor umane, materiale și de timp și pentru a aduce o inovație din punct de vedere științific această lucrare are ca:

SCOP PRINCIPAL

- Dezvoltarea unor metode analitice pentru controlul calității medicamentelor de uz veterinar.

OBIECTIVE

- Dezvoltarea de metode cromatografice pentru determinarea a trei sau mai multor substanțe active din produse farmaceutice de uz veterinar;
- Dezvoltarea de metode spectrometrice pentru determinarea a trei sau mai multor substanțe active din produse farmaceutice de uz veterinar.

I. PARTEA TEORETICĂ

Partea teoretică este formată din două capitole: primul are ca obiect substanțele active și metodele existente în literatura de specialitate pentru stabilirea calității acestora, iar cel de al doilea prezintă metodologiile de dezvoltare a metodelor cromatografice și spectrometrice.

În primul capitol sunt prezentate principalele caracteristici ale substanțelor active și ale excipienților care fac obiectul acestei teze precum și descrierea sumară a metodelor analitice considerate de interes, care sunt incluse în monografiile din Farmacopeea Europeană

Ediția a 8-a ale substanțelor active/excipientilor, cum ar fi metodele de identificare și cuantificare, precum și cele de determinare a compușilor înrudiți chimic. Aceștia li se adaugă metode publicate în literatura de specialitate. Sunt trecute astfel în revistă metode pentru determinarea:

- cloramfenicolului, tartratului de tilozină, prednisolonului, a vitaminei B12 și a alcoolului benzilic, compuși care se regăsesc în compoziția soluției de CTP12;
- vitaminelor B1, B6 și B12 precum și a carprofenului, compuși care sunt în compoziția comprimatelor de Artro-Vet;
- fenicolilor: cloramfenicol, florfenicol și tiamfenicol, care se găsesc în produse de uz veterinar;
- metronidazolului, oxitetracilinei și a furazolidonei, substanțe din compoziția comprimatelor de Enteroguard.

Studiul de literatură a evidențiat faptul că substanțele active din compoziția produselor farmaceutice de uz veterinar care fac obiectul acestei teze de doctorat:

- au monografii în Farmacopeea Europeană, cu excepția furazolidonei și a florfenicolului;
- există metode analitice pentru determinarea lor cantitativă din produse finite și produse biologice;
- cele mai multe metode dezvoltate au la bază cromatografia de lichide și mai puțin cromatografia de gaze;
- există și metode spectrometrice, potențimetrice și foarte puține metode volumetrice;
- toate aceste metode permit determinarea substanțelor active de interes aflate singure sau în combinații de maxim trei, cum ar fi determinarea metronidazolului, furazolidonei și oxitetracilinei prin HPLC [1].
- nu există în literatura de specialitate nicio metodă analitică care să permită, de exemplu determinarea cloramfenicolului, tartratului de tilozină, prednisolonului și a vitaminei B12 (cum sunt în produsul CTP12) sau a vitaminelor B1, B6, B12 și a carprofenului (cum sunt în produsul Artro-Vet).

În cel de-al doilea capitol se prezintă strategia de dezvoltare a unor metode cromatografice care are la bază particularitățile structurale ale analiților și ale echilibrelor pe baza cărora se dezvoltă metoda cromatografică; alegerea fazelor staționară și mobilă astfel încât metoda să fie eficientă și să conducă la rezoluții bune între semnale; alegerea lungimii de undă optime la care să se facă detecția.

În continuare sunt discutate aspectele legate de determinarea unor substanțe dintr-un amestec multicomponent prin spectrometrie de absorbție UV-VIS de ordin 0. Aceste determinări au la bază legea *Bouguer–Lambert–Beer* și aditivitatea absorbanței la aceeași lungime de undă. Este discutat și principiul fundamental al spectrometriei derivate și anume cel de *zero-crossing* (intersecția spectrului derivat cu axa absciselor), care se aplică amestecurilor multicomponent, care nu pot fi analizate prin spectrometrie de ordin 0.

II. PARTEA EXPERIMENTALĂ ORIGINALĂ

În partea originală sunt prezentate rezultatele obținute la dezvoltarea unor metode cromatografice (în capitolul 3) și spectrometrice (în capitolul 4) folosite pentru controlul calității unor medicamente de uz veterinar. Toate metodele dezvoltate au fost verificate conform regulilor internaționale [2, 3], iar parametri precum selectivitatea, liniaritatea, precizia, acuratețea și robustețea au fost evaluați.

3.1. Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea substanțelor active din CTP12

Unul dintre cei mai importanți producători români de pe piața medicamentelor de uz veterinar a dezvoltat o formă finită care conține patru substanțe active, și anume cloramfenicol (200 mg / mL), tartrat de tilozină (55 mg / mL), prednisolon (5 mg / mL) și vitamina B12 (0,1 mg/mL). Produsul CTP 12 este o combinație sinergică care asociază un bacteriostatic (cloramfenicolul), unui bactericid (tilozina) și unui antiinflamator (prednisolon) cărora li se adaugă vitamina B12 cu rol de tonic general. Orice subdozare sau supradozare a acestor 4 substanțe active fac tratamentul inefficient și în plus pot genera reacții adverse. De aceea se impune un control riguros al conținutului acestora în produsul finit.

Așa cum a fost prezentat în partea teoretică a lucrării, cele patru substanțe active menționate mai sus nu au fost niciodată determinate cantitativ printr-o metodă analitică unică. De aceea am dezvoltat și publicat [4] o asemenea metodă originală, care să permită determinarea celor 4 substanțe active din compoziție CTP 12.

Metoda cromatografică a fost elaborată folosind două coloane cromatografice și anume Hypercarb și HyPurity Advance, cumpărate de la ThermoElectron Corporation SUA. Coloana Hypercarb are următoarele caracteristici: lungime 100 mm, diametrul interior 4,6

mm și dimensiunea particulelor 5 μm, iar cea HyPurity Advance are următoarele caracteristici: lungimea de 250 mm, diametrul interior de 4,6 mm și dimensiunea particulelor de 5 μm. Pe toată durata separării coloana a fost termostată la 25 °C. Separarea a fost realizată izocratic, utilizând o fază mobilă formată din apă cu 40 % (v/v) metanol ca modificator organic. Volum de injecție: 10 μL. Debitul fazei mobile a fost de 0,8 mL/ min. Detecția a fost realizată la 260 nm.

Cromatograma reprezentativă pentru o probă sintetică care conține 2 mg/mL cloramfenicol, 0,55 mg/mL tartrat de tilozină, 0,05 mg/mL prednisolon, 0,001 mg/mL vitamină B12 și 0,1 mg/mL alcool benzilic este prezentată în Figura 1.

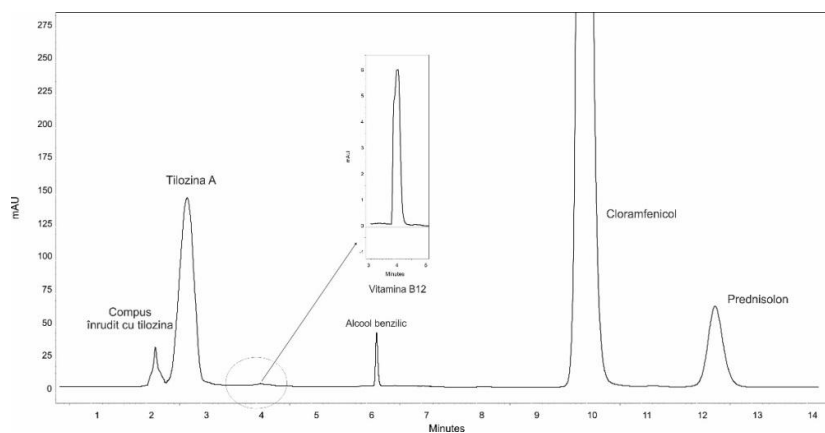


Figura 1. Cromatograma reprezentativă pentru o probă sintetică care conține 2 mg/mL cloramfenicol, 0,55 mg/mL tartrat de tilozină, 0,05 mg/mL prednisolon, 0,001 mg/mL vitamină B12 și 0,1 mg/mL alcool benzilic

Metoda a fost aplicată pe produse comerciale CTP12. S-a obținut o foarte bună concordanță între cantitățile de substanțe active și excipienți declarate de producător și cele calculate folosind noua metodă HPLC.

3.2. Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea carprofenului și a vitaminelor B1, B6 și B12 din Artro-Vet

O formă farmaceutică conținând mai multe substanțe active și anume: carprofen (100 mg), vitamina B6 (50 mg), vitamina B1 (50 mg) și vitamina B12 (0,1 mg) per comprimat este comercializată în România sub denumirea de Artro-Vet și este recomandat a fi administrată în perioada de creștere a cățeilor foarte activi, pentru a le asigura și îmbunătăți mobilitatea, dar și cățeilor cu osteoartrită asimptomatică. Monografia existentă în Farmacopeea Europeană [5] prezintă o metodă de titrare potențiometrică pentru analiza carprofenului.

Până la publicarea articolului rezultat în urma acestui studiu original [6], nu exista în literatura de specialitate nicio metodă de analiză care să permită determinarea celor patru substanțe active.

Două coloane cromatografice LiChrosorb RP-18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) și un Hypersil GOLD aQ (250 × 4,6 mm, 5 μm) au fost utilizate pentru a dezvolta și optimiza metoda HPLC. Cea mai bună alegere a reprezentat-o coloana Hypersil GOLD aQ, care permite folosirea unei faze mobile integral apoasă. Astfel, au fost testate următoarele condiții cromatografice: eluție în gradient, utilizând o fază mobilă compusă din soluție tampon fosfat (pH = 2,65) și metanol ca modificator organic. Gradientul, exprimat în variația compoziției de soluție tampon fosfat din faza mobilă a fost următorul: timp de 1 minut soluție tampon fosfat 98%; 50% între minutele 1 și 7,50; menținut apoi constant la 50% până la minutul 11; diminuat la 0% până la minutul 15 și în final crescut la 98% între minutele 15 la 22 după care a fost menținut la această compoziție timp de încă 2 minute. Debitul fazei mobile a fost de 1 mL/ min, iar detecția s-a realizat la 292 nm. Volumul de injecție a fost de 10 μL.

În condițiile cromatografice stabilite s-a obținut cromatograma din figura 2.

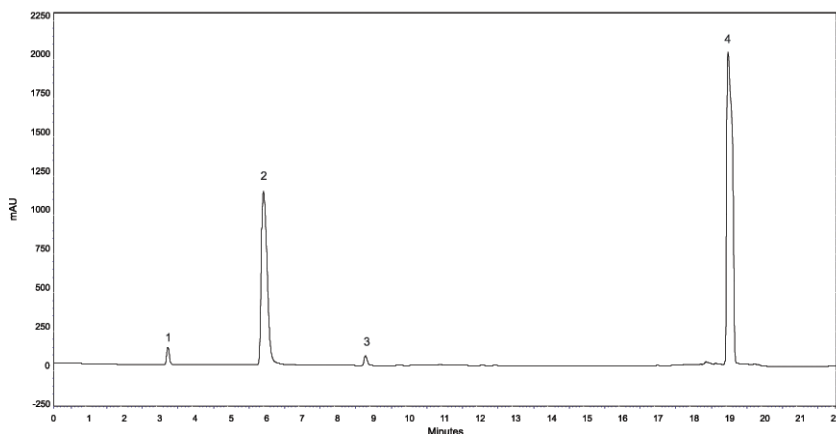


Figura 2. Cromatogramă reprezentativă pentru amestecul de carprofen (0,5 mg/mL), vitamina B1 (0,25 mg/mL), B6 (0,25 mg/mL) și B12 (0,5 μg/mL): 1-vitamina B1, 2-vitamina B6, 3-vitamina B12, 4-carprofen

Metoda a fost aplicată pe probe de Artro-Vet și rezultatele obținute au fost în concordanță cu cele declarate de producător.

3.3. Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea fenicolilor

În timp ce cloramfenicolul, CAP și tiamfenicolul, TAP au monografii farmaceutice [7, 8], controlul calității florfenicolului nu este descris în nicio monografie de farmacopee sau în orice alt document oficial. Se impune deci existența unei metode cromatografice pentru determinarea florfenicolului din diferite produse farmaceutice de uz veterinar. Prin urmare, am dezvoltat o metodă cromatografică originală [9] pentru determinarea fenicolilor din produse farmaceutice și din probe de lapte. Această metodă folosește o coloană de tip Hypercarb (cu fază staționară PGC) cu următoarele caracteristici: $100 \times 4,6$ mm și o dimensiune a particulelor de 5 μ m) achiziționată de la ThermoElectron Corporation, USA. Separarea a fost realizată izocratic, la 25 °C, utilizând o fază mobilă de apă și acetonitril ca modificator organic (40:60 v/v), având un debit de 0,8 mL/ min. Detecția a fost realizată la 260 nm. Volumul de injecție a fost de 10 μ L. Cromatograma înregistrată pentru separarea celor trei fenicoli este prezentată în figura 3.

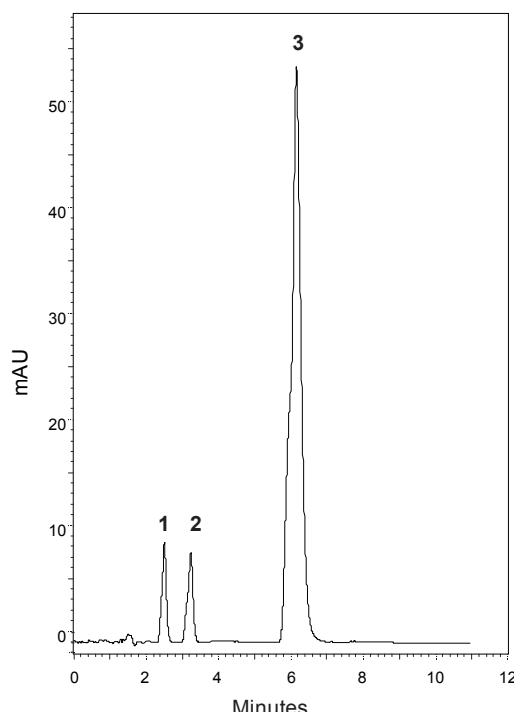


Figura 3. Cromatogramă reprezentativă pentru amestecul de fenicoli (0,1 mg/mL): 1-tiamfenicol, 2-florfenicol, 3-cloramfenicol

După cum se poate observa, separarea se realizează într-un timp de 7 minute cu rezoluție bună între toți cei trei fenicoli.

Pentru această metodă au fost calculate limita de decizie ($CC\alpha$) și capacitatea de detecție ($CC\beta$), întrucât ea a fost aplicată pentru determinarea fenicolilor din diferite probe de lapte. În plus, această metodă poate fi folosită pentru stabilirea conținutului de florfenicol din diferite medicamente de uz veterinar, mai ales că la ora actuală nu există nicio monografie oficială pentru acest compus.

4.1. Dezvoltarea unei metode de determinare spectrometrică a substanțelor active din CTP 12

Concentrațiile de substanțe active se determină prin spectrometrie derivată folosind ecuații bazate pe legea Bouguer-Lambert-Beer. De exemplu, pentru amestecuri formate din mai mulți componenți, X, Y și Z această lege poate fi scrisă pentru lungimea de undă la care spectrul derivat de ordinul I al compusului Z intersectează axa absciselor, în forma:

$$I^{am} = \frac{d\varepsilon^X}{d\lambda} \times C^X + \frac{d\varepsilon^Y}{d\lambda} \times C^Y \quad (1)$$

- C^X și C^Y sunt concentrațiile de X și Y, exprimate în mol/L;
- I^{am} este intensitatea spectrului derivat de ordin I, $\frac{dA}{d\lambda}$ măsurată pentru soluția amestec, la lungimea de undă la care spectrul derivat de ordinul I al compusului Z trece prin zero.
- $\frac{d\varepsilon^X}{d\lambda}$ și $\frac{d\varepsilon^Y}{d\lambda}$ sunt absorbivitățile molare, derivate de ordinul I, exprimate în $L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ pentru compușii X și Y, determinate experimental la lungimea de undă la care spectrul derivat de ordinul I al compusului Z trece prin zero.

Produsul CTP 12 se prezintă sub forma unei soluții omogene de culoare brun-verzuie care face practic imposibilă elaborarea unei metode prin spectrometrie de ordin zero. De aceea următoarele încercări au fost orientate spre obținerea spectrelor derivate de ordinul I, II sau III, care să îndeplinească cel mai bine condiția de *zero-crossing*. La fel ca în cazul metodei cromatografice, cea mai mare dificultate în stabilirea condițiilor optime pentru metoda spectrometrică a fost determinată de varietatea mare de concentrații și diversitatea structurilor din compoziția CTP 12.

Au fost investigate condițiile experimentale în care metodologia de *zero-crossing* să poată fi aplicată. Astfel, au fost obținute spectrele derivate folosind programul Spectra Manager și singurele care permit aplicarea metodologiei de *zero-crossing* au fost cele derivate de ordinul II. Imaginea obținută după suprapunerea lor este prezentată în figura 4.

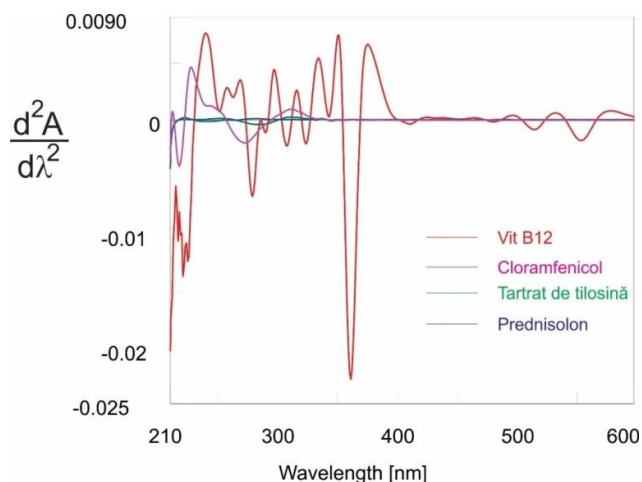


Figura 4. Spectrele derivate de ordinul II pentru substanțele active din compoziția CTP12, pentru domeniul de lungimi de undă 210-600 nm

Ceea ce este remarcabil la aceste substanțe este faptul că se îndeplinește condiția de *zero-crossing* pentru spectrele derivate de ordin II la diferite lungimi de undă. Acest fapt este destul de rar pentru amestecuri de patru compuși. Imaginea obținută pentru această situație este prezentată în figura 5.

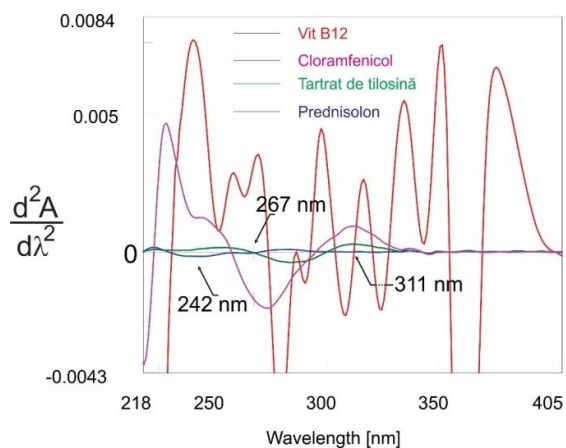


Figura 5. Spectrele derivate de ordinul II pentru substanțele active din compoziția CTP12, pentru domeniul de lungimi de undă 218-405 nm.

Pe baza spectrelor prezentate în figurile 4-5, s-au stabilit condițiile pentru determinarea celor patru substanțe active din compoziția CTP 12. Astfel:

- la lungimea de undă de 552 nm se poate determina vitamina B12 în prezența tuturor celorlalte substanțe active din formula CTP 12;
- la lungimea de undă de 267 nm contribuie la valoarea intensității derivatei spectrului de ordin II al amestecului de substanțe active din formula CTP 12 numai vitamina B12 și cloramfenicolul; compușii tartrat de tilozină și prednisolon au intensitatea spectrului derivat de ordin II egală cu zero și nu influențează această valoare. Cunoscând concentrația de vitamina B12 din produsul finit, determinată la 552 nm, se poate calcula concentrația de cloramfenicol din probă pe baza aditivității intensității spectrelor derivate și a coeficienților de absorbție molară derivați, determinați pentru vitamina B12 și pentru cloramfenicol la această lungime de undă;
- la lungimea de undă de 311 nm se poate determina concentrația de tartrat de tilozină, deoarece niciun alt compus în afară de tilozină și cloramfenicol nu contribuie la intensitatea spectrului derivat al amestecului; concentrația de cloramfenicol a fost calculată folosind metodologia de *zero-crossing* aplicată la lungimea de undă de 267 nm;
- la lungimea de undă de 242 nm poate fi determinat prednisolonul, deoarece se cunoaște concentrația tuturor celorlalte specii din formula CTP-ului și se pot determina experimental absorbțiile molare, derivatele de ordin II.

Metoda a fost aplicată pentru determinarea celor patru substanțe active din compoziția CTP 12, iar rezultatele obținute comparate cu cele obținute prin metoda HPLC originală prezentată în capitolul 3.1.

4.2. Elaborarea unei metode pentru determinarea spectrometrică a substanțelor din Enteroguard

Așa cum a fost prezentat în subcapitolul 2.2.2. asemenea amestecuri de compuși pot fi rezolvate folosind metoda de *zero-crossing* pentru una din variantele spectrelor derivate și anume de ordin I, II sau III. De aceea, folosind softul spectrometrului Jasco V530 au fost obținute spectrele derivate și cele care îndeplinesc cel mai bine condiția de *zero-crossing* sunt spectrele derivate de ordinul I. Imaginea obținută pentru acestea este prezentată în figura 6.

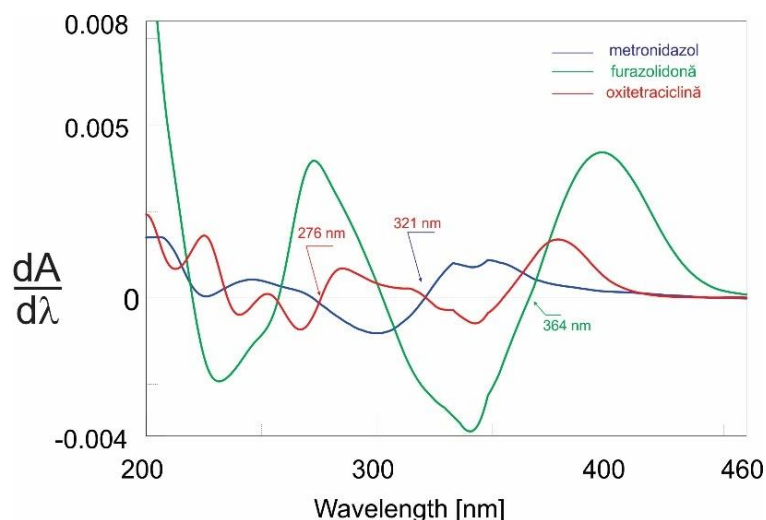


Figura 6. Spectrele derivate de ordinul I pentru cele trei substanțe active

Se observă din figura 6 că spectrul derivat de ordinul I asigură cele mai bune condiții spectrale pentru determinarea celor trei compuși din amestec și anume:

- la lungimea de undă de 321 nm, spectrele derivate de ordinul I ale metronidazolului și al oxitetracilinei trec prin zero, iar cel al furazolidonei are un maxim diferit de zero; la această lungime de undă se poate determina concentrația de furazolidonă din probă;
- la lungimea de undă 276 nm, intensitatea spectrului derivat de ordinul I al oxitetracilinei trece prin zero; cunoscând concentrația de furazolidonă determinată anterior, se poate calcula concentrația de metronidazol din probă;
- la lungimea de undă de 364 nm, intensitatea spectrului derivat al furazolidonei este zero, știind concentrația de metronidazol se poate determina concentrația de oxitetracilină.

Metoda spectrometrică originală dezvoltată a permis cuantificarea substanțelor active din produsul Enteroguard M - comprimate.

Concluzii generale

Atât scopul lucrării cât și obiectivele ei au fost atinse în studiile care fac obiectul tezei de doctorat, fiind elaborate și publicate pentru prima dată în literatura de specialitate trei metode cromatografice care pot fi folosite pentru controlul calității unor medicamente de uz veterinar. Lor li se adaugă două metode originale care au la bază principiul de *zero-crossing* din spectrometria derivată și care pot fi de asemenea utilizate atât în controlul interfazic cât și în cel al produsului finit.

Bibliografie (selectie)

1. Tauber, V., Chiurciu, V., Development and validation of a HPLC method for the determination of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone in veterinary formulations, *Veterinary Drug*, 8 (1): 73-79, 2014
2. ICH Topic Q2A. Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology, step 5 (CPMP/ICH/381/95)
3. ICH Topic Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology, step 4 (CPMP/ICH/281/95)
4. Stan, G.-S., Badea, I. A., Aboul-Enein, H. Y., HPLC method for quantification of five compounds in a parenteral form used in treatment of companion animals, *J. Chromatogr. Sci.*, 54(9): 1567-1572, 2016
5. European Pharmacopoeia, 8.0 version General Monographs, Carprofen for veterinary use, 07/2008:2201, 1778-1779, Council of Europe, Strasbourg, France
6. Stan, G.-S., Mitoi, B.E., Mihăilă, A., Badea, I. A., Aboul-Enein, H. Y., Determination of Carprofen in the Presence of some Hydrosoluble Vitamins of Group B by HPLC Method, *Curr. Anal. Chem.*, 11(4): 273-278, 2015
7. European Pharmacopoeia, 8.0 version General Monographs, Chloramphenicol 01/2008:0071, 1844 – 1845, Council of Europe, Strasbourg, France
8. European Pharmacopoeia, 8.0 version General Monographs, Thiamphenicol, 01/2015, 1844, Council of Europe, Strasbourg, France
9. Stan, G.-S., Moldovanu, F., Badea, I. A., Determination of phenicols using a fast and reliable HPLC method developed on Hypercarb stationary phase, *Rev. Chim.*, 68(3): 545-548, 2017.