

**Uniwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny
Z Oddziałem Analityki Medycznej**

Anna Lisik

Rozprawa doktorska - streszczenie pracy

**Rozwój i walidacja metod analitycznych w
badaniach kinetyki uwalniania związków wapnia i żelaza**

Promotor rozprawy:

Prof. dr hab. Witold Musiał

Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej

Wrocław 2019

Streszczenie

Celem pracy było zaproponowanie skutecznych, nieskomplikowanych metod analitycznych przykładowych produktów zawierających jony wapnia i żelaza w wybranych, zróżnicowanych postaciach. W tym celu w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej został opracowany szereg różnych formułacji hydrożelowych zawierających w swoim składzie jako główną substancję czynną dobezytan wapnia (CD). Jako przykładowe badane preparaty z jonami żelazowymi zastosowano leki wiodących producentów, tabletki o nieprzedłużonym i przedłużonym uwalnianiu, oraz kapsułki z jonami żelazowymi pochodzące z rynku suplementów diety.

Metody badawcze mogące posłużyć do anlizy hydrożelowych preparatów farmaceutycznych zawierających w swoim składzie CD nie są łatwo dostępne w literaturze. Celem badania było opracowanie i walidacja metody analitycznej dla żelu metylocelulozowego zawierającego CD jako substancję czynną. Próbki pochodzące z badań uwalniania oceniano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem UV-VIS. Optymalny skład fazy ruchomej obejmował acetonitryl z wodą w proporcji 1: 1, zakwaszony do pH 2,5 przy użyciu stężonego kwasu fosforowego. Zastosowaną kolumną chromatograficzną była: Standard Purospher Star 18e 250 x 4.6 (5 μm), a maksymalną długość fali ustawiono na 240 nm, przy temperaturze 25 °C. Całkowity czas przebiegu analizy wynosił 5 minut, a uzyskany czas retencji dla CD to 2,7 i 3,1 minuty, w zależności od formułacji hydrożelu. Badania w procesie walidacji opracowanej metody potwierdziły akceptowalną liniowość uzyskanych wykresów kalibracyjnych ($r^2 > 0,9927$). Liniowość metody wykonana na poziomie 100% zawartości CD wynosiła 99–101% dla wszystkich ośmiu przeanalizowanych formułacji. Wyniki dokładności metody mieściły się w zakresie 98-102% na trzech różnych poziomach fortyfikacji dla wszystkich analizowanych preparatów. Wyniki precyzji wynosiły około 100%, przy względnym standardowym odchyleniu (RSD) mniejszym niż 1% we wszystkich przypadkach, co wskazuje, że metoda może być stosowana jako metoda zwalidowana. Stwierdzono, że granica oznaczalności metody analitycznej (LOQ) wynosi 13,25 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ dla szeregu ocenianych preparatów. Otrzymane wyniki mieściły się w kryteriach akceptacji, dlatego proponowaną metodę można zastosować do rutynowej analizy tego typu preparatów hydrożelowych z dobezytanem wapnia.

Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) jest jedną z najbardziej powszechnych procedur badania jonów żelazawych w różnych formułacjach, w tym preparatach farmaceutycznych.

Celem badania było opracowanie i częściowa walidacja metody analitycznej, która mogłaby być doskonałą alternatywą dla rutynowej analizy przeprowadzanej w ramach badań kinetyki uwalniania. Analiza przewodnictwa elektrycznego jest prosta, szybka i bezproblemowa. Próbkę podczas procesu uwalniania mierzono za pomocą elektrody konduktometrycznej w całym przebiegu oceny uwalniania. Otrzymane wyniki porównano z danymi uzyskanymi z AAS. Badania uwalniania przeprowadzono zgodnie ze standardami farmakopealnymi, w 900 ml wody destylowanej jako medium akceptorowego, w temperaturze 37 °C, aż do osiągnięcia stanu równowagi dla każdej badanej formułacji rynkowej. Badania w procesie walidacji opracowanej metody potwierdziły akceptowalną liniowość uzyskanych wykresów kalibracyjnych ($r^2 > 0,9553$). Liniowość metody na poziomie 100% zawartości API wynosiła 100,59%; 97,49%; 94,82% odpowiednio dla kompozycji leków: A, B i C. Wyniki precyzji wynosiły 100,45%; 95,97% i 95,73%, odpowiednio dla A, B i C, z RSD poniżej 2% między wszystkimi próbkami we wszystkich wyżej wymienionych preparatach. Kompozycja leku D utrudniała prawidłową walidację metody ze względu na dużą zmienność pomiędzy próbkami. Stwierdzono, że powyższa metoda daje akceptowalne wyniki dla oceny trzech z czterech stałych formułacji leku zawierających jony żelazawe.

Podjęto również próbę zastosowania do szczegółowej oceny niektórych czynników kinetycznych uzyskanych z danych dotyczących uwalniania jonów żelazawych w metodzie z wykorzystaniem przewodnictwa elektrycznego. W wielu przypadkach użycie prostego modelu matematycznego jest w pełni wystarczające do zweryfikowania poprawności nowej metody. W tej pracy zastosowano cztery różne równania: równanie zerowego rzędu, równanie pierwszego rzędu, modele: Korsmeyera - Peppasa i Hixsona - Crowella. Wartości dla ustalonego czasu połowicznego uwalniania dla modeli kinetycznych zerowego i pierwszego rzędu wynosiły od 11,56 do 89,97 min. Wartości pierwiastka kwadratowego współczynnika korelacji informują o dostosowaniu zastosowanego modelu do obserwowanego postępu badanego procesu. W przypadku analizy według tych typowych modeli wartości zostały zawarte między 0,9916 a 0,9995. Wyniki przekształcone dla modelu Hixsona-Crowella jako stałe uwalniania K_s mieściły się w zakresie od 0,0160 do 0,0437. Wartości odpowiednich obliczonych kwadratów współczynnika korelacji wynosiły od 0,9933 do 0,9959. Określone stałe szybkości uwalniania według modelu Korsmeyera-Peppasa wynosiły od 0,0023 do

0,1630. Współczynniki „n” równania Korsmeyera-Peppasa nie przekraczały 1,2, a odpowiadające im wartości r^2 wynosiły od 0,9408 do 0,9960. Uzyskane wyniki potwierdziły, że powyższa metoda jest możliwa do oceny dla wybranych kompozycji leków zawierających jony żelazawe.

Abstract

The aim of the work was to propose effective, uncomplicated analytical methods of pharmaceutical products containing calcium and iron ions in selected, diverse forms. For this purpose, number of various hydrogel formulations, containing calcium dobesilate as the main active substance were prepared in Department Physical Chemistry of Wrocław Medical University. Non-sustained and prolonged release tablets drugs from leading manufacturers, as well as capsules with iron ions originating from the dietary supplements market, were used as examples of investigated preparations with iron ions.

Standardized analytical methods for testing hydrogel pharmaceutical formulations containing calcium dobesilate (CD) are not readily available in the literature. The aim of the study was to develop and to validate the analytical method for methylcellulose gel containing calcium dobesilate as an active ingredient. Samples derived from release studies were evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC) with an UV-VIS detector. The optimal composition of the mobile phase comprised acetonitrile with water in 1:1 ratio, acidified to pH 2,5 using concentrated phosphoric acid. The applied chromatographic column was standard Purospher Star 18e 250 x 4,6 (5 μm), and the maximum wavelength was set at 240 nm at 25 °C. The total analysis time was 5 minutes and the retention time obtained for calcium dobesilate were 2,7 and 3,1 minutes, depending on the hydrogel formulation. The tests in the validation process of the developed method confirmed the acceptable linearity of the obtained calibration graphs ($r^2 > 0,9927$). The linearity of the method at 100% level was 99-101% for all eight analyzed formulations. The accuracy results of the method were in the range of 98-102% on three different levels of fortification for all the analyzed preparations. The precision results were around 100%, with relative standard deviation (RSD) of less than 1% in all cases, indicating that the method could be used as a validated method. The limit of quantification (LOQ) of analytical method was found to be 13,25 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ for all eight hydrogel formulations. All obtained results were within the acceptance criteria, therefore the proposed method can be used for routine analysis of this type calcium hydrogel formulations.

The atomic absorption spectrometry (AAS) method is one of the most common procedures for testing ferrous ions in various compositions, including pharmaceutical formulations.

The aim of the study was to develop and partially validate the analytical method, which could be an excellent alternative to the routine analysis carried out as part of the release kinetics research. The electrical conductivity analysis is simple, fast and problem-free. The samples

during the release process were evaluated using a conductivity electrode throughout the entire release assessment. The obtained results were compared with data obtained from AAS method. The release tests were carried out according to the pharmacopeal standards, in 900 ml of distilled water as the acceptor medium, at 37 °C, until equilibrium state was reached for each tested marketed formulation. Analysis in the validation process of the developed method confirmed the acceptable linearity of the resulting calibration graphs ($r^2 > 0,9553$). The linearity of the method at 100% level was 100,59%; 97,49%; 94,82% for drug compositions, A, B and C, respectively. The precision results were 100,45%; 95,97% and 95,73%, for A, B and C, respectively, with RSD less than 2% between all samples in all the above-mentioned formulations. The drug D composition hindered the correct validation of the method due to the high variability between the samples. It has been found that the above method has acceptable performance characteristics to evaluate three of the four solid drug formulations containing ferrous ions.

An attempt was also made to perform detailed evaluation of some kinetic factors resulting from the data of the release of ferrous ions assessed via electrical conductivity. In many cases, the use of a simple mathematical model may be sufficient to verify the correctness of the new method. In this work four different model equations were used: zero order equation, first order equation, models: Korsmeyer - Peppas and Hixson - Crowell. The values for the predetermined half-time release for the zero and first order kinetic models were between 11,56 and 89,97 min. The values of the square root correlation coefficient inform about the adjustment of the applied model to the observed progress of the studied process. In the case of analysis according to these typical models, values were included between 0,9916 and 0,9995. The results transformed for the Hixson-Crowell model as the constant release of K_s ranged from 0,0160 to 0,0437. The values of the respective calculated squares of the correlation coefficient ranged from 0,9933 to 0,9959. Specific release rate constants according to the Korsmeyer-Peppas model were between 0,0023 and 0,1630. The "n" coefficients of the Korsmeyer-Peppas equation did not exceed 1,2 and the corresponding r^2 values ranged from 0,9408 to 0,9960.

The obtained results confirmed that the above method is sufficient to evaluate analytically selected compositions of drugs containing iron ions.