

Validarea metodei de determinare a furazolidonei și oxitetraciclinei în prezența substanțelor înrudite prin cromatografie de lichid de înalta performanță

A validated HPLC method for determination of furazolidone and oxytetracycline in the presence of related substances

Violeta Giugiu

Romvac Company S.A.

Cuvinte cheie: metoda HPLC, determinare simultană, furazolidonă, oxitetraciclină, 4-epioxitetraciclină, α -apooxitetraciclină, tetraciclină, β -apooxitetraciclină,

Keywords: HPLC method, simultaneous determination, furazolidone, oxytetracycline, 4-epioxytetracycline, α -apooxytetracycline, tetracycline, β -apooxytetracycline,

Rezumat

Obiectivul acestui studiu a fost dezvoltarea unei metode simple, precise, rapide și exacte de determinare a furazolidonei, oxitetraciclinei și substanțelor înrudite din produsele farmaceutice veterinare. Produsul farmaceutic a fost supus degradării accelerate în următoarele medii: acid, basic, oxidant, degradare termică și în prezența luminii. Metoda de separare simultană a furazolidonei și oxitetraciclinei a fost realizată pe o colonă Hypersil BDS RP-C₁₈, (250mmx4.6mm, i.d. 5 μ m diametrul particulei) folosind drept fază mobilă amestecul metanol - fosfat de potasiu dibasic 80 mM pH 7,5 (20/80). Gradientul folosit pentru elutie este prezentat în tabelul 1. Debitul de 1 mL/min și lungimea de undă de 254 au fost folosite în validarea metodei urmărind parametrii: liniaritate, limită de detecție și cuantificare, specificitatea, acuratete și precizie.

Abstract

The objective of the current study was to develop a simple, precise, rapid and accurate reverse phase liquid chromatographic method for the quantitative determination on furazolidone, oxytetracycline and related substances in veterinary formulation. This formulation was submitted to accelerated degradation studies under acidic, alkaline and oxidative conditions, exposure to light and thermal stability. The separation of furazolidone, oxytetracycline and degradation products was achieved on BDS Hypersil C₁₈ (250mmx4.6mm, i.d. 5 μ m particle size) with gradient mobile phase containing methanol and 80 mM dipotassium phosphate pH 7,5 (20/80). The flow rate was 1.0 mL/min and detection was set at 254 nm, at 25 °C. The developed method was validated with respect to linearity, limits of detection and quantification, specificity, accuracy, and precision.

Introducere

Oxitetraciclina este un antibiotic cu spectru larg, utilizat în medicina veterinară pentru a inhiba sinteza bacteriilor gram- pozitive și gram-negative.

Comunitatea Europeană a aprobat folosirea oxitetraciclinei pentru o gamă variată de specii: pisici, câini, oi, capre și porci.

Atât oxitetraciclina, cât și oxitetraciclina hidroclorică conțin impurități, care în materia

primă nu trebuie să depășească limitele impuse de Farmacopeea Europeană.

Furazolidona este un medicament antibacterian, din clasa nitrofuranilor, care conține în structura moleculară 5 grupari nitro.

Acest grup de compuși au o activitate antibacteriană și antiparazitară largă și din acest motiv sunt larg utilizați în tratamentul infecțiilor gastrointestinale la pasările de colivie, pisici și câini.

Scopul acestui studiu este de a dezvolta o noua metodă HPLC pentru evaluarea furazolidonei, oxitettracilinei și substanțelor înrudite din produsele veterinare.

1. Materiale și metodă

1.1. Materiale de referință și reactivi

Standardele de oxitettracilină, 4-epi-oxitettracilina, tetracilina clorhidrat, α -apo-oxitettracilina, β -apo-oxitettracilina au fost achiziționate de la Farmacopeea Europeană.

Standardul de furazolidona a fost achiziționat de la USP.

Produsul farmaceutic supus studiului, Oxifuran Vitaminizat- pulbere a fost furnizat de Romvac Company.

La prepararea tuturor soluțiilor s-a folosit apă ultrapură, obținută in-house cu un sistem Milli-Q (Millipore, USA).

Metanolul, grad HPLC, a fost furnizate de Merck.

Fosfatul de potasiu dibazic grad HPLC și acidul clorhidric au fost furnizate de Fluka.

Acidul ortofosforic 85%, folosit pentru ajustarea pH-ului, a fost achiziționat de la Merck.

N,N-dimetilformamida, achiziționată de la Sigma Aldrich.

1.2. Sistem și condiții cromatografice

Sistemul cromatografic folosit LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA) este echipat cu pompă cuaternară, autosempler, bucla de 25 μ L, termostat pentru coloană, termostat pentru autosampler și detector UV-VIS— diode array. Întregul sistem cromatografic este controlat cu softul ChromQuest. Separarea s-a realizat pe o coloana A Hypersil BDS RP-C18 column (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m particle size) folosind drept fază mobilă metanol - fosfat de potasiu dibazic 80 mM, pH 7,5.

Gradientul folosit pentru eluție este prezentat în tabelul 1.

Debitul de 1 ml/min, lungimea de unda de 254 nm și volumul de injecție de 10 μ L sunt parametri setați pentru această metodă.

Tabelul 1
Programul gradientului folosit pentru separare

Timp (min)	% solvent B HK ₂ PO ₄	%solvent C Methanol
0.00	80.00	20.00
5.00	60.00	40.00
15.00	60.00	40.00
20.00	80.00	20.00
30.00	80.00	20.00

1.3. Prepararea soluțiilor standard

Soluția standard stoc de furazolidonă (0.32 mg/mL) a fost preparate dizolvând o cantitate de standard în DMF. Soluția standard stoc de oxitettracilină (1mg/mL) a fost preparată dizolvând o cantitate de standard în HCl 0,01 M.

Soluțiile stoc de 4-epioxitettracilină (1 mg/mL), tetracilină clorhidrat (1mg /mL), alfa-apo-oxitettracilină (0,12 mg/mL), beta-apo-oxitettracilină (0,12 mg/mL) au fost preparate dizolvând, separat cantitățile necesare în HCl 0,01 M

Stocurile soluțiilor standard au fost păstrate la frigider.

1.4. Prepararea soluțiilor de probe

Într-un balon cotat de 50 mL au fost cântărite 0.286 g de Oxifuran Vitaminizat – pulbere, cantitatea fiind echivalentă cu 40 mg de oxitettracilină și 11.44 mg de furazolidona. Peste această cantitate s-au adăugat 15 mL de HCl 0,01M și 16 mL DMF, iar soluția obținută s-a ultrasonat timp de 10 minute. După răcire, volumul de 50 mL a fost completat cu HCl 0,01M și soluția a fost filtrată pe hârtie de filtru calitativă, tip 1289.

Într-un balon cotat de 10 mL, 0.64 mL de au fost diluați cu HCl 0,01 M. Soluția a fost agitată bine, filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m și injectată în sistemul cromatografic

1.5. Validarea metodei cromatografice

Acesta metoda a fost validată urmărind parametrul liniaritate, limita de detecție și cuantificare, precizie, acuratețe și degradare în diferite medii.

1.5.1. Studiul de degradare

Studiul de degradare a fost realizat pentru a evalua specificitatea metodei

analitice în prezența impuritatilor și a produșilor de degradare.

În studiul de degradare forțată, produsul Oxifuran Vitaminizat a fost analizat în următoarele medii: acid (0.1 M HCl), bazic (0.1 M NaOH), oxidant (3% H₂O₂), în prezența luminii (Vision 30W, UV-C, 253nm), și a temperaturii (60°C).

1.5.2. Linearitatea

Pentru stabilirea liniarității curbelor de calibrare, o serie de cinci concentrații în domeniul 10%-200% au fost preparate din soluțiile stoc de furazolidonă și oxitetracilină. Curbele de calibrare efectuate au fost folosite pentru determinarea limitelor de detecție și de cuantificare

1.5.3. Precizie și acuratețe

Precizia metodei a fost determinată prin injectarea a șase probe individuale de Oxifuran Vitaminizat.

Acuratețea metodei poate fi evaluată prin procentul de recuperare al furazolidonei și oxitetracilinei.

Studiul de recuperare a fost realizat folosind soluții de probă cu concentrațiile în domeniul 80%-120%.

2. Rezultate și discuții

Obiectivul acestei metode a fost de a concepe o metodă HPLC, care să permită separarea furazolidonei, 4-epioxitetracilinei, oxitetracilinei, tetraciclina clorhidrat, α-apo-oxitetraciclina și β-apo-oxitetraciclina.

Experimentul a fost efectuat folosind ca fază mobilă metanol-fosfat de potasiu dibasic 80 mM, pH 7,5 (20/80 /v/v) pe o colonă BDS C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 μm-dimensiunea particulelor).

Cromatograma amestecului format din standardele de furazolidona, oxitetraciclina și impurități este prezentată în figura 1.

Rezoluția, asimetria, timpul de retenție și talerele teoretice, parametrii calculați automat cu ajutorul soft-ului, sunt prezentați în tabelul 2.

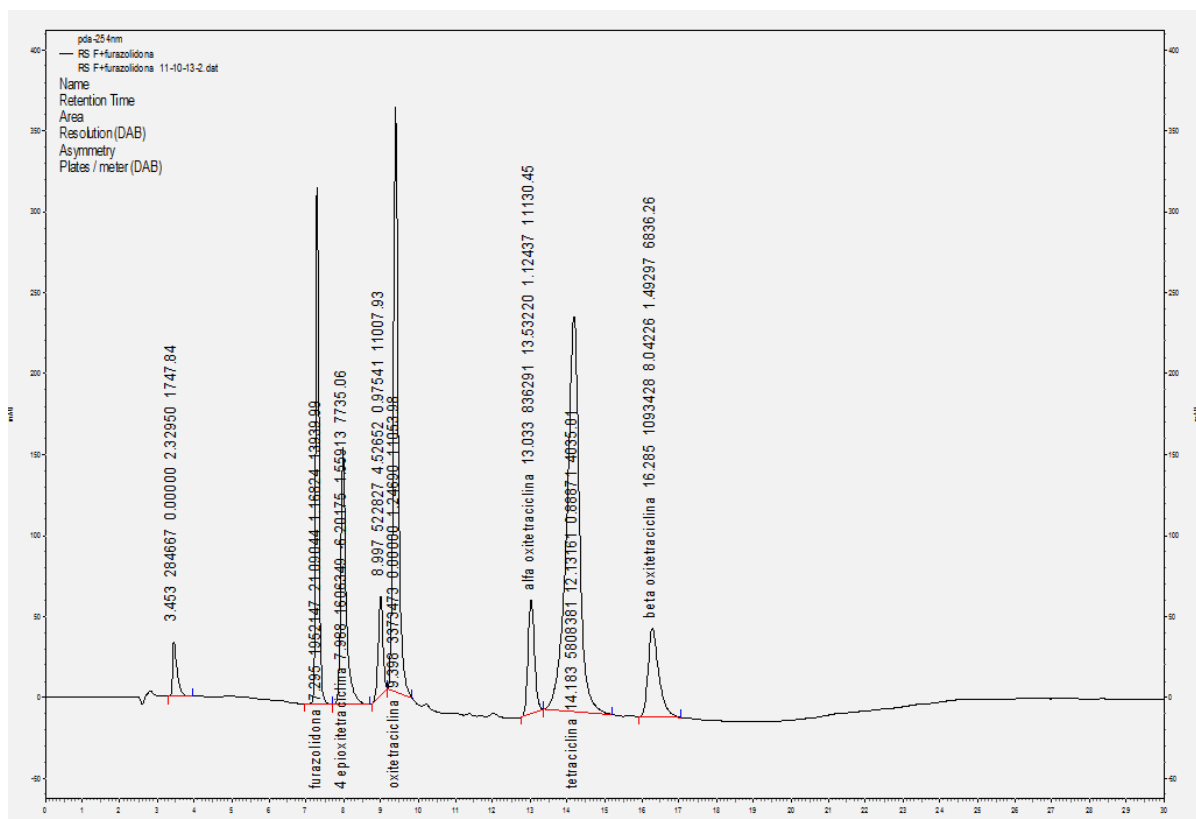


Figura 1. Cromatograma amestecului format din furazolidona, 4-epioxitetracilinei, oxitetracilinei, tetraciclina clorhidrat, α-apo-oxitetraciclina și β-apo-oxitetraciclina

Tabelul 2

Parametrii calculați pentru amestecul din figura 1.

Name	Timp de retenție	Rezoluție EP	Asimetrie	Talere teoretice	Factor de capacitate
Furazolidonă	7.295	21.09044	1.17	13939.99	13.59000
4 epioxytetracyclină	7.988	-6.20175	1.56	7735.06	14.97667
Oxytetracyclină	9.398	0.00000	1.25	11053.98	17.79667
α -apooxytetracyclină	13.033	13.53220	1.12	11130.45	25.06667
Tetracyclină	14.183	12.13161	0.89	4035.81	27.36667
β -apooxytetracyclină	16.285	8.04226	1.49	6836.26	31.57000

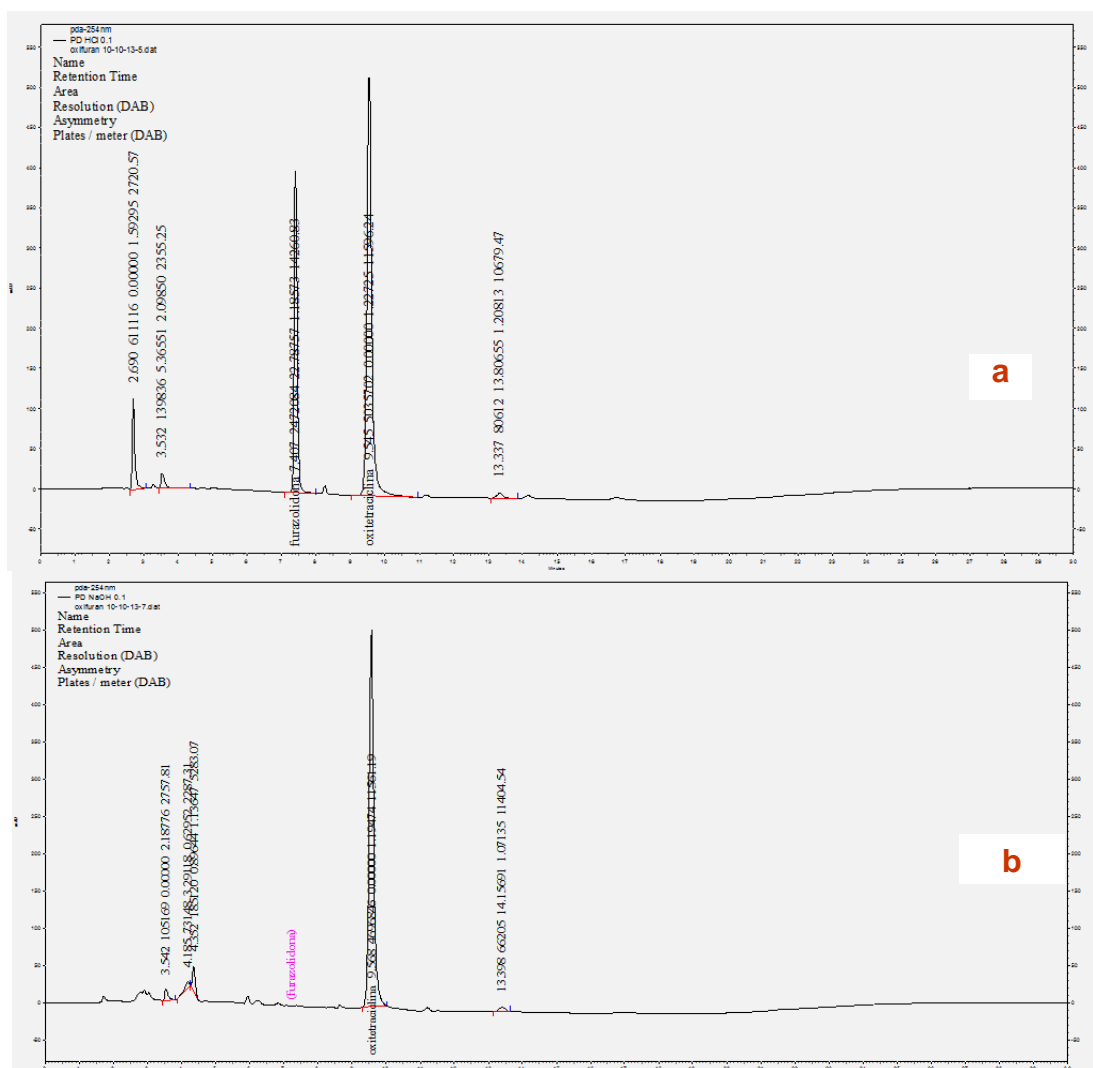
În studiul de degradare forțată, produsul **Oxifuran vitaminizat** - pulbere a fost analizat mediu acid, mediu bazic, mediu oxidant, în prezența luminii și a temperaturii, iar cromatogramele obținute sunt prezentate în figurile 2a-2e.

Metoda propusă se poate utiliza pentru determinarea catitativă a furazolidonei și oxitetracilinei în diferite medii.

Faza mobilă propusă și debit 1.0 mL/min s-au dovedit a fi adecvate pentru separarea furazolidonei ($t_R = 7.2$ min) și oxitetracilinei ($t_R = 9.3$ min) de substanțele inrudite.

Volumul de 10 μ L, lungimea de undă de 254 nm și temperatura de 25 $^{\circ}$ C s-au dovedit a fi potrivite pentru această metodă.

Rezultatele obținute în mediile de degradare folosite, sunt prezentate în tabelele 3-4.



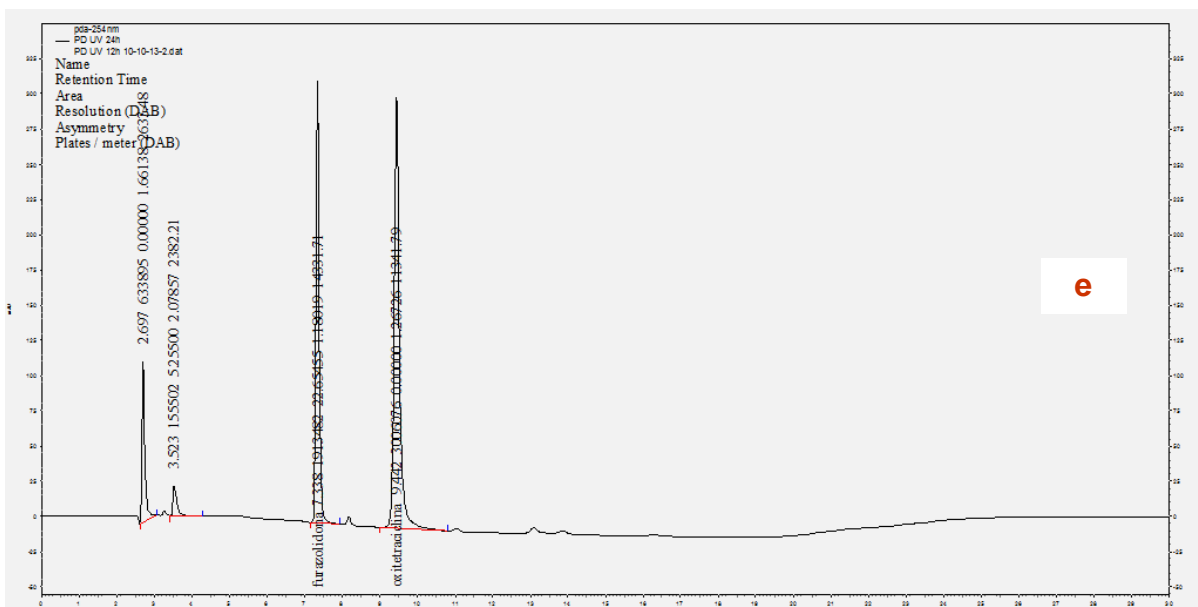
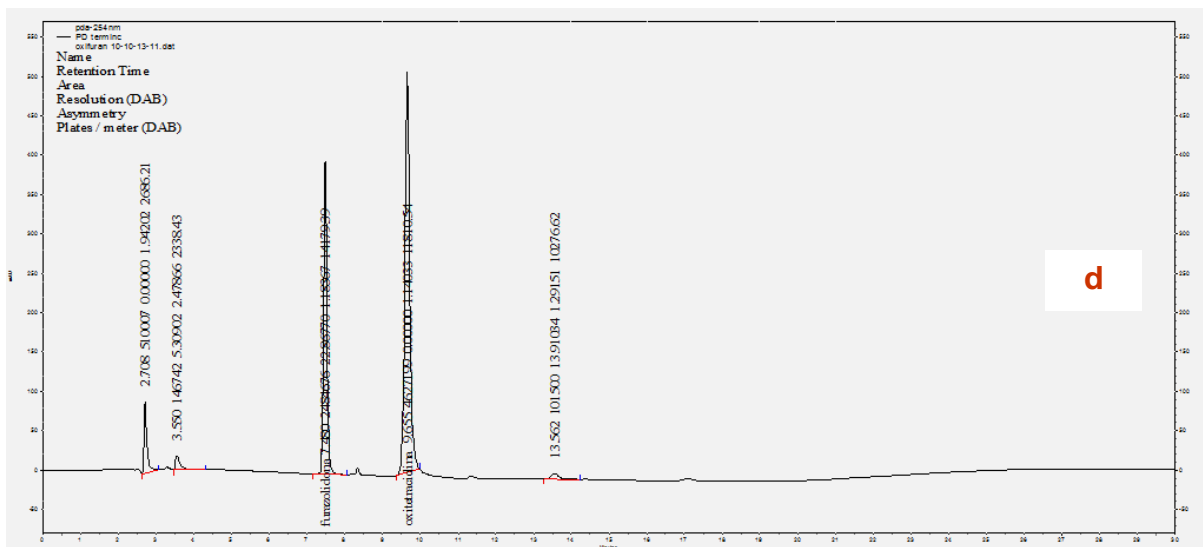
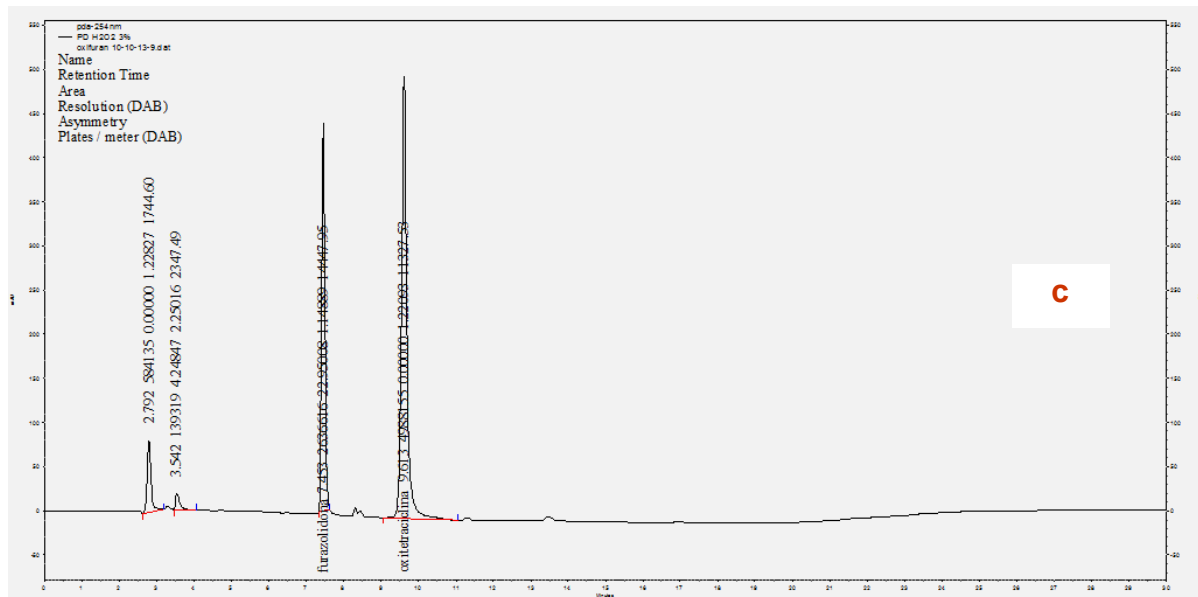


Figura 2. Cromatogramele obținute pentru produsul Oxifuran Vitaminizat în diferite medii de degradare (a) mediu acid, (b) mediu bazic, (c) mediu oxidant, (d) radiații UV, (e) degradare termică

Tabelul 3.

Rezultatele obținute cu metoda propusă în diferite medii de degradare.

Parametrii de degradare	Durata de degradare	Parametri calculați						
Substanțe	Furazolidona	Arie furazolidona după degradare	Arie furazolidona	% recuperare	% degradare	Timp de retenție	Asimetria	Talere/m
oxifuran vitaminizat	10 min	-	2667425	100	0	7.4	1.18	14379.24
PD HCl 0.1 N	90 min	2452178	2667425	91.93	8	7.4	1.18	14281.91
PD NaOH 0.1N	90 min	0	2667425	0.00	100	0.0	0.00	0
PD H ₂ O ₂ 3%	90 min	2636062	2667425	98.82	1	7.5	1.17	14452.09
PD terminc	60 min	2478007	2667425	92.90	7	7.5	1.18	14186.18
PD UV 24h	24 h	1896760	2667425	71.11	29	7.3	1.18	14347.38

Tabelul 4.

Degradation of oxytetracycline in Oxifuran Vitaminizat

Parametrii de degradare	Durata de degradare	Parametri calculati						
Substanțe	Oxitetraciclina	Arie oxitetraciclina după degradare	Arie oxitetraciclina	% recuperare	% degradare	Timp de retenție	Asimetria	Talere/m
oxifuran vitaminizat	10 min	4759968	4759968	100	0	9.5	1.18	11698.28
PD HCl 0.1 N	90 min	4753817	4759968	99.87	0	9.5	1.18	11711.71
PD NaOH 0.1 N	90 min	4645805	4759968	97.60	2	9.6	0.00	11632.01
PD H ₂ O ₂ 3%	90 min	4663116	4759968	97.97	2	9.6	1.17	11583.75
PD terminc	60 min	4580245	4759968	96.22	4	9.7	1.18	11874.39
PD UV 24h	24 h	2733119	4759968	57.42	43	9.4	1.18	11640.43

Liniaritatea curbelor de calibrare a fost investigată pe domeniile (0,0014-0,028 mg/mL furazolidona, 0,005-0,1 mg/mL oxitetraciclina) iar coeficientul de corecție obținut a fost mai mare de 0,999.

Rezultatele indică o excelentă corelare între aria peak-urilor și concentrațiile analitilor. Curbele de calibrare prezentate mai sus au fost folosite pentru determinarea limitelor de detecție și de cuantificare.

Limitele de detecție gasite sunt:

- 0,029 µg/mL, furazolidona și
- 0,086 µg/mL, oxitetraciclina, iar limitele de cuantificare:
- 0,097 µg/mL furazolidona și
- 0,286 µg/mL oxitetraciclina.

Precizia metodei a fost verificată atât din punct de vedere al reproductibilității, cât și al reproductibilității intermediare prin calcularea deviației standard.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5.
Results of method precision measurement

Substanța	Furazolidona (g%)		Oxytetracyclina (g%)	
	Intraday repeatability	Interday repeatability	Intraday repeatability	Interday repeatability
1	3.879	3.934	13.324	13.642
2	3.874	3.897	13.369	13.567
3	3.881	3.924	13.479	13.668
4	3.858	3.892	13.429	13.564
5	3.862	3.916	13.465	13.674
6	3.867	3.879	13.548	13.548
Media	3.870	3.907	13.436	13.611
RSD%	0.247	0.537	0.599	0.419

Acuratețea, exprimată ca procent de recuperare a substanțelor active, a fost calculată comparând valorile concentrației obținute cu valorile așteptate. Procentele de

recuperare obținute pe domeniul de concentrații 80% - 120%, a fost 99.59% pentru furazolidona și respectiv de 99,87% pentru oxitetraciclina (tabel 6).

Tabelul 6.
Acuratețea metodei

Substanțe active	Concentrație Teoretică (g%)	Concentrație găsită*(g%)	Procent de recuperare(%*)	Medie procent de recuperare(%)
Furazolidona	3.2	3.1746	99.2	99.59
	4	4.036	100.9	
	4.8	4.7366	98.68	
Oxitetraciclina	11.2	11.04	98.25	99.8791
	14	14.21	101.5024	
	16.8	16.78	99.88492	

Concluzii

Dezvoltarea metodelor analitice de determinare a substanțelor active joacă un rol important în cercetarea analitică datorită importanței în controlul de calitate. În controlul analitic, timpul și costurile pentru dezvoltarea și validarea metodelor sunt foarte importante. Obiectivul acestui studiu a fost dezvoltarea și validarea unei metode HPLC simple, rapide, economice și precise de estimare a furazolidonei și oxitetracilinei în formulările veterinare. Rezultatele obținute indică o corelare bună între timpii de retenție ai standardelor de furazolidonă și oxitetracilină cu proba de Oxifuran Vitaminizat.

Studiul de degradare confirmă stabilitatea furazolidonei și oxitetracilinei în diferite medii deoarece nu apar interferențe datorate produșilor de degradare. Deci se poate concluziona faptul că metoda poate

separa furazolidona și oxitetraciclina de produșii de degradare.

Rezultatele obținute în acest studiu, indică faptul că metoda HPLC propusă pentru este specifică, precisă și exactă pentru determinarea limitelor substanțelor înrudite și dozarea oxitetracilinei din produsul Oxifuran Vitaminizat

Bibliografie

1. **C.G.Smyrniotakis, Helen A. Archontaki** (2007). C 18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection.
2. **Katarzyna Pietruszka, Malgorzata Olejnik, And Bartosz Sell** (2007). Development and validation of liquid chromatography method for the determination of nitrofurans in water.
3. **Rajyalakshmi. Ch, benjamin. T and rambabu. C Katarzyna Pietruszka, Malgorzata Olejnik, And Bartosz Sell** (2013).forced degradation study on dronedarone and application of validated stability-indicating HPLC-UV method in stability testing of dronedarone tablets.
4. **European Pharmacopoeia 7.0** (2011), 2651-2653.
5. www.ich.org