

Dezvoltarea și validarea metodei RP–HPLC de determinare cantitativă a metronidazolului din comprimate și pulberi

Development and validation of a RP–HPLC method for the quantization studies of metronidazole in tablets and powders dosage forms

Elena Gabriela Oltean
Romvac Company SA

Rezumat

A fost dezvoltată și validată o metodă isocratică de lichid cromatografie de performanță înaltă pentru determinarea cantitativă a metronidazol din comprimate și pulberi. Separarea HPLC a fost realizată prin cromatografie în fază inversă pe o coloana Kromasil C₁₈ (mărimea particulelor 5 μm; 250 x 4,6 mm diametrul intern), termostată la 25°C. Faza mobilă a fost metanol/ sol. apoasă acid fosforic 0,1% (20/ 80 v/v), cu debit de 1 ml/ min, și detecție UV la 317 nm. Pentru validarea metodei au fost urmăriți următorii parametri–linearitatea ($r^2=0,9999$), intervalul, precizia, acuratețea, specificitatea, cantitatea minimă decelabilă LOD, cantitatea minimă măsurabilă LOQ. Metoda descrisă poate fi utilizată cu succes pentru analiza compusului farmaceutic activ din comprimate și pulberi.

Cuvinte cheie: metronidazol, Enteroguard, Columboviolet, Flagelstop, UV–VIS cromatografie de lichide de performanță ridicată de fază inversă, validare

Abstract

An isocratic high–performance liquid chromatography (HPLC) procedure was developed for quantitative determination of metronidazole in tablets and powders dosage forms. HPLC separation was carried out by reversed phase chromatography Kromasil C₁₈ (250 mm x 4.6 mm i.e.; 5 μm particle size), held at 25°C. The mobile phase consisted of methanol/ 0.1% phosphoric acid aq. (20/ 80 v/v), run at flow rate of 1 mL/ min and with UV detection at 317 nm. Method validation investigated parameters such as linearity ($r^2=0.9999$), range, precision, accuracy, specificity, limit of detection and limit of quantification. The described method can be successfully applied for the analysis of tablets and powders dosage forms.

Key words: metronidazole, Enteroguard, Columboviolet, Flagelstop, reversed phase high performance liquid chromatography RP–HPLC, UV–VIS, validation

Scopul lucrării a fost: dezvoltarea și validarea unei metode HPLC sensibile, aplicabile pentru determinarea cantității de metronidazol din comprimate și pulberi, contribuind la controlul de calitate și siguranța acestor tipuri de preparate farmaceutice.

Materiale și metode

Reactivi

Metronidazol standard de referință a fost furnizat de Sigma (Germania).

Metanolul și acidul fosforic au fost furnizate de Merck (Germania).

Comprimatele și pulberile cu metronidazol (Enteroguard, Columboviolet, Flagelstop) au fost furnizate de Romvac Company și au fost utilizate în timpul perioadei de valabilitate.

Toate substanțele chimice utilizate au fost de grad farmaceutic sau analitic.

A fost utilizată apă dublu distilată, filtrată pe membrane 0,45 μ.

Sistemul și condițiile cromatografice

Metoda HPLC a fost realizată pe un LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA) echipat cu pompă cuaternară, autosampler, buclă de 25 μl și detector UV–VIS–diode array (Thermo Electron Corporation, USA).

Integrarea picurilor cromatografice a fost realizată cu softul ChromQuest (Thermo Electron).

Analizele au fost realizate prin utilizarea unei coloane Kromasil C₁₈ (mărimea particulelor 5 μm; 250x4,6 mm diametrul intern).

Probele au fost eluate isocratic cu metanol și acid fosforic 0,1% sol. apoasă (20/80 v/v), cu debit de 1 ml/min.

Fiecare probă a fost filtrată înainte de injectare prin filtru de PVDF 0.45 μm (Thermo Electron).

Volumul de injectare al probelor a fost de 5μl, iar detecția s–a realizat la 317 nm, la 25°C.

Prepararea soluțiilor standard de referință

Soluția standard de lucru metronidazol a avut o concentrație finală de 0.1 mg/ ml, preparată în apă.

Soluțiile standard pentru liniaritate s-au încadrat în domeniul 0,01–0,20 mg/ml pornind de la o soluție stoc de metronidazol de 1 mg/ ml preparată în metanol.

Toate probele au fost realizate în triplicat.

Soluția stoc de metronidazol se păstrează la +4°C timp de o săptămână.

Prepararea soluțiilor de probe

Într-un balon cotate de 50 ml se cântărește o cantitate corespunzătoare de pulbere sau mojarat de comprimate pentru obținerea concentrației de 1 mg/ml metronidazol, se diluează la volum cu metanol și se ultrasonează timp de 20 minute.

Se filtrează pe hârtie de filtru și se diluează 1/10 la balon cotate cu apă.

Înainte de injectare soluțiile se filtrează prin filtru PVDF de 0.45 μm.

Validarea metodei cromatografice

După stabilirea condițiilor cromatografice metoda a fost validată urmărind următorii parametri: liniaritatea, intervalul de lucru, precizia, acuratețea, limita minimă de detecție, limita minimă de cuantificare, specificitatea și conformitatea sistemului, utilizând ghidul ICH.

Liniaritatea și intervalul de lucru

Curba analitică s-a obținut cu ajutorul a 7 concentrații diferite de metronidazol situate în domeniul 0,01–0,2 mg/ml, preparate în triplicat.

Liniaritatea a fost evaluată prin analiza regresiei lineare. Sistemul a fost echilibrat timp de cel puțin 30 minute.

Au fost injectate câte 3 replicat din fiecare concentrație de standard metronidazol în volum de 5 μl, pentru verificarea reproductibilității răspunsului detectorului la fiecare nivel de concentrație.

Precizia

Precizia metodei a fost determinată prin repetabilitate (în aceeași zi) și precizia intermediară (între mai multe zile).

Repetabilitatea a fost determinată prin 12 analize repetate ale aceleiași soluții de probă, în aceeași zi, în aceleiași condiții experimentale.

Precizia intermediară a metodei a fost determinată prin analiza în 2 zile (între zile), respectiv și de către un alt analist în cadrul aceluiași laborator (între analiști).

Acuratețea

Pentru confirmarea acurateței metodei propuse au fost analizate 9 probe utilizând 3 nivele concentrație care să acopere intervalul de lucru.

Conformitatea sistemului

Pentru asigurarea validității metodei analitice a fost realizat testul de conformitate a sistemului. În acest scop au fost injectate 6 probe conținând 0,1 mg/ ml metronidazol, injectate în volum de 5 μl.

Evaluarea conformității sistemului a fost realizată cu ajutorul softului ChromQuest, prin evaluarea parametrilor—arie, timp de retenție, asimetrie.

Analiza metronidazolului din comprimate și pulberi

Analiza conținutului în metronidazol din comprimate și pulberi a fost realizată pe baza metodei dezvoltate și propuse pentru validare utilizând standardul de referință.

Rezultate și discuții

Pentru determinarea cantității de metronidazol din comprimate și pulberi a fost propusă o metodă HPLC de fază inversă, fiind selectate condițiile optime de separare cromatografică.

Din analiza cromatogramelor se constată că nu există interferențe între compusul de interes și restul constituenților matricei, timpul de retenție pentru metronidazol fiind de 5 min. Asimetria peak-ului a fost bună, egală cu 1,0.

Curbele de calibrare pentru metronidazol au fost construite prin reprezentarea ariei peak-ului față de concentrație.

A fost observată liniaritatea în domeniul de referință ales. Intervalul de concentrație a fost 10–200% față de concentrația de lucru.

Aplicând regresia liniară pentru curba de calibrare, a fost stabilit un coeficient de determinare $r^2=0,999698$.

Precizia metodei reprezintă gradul de conformitate între rezultatele testelor individuale, prin aplicarea repetată a metodei pe probe multiple ale unei serii omologe.

Repetabilitatea a fost studiată prin calcularea deviației relative standard (RSD) a 12 probe cu concentrație 0,1 mg/ml metronidazol, realizate în aceeași zi și în aceleiași condiții experimentale.

Precizia intermediară include estimarea variabilității analizei atunci când metoda este utilizată între laboratoare diferite, în zile diferite, de către analiști diferiți sau cu echipamente diferite.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1
Concentrația, precizia și precizia intermediară în metoda HPLC pentru metronidazol

Parametru	Valoare
Concentrația	0,1 mg/ml
RSD% (aceeași zi)	1,433%
RSD% (între zile)	1,658%

Acuratețea metodei este gradul de apropiere a rezultatelor practic obținute cu ajutorul metodei comparativ cu valoarea teoretică. Acuratețea a fost determinată prin analiza a câte 9 probe conținând metronidazol, în concentrație de 80, 100, 120% față de concentrația de lucru propusă (0,08, 0,10, 0,12 mg/ml).

Tabel 2
Recuperarea metronidazol din probele analizate prin RP-HPLC

Concentrația teoretică a probei mg/ml	% Recuperare ^a	Acuratețea %
0,08	105,499%	
0,10	104,742%	103,442%
0,12	102,667%	

^amedia a 3 replicare

Din analiza datelor prezentate în Tabelul 2 se constată că metoda prezintă acuratețe în intervalul propus, procentul mediu de recuperare fiind de 103,442% pentru compusul de interes—metronidazol.

Pentru evaluarea rezoluției și reproductibilității sistemului de analiză propus au fost realizate teste de conformitate.

Rezultatele prezentate în Tabelul 3 arată faptul că parametri sunt în limitele de conformitate.

Tabel 3
Rezultatele testului de conformitate a sistemului pentru metronidazol

Parametru	Minim	Maxim	RSD(%)	Status
Asimetrie	1,0668	1,08237	0,618	passed
Timp de retenție	5,037	5,043	0,044	passed
Aria	3813563	3977652	1,651	passed

Limitele de detecție și de cuantificare au fost calculate, obținându-se următoarele valori:

Tabel 4
Limitele de detecție și de cuantificare pentru metronidazol

Component	LOD	LOQ
Metronidazol	0,000105 mg/ml	0,000351 mg/ml

Concluzii

1. Rezultatele prezentate în validarea metodei RP-HPLC arată acuratețea, liniaritatea, precizia acesteia cât și limitele de detecție și de cuantificare.
2. Metoda poate fi utilizată cu succes pentru cuantificarea metronidazol ca substanță activă în comprimate și pulberi.
3. Metoda propusă are avantajul utilizării unei proceduri analitice comode, care necesită o preparare simplă a probelor.
4. Metoda poate fi utilizată astfel pentru analiza de rutină.

Bibliografie (în ordinea citării)

1. **Emami, J., Ghasammi, N., Hamishehkar, H. (2006).** A rapid and sensitive HPLC method for the analysis of metronidazole in human plasma: application to single dose pharmacokinetic and bioequivalence studies. *DARU.*, **14(1)**, 15–21.
2. **Mustapha, K.B., Odunola, M.T., Garba, M. Obodozie, O. (2006).** Rapid, cost effective liquid chromatographic method for the determination of metronidazole in biological fluids. *African Journal of Biotechnology*, **5(13)**, 1188–1191.
3. **Wheeler LA, De-Meo M, Halula M, George L, Heseltine P. (1978).** Use of high-pressure liquid chromatography to determine plasma levels of metronidazole and metabolites after intravenous administration. *Antimicrob Agents Chemother.* **13(2)**, 205–209
4. <http://www.findarticles.com>
5. <http://www.inchem.org>
6. <http://www.ich.org>
7. <http://www.waters.com>
8. <http://www.ncbi.nlm.gov.com>
9. <http://www.inchem.org>
10. <http://www.thermoscientific.com>