

Studiul de degradare forțată a metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei folosind Cromatografia de Lichid de Înaltă Performanță

Forced degradation of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone Study using High Performance Liquid Chromatography

Violeta Tauber (Giugiu), Viorica Chiurciu

Romvac Company S.A.

Cuvinte cheie: metronidazol, oxitetraciclina, furazolidona, studiu de degradare forțată, coloana C 18.

Key words: metronidazol, oxytetracycline, furazolidone, forced degradation studies, C 18 column.

Rezumat

Studiul descrie dezvoltarea unei metode HPLC –DAD pentru estimarea metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei din produsul Enteroguard M – pulbere. În metoda propusă, separarea s-a făcut pe o coloană Betasil C 18, (4.6 x 250 mm, 5 μm) la 30⁰ C, folosind eluția în gradient a fazei mobile formată din tampon fosfat 40 mM (pH=7.5) și metanol. Achiziția s-a făcut la lungimea de undă de 254 nm, folosind un debit de 1mL/min. Produsul a fost expus următoarelor condiții de stres: temperatura, lumina, agenți oxidanți, hidroliza în mediu acid și mediu bazic, și probele rezultate au fost analizate prin metoda propusă.

Abstract

The study describes development of a HPLC -DAD method for the estimation of oxytetracycline and furazolidone in Enteroguard M- powder. The proposed method utilizes a Betasil C 18 column, (4.6 x 250 mm, 5 μm), at 30⁰ C, optimum mobile phase consisted of 40 mM phosphate buffer (pH=7.5): methanol in gradient elution. The flow rate was optimized to 1mL/min and the detection was carried at 254 nm. The drug substance was exposed to temperature, light, oxidants, acid and basic hydrolysis, and the resultant samples were analysed by the proposed method

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 o grupare nitro. Aceasta grupare are o activitate antibacteriană și antiparazitărilor largă, și din acest motiv nitrofuranii sunt larg utilizați în

tratamentul infecțiilor gastrointestinale la pasărele de colivie, pisici și câini.

Metronidazolul posedă activitatea contra protozoarelor și bacteriilor anaerobe, fiind utilizat atât preventiv cât și curativ.

Scopul acestui studiu este de a dezvolta o nouă metodă HPLC pentru evaluarea furazolidonei, oxitetraciclinei și substanțelor înrudite din produsele destinate uzului veterinar.

1. Materiale și metodă

1.1. Materiale de referință și reactivi

Standardul de oxitetraciclină, precum și următoarele substanțe înrudite, au fost achiziționate de la Farmacopeea Europeană:

- 4-epioxitetraciclina, (4-EOTC);

- tetraciclina clorhidrat, (TC);
- α -apo-oxitetraciclina, (α -AOTC);
- β -apo-oxitetraciclina, (β -AOTC).
- Standardul de furazolidona a fost achiziționat de la USP.
- Standardul de metronidazol, precum și impuritatea A, au fost achiziționate de la Farmacopeea Europeană.
- **Produsul medicamentos** supus studiului, Enteroguard M – 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 furnizat de Merck.
- Fosfatul de potasiu dibazic grad HPLC, acidul clorhidric și hidroxidul de sodiu au fost furnizate de Fluka.
- Apa oxigenată a fost furnizată de Chimreactiv SRL.
- Acidul ortofosforic 85%, folosit pentru ajustarea pH-ului, a fost achiziționat de la Merck.
- Dimetilformamida folosită pentru prepararea probelor, a fost achiziționată de la Sigma.

1.2. Sistem și condiții cromatografice

Separarea cromatografică a substanțelor active (metronidazol, oxitetraciclina și furazolidona) de impuritățile lor (impuritate A, 4-epioxitetraciclina, tetraciclina, alfa-apo-oxitetraciclina, beta-apo-oxitetraciclina) și de eventualii produși de degradare, s-a făcut pe o coloană Betasil C 18, (4.6 x 250 mm, 5 μ m).

Eluția în gradient, a fazei mobile formată din tampon fosfat 40 mM (pH=7.5) și metanol, reprezintă condițiile potrivite pentru această separare cromatografică.

Achiziția s-a făcut la lungimea de undă de 254 nm, la 30 °C folosind un debit de 1 mL / min.

Gradientul folosit pentru eluție este prezentat în tabelul 1.

Tabelul 1

Programul gradientului folosit pentru separare

Time (min)	% solvent A METANOL	% solvent B HK ₂ PO ₄
0.00	25.00	75.00
9.00	43.00	57.00
18.00	43.00	57.00
22.00	25.00	75.00
30.00	25.00	75.00

1.3. Prepararea soluțiilor standard

Soluția standard de metronidazol (C= 0.5 mg/mL) a fost preparată în metanol. Soluția standard de furazolidona (C= 0.5 mg / mL) a fost preparată în DMF.

Soluția standard stoc de oxitetraciclina (C= 1 mg / mL) a fost preparată în HCl 0,01 M.

Soluțiile de lucru de diferite concentrații (0.08 mg/mL metronidazol, 0.05 mg/mL oxitetraciclina, 0.017 mg/mL furazolidona) au fost preparate din stocurile precizate și diluate cu HCl 0,01 M.

Soluțiile au fost agitate bine, filtrate prin filtru PVDF 0,45 μ m și injectate în sistemul cromatografic.

Prepararea stocurilor de impurități s-a făcut cântărind, separat, 4-epioxitetraciclina (C= 1 mg/mL), tetraciclina clorhidrat (C= 1 mg/mL), alfa-apo-oxitetraciclina (C= 0.08 mg/mL) și beta-apo-oxitetraciclina (C= 0.08 mg/mL), etapă urmată de dizolvarea în HCl 0,01 M. Impuritatea A (C= 1mg/mL), a metronidazolului a fost dizolvată în metanol.

Soluțiile s-au agitat pe baie de ultrasunete timp de 10 minute. Soluțiile de lucru de diferite concentrații au fost preparate în HCl 0,01 M. Stocurile soluțiilor standard au fost păstrate la frigider.

1.4. Prepararea soluțiilor de probe

Cantitatea de pulbere echivalentă cu 66.6 mg metronidazol, 40 mg de oxitetraciclina și 13.3 mg de furazolidona, a fost cântărită într-un balon cotat de 50 mL. Peste această cantitate s-au adăugat 15 mL de HCl 0,01M, 5 mL metanol 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. Din aceasta soluție s-au preparat soluțiile de lucru în HCl 0,01 M, pentru a obține concentrațiile finale de 0.08 mg/mL metronidazol, 0.05 mg/mL oxitettraciclină, 0.017 mg/mL.

Soluțiile au fost agitate bine, filtrată prin filtru PVDF 0,45 μm și injectate în sistemul cromatografic.

1.5. Studiul de degradare

Studiul de degradare a fost realizat pentru a evalua specificitatea metodei analitice în prezența impurităților și a produșilor de degradare.

Soluția stoc - probă

Intr-un balon cotelat de 50 mL au fost cântărite 0.6666 g de Enteroguard M - pulbere, cantitatea fiind echivalentă cu 66.6 mg metronidazol, 40 mg de oxitettraciclină și 13.3 mg de furazolidona. Peste această cantitate s-au adăugat 15 mL de HCl 0,01M, 5 mL metanol 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.

Degradarea în mediu acid

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de proba au fost tratați cu 6 mL de HCl 0.1 N timp de 90 minute la temperatura de 25⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μm .

Degradarea în mediu bazic

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de proba au fost tratați cu 6 mL de NaOH 0.01 N timp de 90 minute la temperatura de 25⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în

sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μm .

Degradarea oxidativă

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de proba au fost tratați cu 6 mL de H₂O₂ 3% timp de 90 minute la temperatura de 25⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μm .

Degradare termică

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de proba au fost tratați cu 6 mL de HCl 0,01 M timp de 60 minute la temperatura de 60⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μm .

Degradarea fotolitică

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL au fost expuși la lungimi de undă scurte (253nm) timp de 12 h. După expirarea timpului, volum de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μm .

2. Rezultate și discuții

Metoda propusă s-a dovedit a fi adecvată pentru determinarea metronidazolului, oxitettraciclinei și furazolidonei în prezența agenților de degradare.

Faza mobilă, formată din metanol și fosfat de potasiu dibazic 40 mM ajustat la pH 7.5, este optimă, prezentând o separare corespunzătoare a:

- metronidazolului ($t_R = 5.6$ min),
- furazolidonei ($t_R = 7.2$ min),
- oxitettraciclinei ($t_R = 10.5$ min).

În prezența substanțelor înrudite la un debit de 1 mL/min. Volumul de 10 μL , lungimea de undă de 254 nm și temperatura de 35 °C s-

au dovedit a fi potrivite pentru această cromatogramele din figurile 1-5, iar metodă. Rezultatele obtinute in urma insumarea parametrilor calculati in tabelele studiului de degradare sunt ilustrate in 3-5.

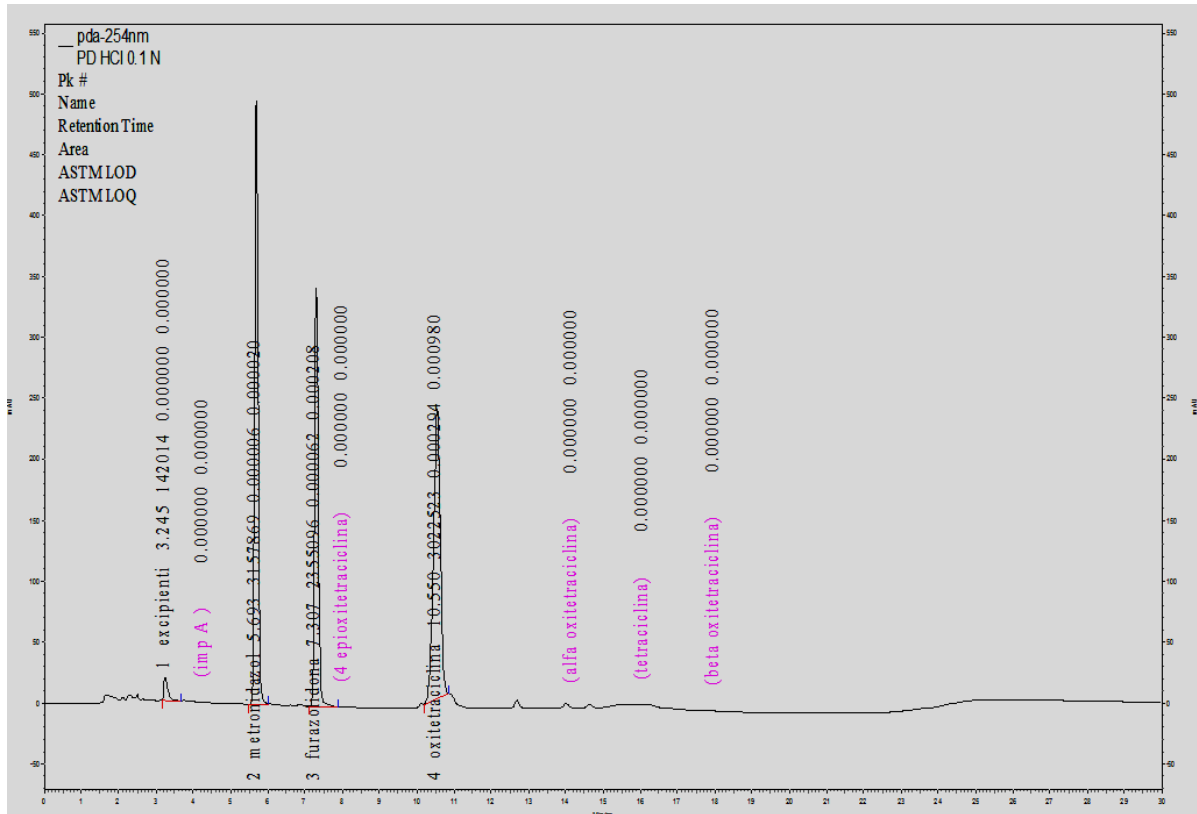


Fig. 1. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in mediu acid.

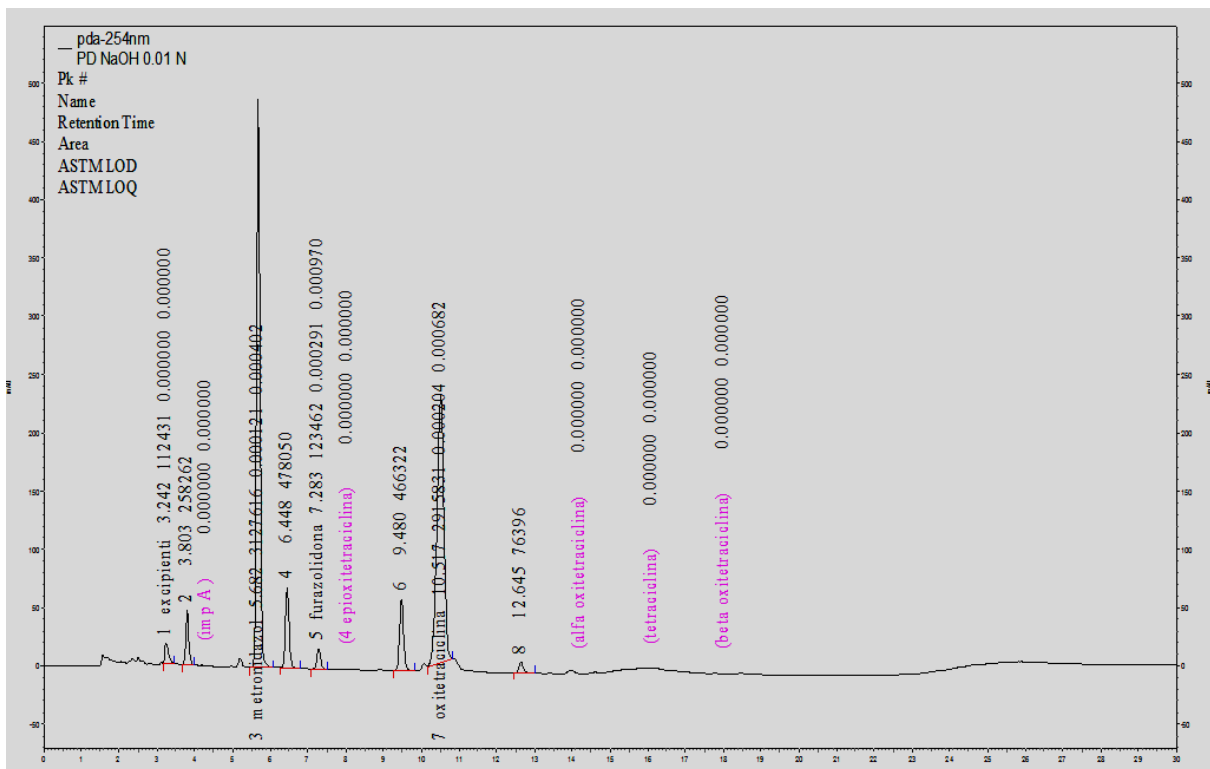


Fig. 2. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in mediu bazic.

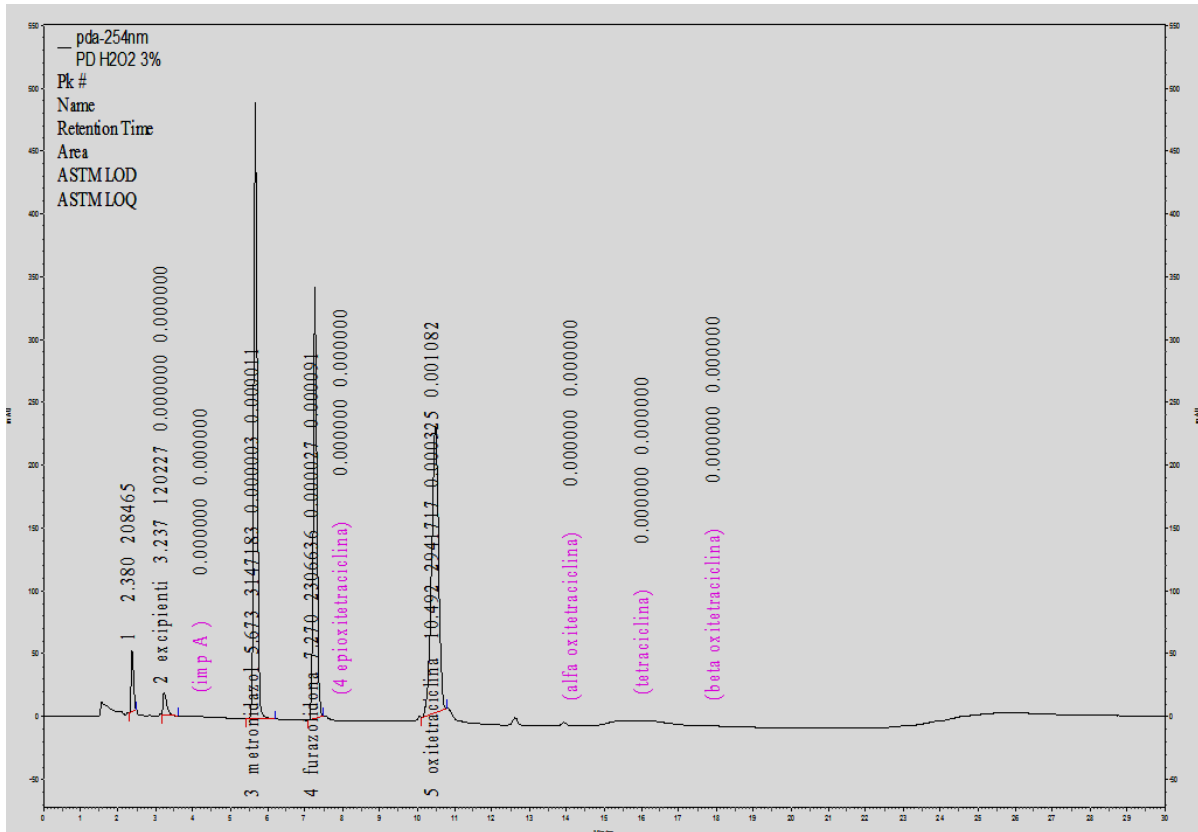


Fig .3. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in mediu oxidant.

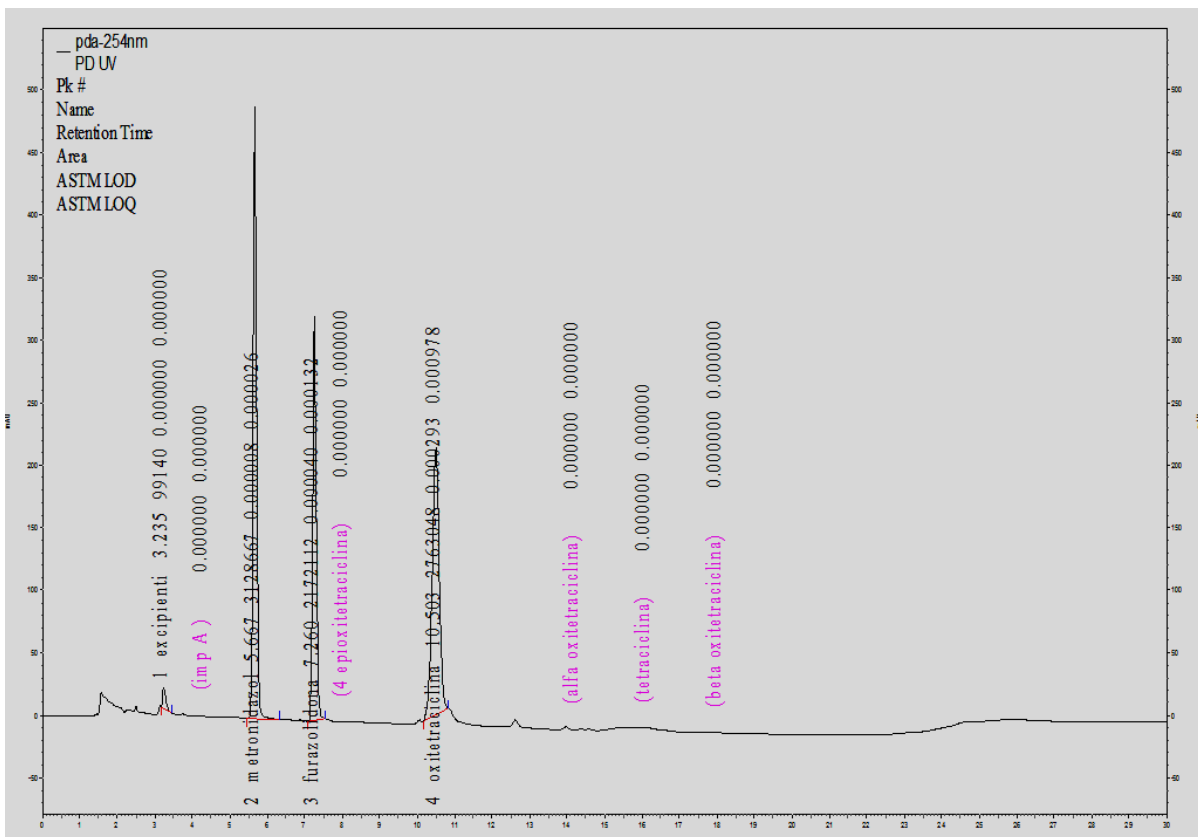


Fig .4. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in prezenta radiatiilor UV

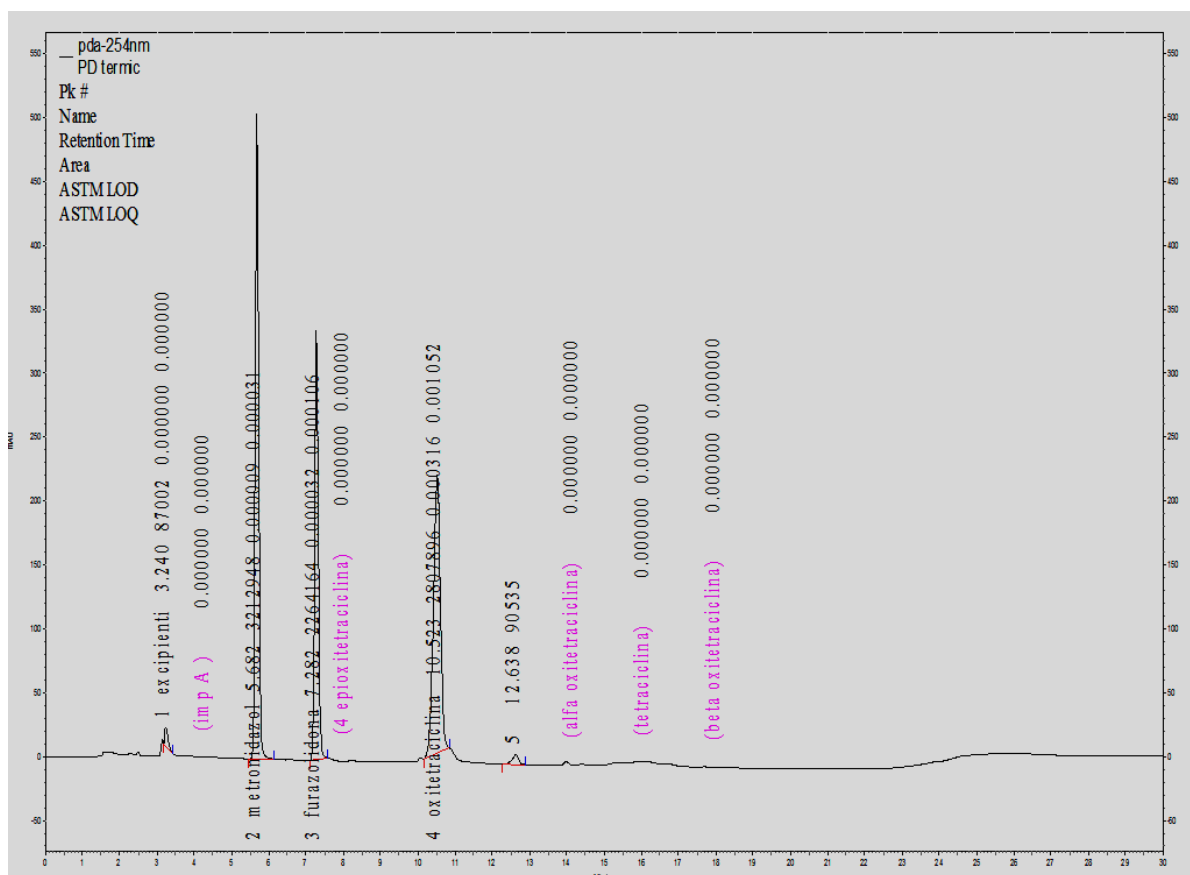


Fig .5. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in prezenta temperaturii.

Tabelul 3.

Rezultatele obținute pentru Enteroguard M - pulbere în diferite medii de degradare.

Condițiile de stres	Durata de degradare	Parametrii calculati					
	Metronidazol	Aria	% recuperare	% degradare	Timp de retentie	Asimetria	Talere teoretice
enteroguard M pulbere	10 min	3228117			5.68	1.12063	18845.00
PD HCl 0.1 N	90 min	3157869	97.82	2.18	5.69	1.12027	18912.00
PD NaOH 0.01 N	90 min	3127616	96.89	3.11	5.68	1.10828	18763.00
PD H2O2 3%	90 min	3147183	97.49	2.51	5.67	1.11132	18667.00
PD termic	60 min	3128667	96.92	3.08	5.67	1.1239	18871.00
PD UV	720 min	3212948	99.53	0.47	5.68	1.11635	19035.00

Tabelul 4.

Rezultatele obținute pentru Enteroguard M - pulbere în diferite medii de degradare.

Condițiile de stres	Durata de degradare	Parametrii calculati					
	Furazolidona	Aria	% recuperare	% degradare	Timp de retentie	Asimetria	Talere teoretice
enteroguard M pulbere	10 min	2481414			7.282	1.11455	27157
PD HCl 0.1 N	90 min	2355096	94.91	5.09	7.307	1.1207	27461
PD NaOH 0.01 N	90 min	123462	4.98	95.02	7.283	1.10625	26954
PD H2O2 3%	90 min	2306636	92.96	7.04	7.27	1.09643	27164
PD termic	60 min	2172112	87.54	12.46	7.26	1.11123	27408
PD UV	720 min	2264164	91.24	8.76	7.282	1.10136	27536

Tabelul 5.

Rezultatele obținute pentru Enteroguard M - pulbere în diferite medii de degradare.

Condițiile de stres	Durata de degradare	Parametrii calculati					
	Oxitetraciclina	Aria	% recuperare	% degradare	Timp de retentie	Asimetria	Talere teoretice
enteroguard M pulbere	10 min	3106282			10.50	0.91604	16222.00
PD HCl 0.1 N	90 min	3022523	97.30	2.70	10.55	0.92040	16476.00
PD NaOH 0.01 N	90 min	2915831	93.87	6.13	10.52	0.91773	16284.00
PD H ₂ O ₂ 3%	90 min	2941717	94.70	5.30	10.49	0.90556	15752.00
PD termic	60 min	2763048	88.95	11.05	10.50	0.95738	16003.00
PD UV	720 min	2807896	90.39	9.61	10.52	0.93563	16204.00

Concluzii

Lipsa peak-urilor suplimentare, indica faptul ca produsul este stabil in mediu acid.

Produsul Enteroguard M- pulbere este sensibil in mediu alcalin, deoarece dupa expunerea la temperatura de 25 °C in NaOH 0.01N, timp de 90 minute, furazolidona s-a degradat aproximativ 95 %, si apar trei peak-uri suplimentare cu retentie la minutele: 3.8, 6.4, 9.4.

In urma expunerii produsului Enteroguard M pulbere la radiatiile ultraviolete, la temperatura de 60 °C (timp de 60 de minute), precum și în prezența apei oxigenate 3%, nu s-a observat apariția de peak-uri de degradare, ceea ce indica faptul ca produsul este stabil in prezenta urmatorilor agenti: oxidat, termic si fotolitic.

Studiul de degradare ne indica faptul ca in mediul bazic, furazolidona se degradeaza 95%, in timp ce in mediu fotolitic, furazolidona se degradeaza 12%, iar oxitetraciclina 11%.

În acest studiu a fost folosita o metoda HPLC noua pentru determinarea impuritatilor si substantelor active din produsul Enteroguard M pulbere în prezenta agentilor de degradare.

Metoda poate fi aplicată cu succes pentru acest produs deoarece nu s-au observat interferențe datorate excipienților sau altor compuși rezultați din produsul farmaceutic.

Bibliografie

1. **Smyrniotakis, CG, Archontaki HA** (2007). C 18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection.
2. **Yunqi Wu, Reza Fassihi** (2005). Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination
3. **Pietruszka K, Olejnik M, Sell B.** (2007). Development and validation of liquid chromatography method for the determination of nitrofurans in water.
4. **Rajyalakshmi. Ch, benjamin. T and rambabu. C Pietruszka K, Olejnik M, Sell B.** (2013). Forced degradation study on dronedarone and application of validated stability- indicating HPLC-UV method in stability testing of dronedarone tablets.
5. **European Pharmacopoeia 7.0** (2011), 2651-2653.
6. www.ich.org