

## Dezvoltarea si validarea unei metode HPLC pentru determinarea metronidazolului, oxitetraciclinei si furazolidonei din produse farmaceutice veterinare

### Development and validation of a HPLC method for the determination of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone in veterinary formulations

Violeta Tauber (Giugiu), Viorica Chiurciu

Romvac Company S.A.

**Cuvinte cheie:** *determinare simultană ,metronidazol, furazolidona, oxitetraciclinei, metoda HPLC*  
**Key words:** *simultaneous determination, metronidazole, furazolidone, oxytetracycline, HPLC method*

#### Rezumat

Determinarea metronidazolului, oxitetraciclinei si furazolidonei s-a facut printr-o metoda de cromatografie de lichid de inalta performanta, prin elutie izocratica. Faza mobila a fost formata din fosfat de potasiu monobazic 50 mM cu pH 2.5, metanol si acetonitril (70:18:12). Detectia s-a facut la lungimea de unda de 264 nm, folosind un debit de 1.100 mL/min. Separarea s-a realizat pe o coloana Nucleosil C18 column, 5 µm 250 mmx 4.6 mm, mentinuta la temperatura de 25 °C. Metoda a fost validata urmarind parametrii: system suitability, liniaritate, limita de detectie si de cuantificare, precizie si acuratete.

#### Abstract

An isocratic reversed phase high performance liquid chromatographic method with DAD detection was developed for the analysis of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone. The mobile phase consisted of pH 2.5 phosphate buffer solution, methanol and acetonitrile (70:18:12). The UV detection was carried out at 264 nm, and the flow rate was 1.100 mL/min. The separation was carried out on a Nucleosil C18 column, 5 µm 250 mmx4.6 mm, which was maintained at 25 °C. This method was validated by system suitability parameters, linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy

#### 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 antiparazitară largă, și din

acest motiv nitrofuranii sunt larg utilizați în tratamentul infecțiilor gastrointestinale la pasările de colivie, pisici și câini.

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

Metoda propusă este simplă, precisă, specifică și mai presus de toate, este adecvată pentru determinarea metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei din produsul Enteroguard M-pulbere.

#### 1. Materiale și metodă

##### 1.1. Materiale de referință și reactivi

- Standardul de metronidazol a fost achiziționat de la Sigma.

- Standardul de oxitetraciclină de la Farmacopeea Europeană.
- Standardul de furazolidona a fost achiziționat de la USP Produsul farmaceutic supus studiului, Enteroguard M comprimate 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 și acetonitrilul grad HPLC, au fost furnizate de Merck.
- Fosfatul de potasiu monobazic grad HPLC și acidul clorhidric au fost furnizate de Fluka.
- Acidul ortofosforic 85%, folosit pentru ajustarea pH-ului, a fost achiziționat de la Merck.
- Dimetilformamida (DMF) folosită pentru prepararea probelor, a fost achiziționată de la Sigma.

## 1.2. Sistem și condiții cromatografice

Sistemul cromatografic folosit LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA) este echipat cu pompă cuaternară, autosempler, bucla de 25  $\mu$ L, termostat pentru coloană, termostat pentru autosampler și detector UV-VIS diode array.

Întregul sistem cromatografic este controlat cu softul ChromQuest.

Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Nucleosil C18, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm. Faza mobilă folosită conține: fosfat de potasiu monobazic 50 mM cu pH 2,5, metanol și acetonitril (70:18: 12).

Debitul de 1.1 mL/min, lungimea de undă de 254 nm și volumul de injecție de 10  $\mu$ L sunt parametrii setați pentru această metodă.

## 1.3 Preparare soluții standard stoc

Soluția standard de metronidazol a fost preparată dizolvând 10 mg de standard în 10 mL de metanol.

Soluția standard de furazolidona a fost preparată dizolvând 10 mg de standard în 10 mL DMF.

Soluția standard stoc de oxitetraciclină clorhidrat a fost preparată, dizolvând 10 mg de standard în 10 mL HCl 0,01 M.

## 1.4. Prepararea probelor

Într-un balon cotelat (de 50 mL) au fost cântărite 0.254 g de Enteroguard M - pulbere, (cantitate echivalentă cu 25 mg de metronidazol, 15 mg de oxitetraciclină și 5 mg de furazolidona.

Peste această cantitate s-au adăugat 5 mL de HCl 0,1M, 8 mL DMF și 15 mL apă, iar soluția obținută s-a ultrasonat timp de 10 minute.

## 1.5. Validarea metodei cromatografice

Această metodă a fost validată urmărind mai mulți parametri: specificitate, liniaritate, limită de detecție și cuantificare, precizie și acuratețe.

Specificitatea a fost verificată calculând parametrii ca: timp de retenție, talere teoretice, asimetrie, rezoluție și factor de capacitate.

Pentru stabilirea liniarității curbelor de calibrare, o serie de cinci concentrații în domeniul 10%-200% au fost preparate din soluțiile stoc de metronidazol, oxitetraciclină și furazolidonă.

Curbele de calibrare efectuate au fost folosite pentru determinarea limitelor de detecție și de cuantificare.

Precizia metodei a fost determinată prin injectarea a șase probe individuale de Enteroguard M- pulbere.

Acuratețea metodei poate fi evaluată prin procente de recuperare ale metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei.

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 dezvolta o metodă HPLC, care să permită separarea metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei.

O cromatograma tipică a unei probe de Enterogurd M-pulbere este prezentată în figura 1. Substanțele active au fost separate cu o asimetrie bună în opt minute.

Timpii de retenție au fost 2.5, 4.1 și respectiv 5.3 pentru metronidazol, oxitetraciclina și furazolidona.

Confirmarea identificării substanțelor active a fost făcută cu ajutorul soft-ului, cu care s-au calculat și alți parametri de performanță ca rezoluția, asimetria, timpul de retenție și talerele teoretice, tabelul 2.

Evaluarea statistică a rezultatelor obținute pentru substanțele active din produsul Enteroguard M –pulbere sunt prezentate în tabelul 3.

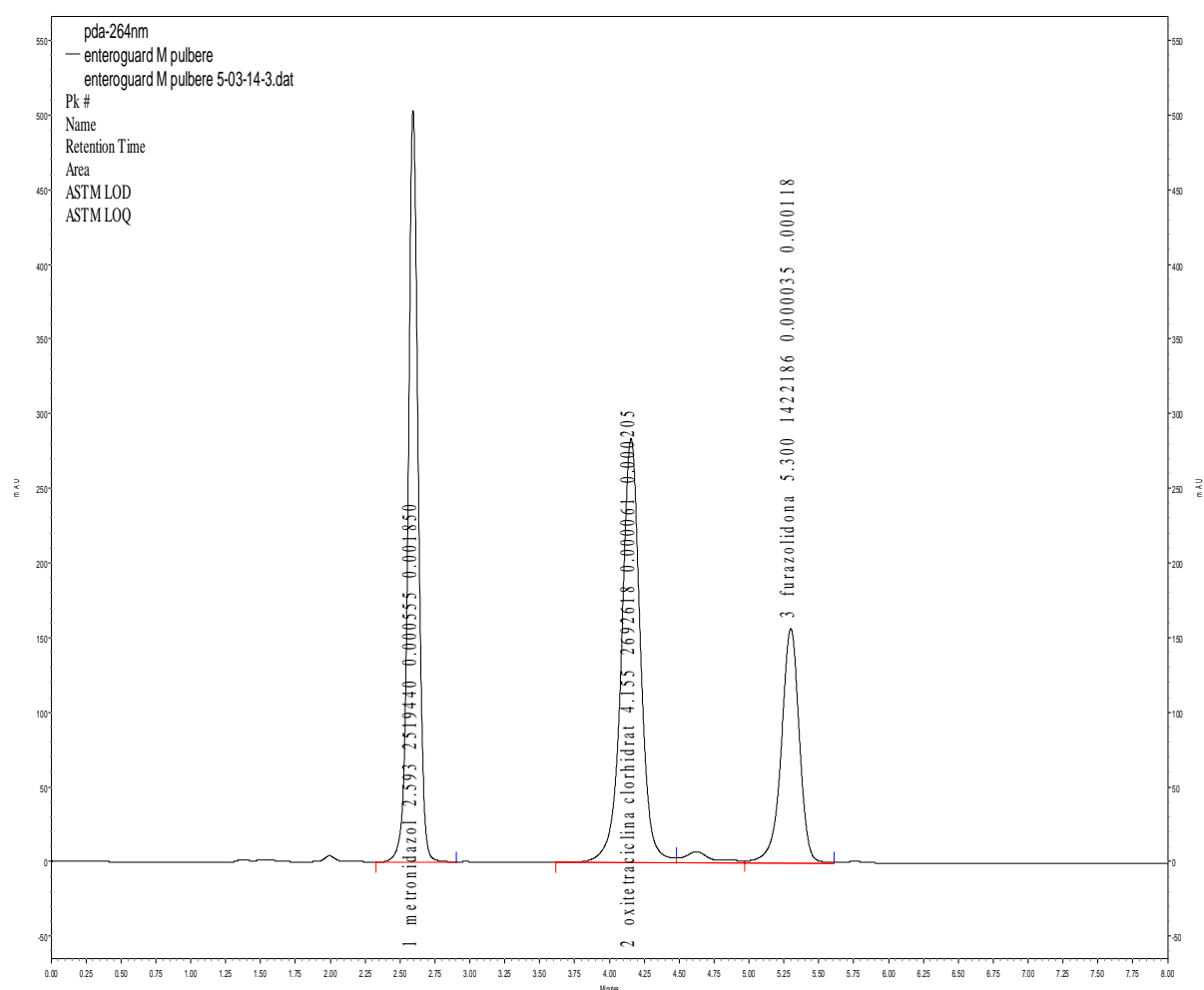


Fig.1. Cromatograma tipică a produsului Enterogurd M - pulbere

Tabelul 1

Parametrii calculați pentru amestecul din figura 1.

Substanța	Timp Retenție	Aria	Rezoluție	Asimetria	Capacity factor	Talere teoretice
Metronidazol	2.593	2519440	0.00000	1.01999	2	6726
Oxitetraciclina clorhidrat	4.155	2692618	8.67410	0.97944	3	5021
Furazolidona	5.300	1422186	4.96785	0.90892	4	8673

**Tabelul 2**

## Rezultatele metodei validate

Parametri de validare	Metronidazol	Oxitetraciclina	Furazolidona
LOD mg/mL	0.000358	0.000130	0.001109
LOQ mg/mL	0.001194	0.000432	0.003696
Ecuatie de regresie	$y=2.26968e-008x-0.00134127$	$y=1.21776e-008x-4.94260e-006$	$y=7.58344e-008x-4.94260e-006$
Coeficientul de corelatie (r2)	0,998711	0.999608	0.999608
Domeniul de liniaritate mg/mL	0.005-0.1	0.003-0.06	0.001-0.02
Repetabilitate %RSD n=6	0.356	0.301	0.333
Reproductibilitate %RSD	0.525	0.383	0.500
% recuperare	100.7	97.49	89.72

**Concluzii**

In acest studiu, parametrii analitici pentru cele trei substante active au fost optimizati folosind cromatografie de lichid de inalta performanta.

Separarea s-a facut izocratic, cu faza mobila formata din fosfat de potasiu monobazic 50 mM cu pH 2.5, metanol si acetonitril (70:18: 12) si un debit de 1.100 mL/min.

Timpul analizei cromatografice a fost scurt (8 min), iar rezolutia peak-urilor este buna pentru toate substantele active.

In concluzie, acest studiu demonstreaza ca metoda analitica aplicata este sensibila, selectiva si rapida pentru determinarea metronidazolului, oxitetracilinei si furazolidonei din produsul Enteroguard M – pulbere.

**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. Yunqi Wu, Reza Fassihi (2005). Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination

3. Katarzyna Pietruszka, Malgorzata Olejnik, And Bartosz Sell (2007). Development and validation of liquid chromatography method for the determination of nitrofurans in water.
4. 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.
5. European Pharmacopoeia 7.0 (2011), 2651-2653.
6. [www.ich.org](http://www.ich.org)