

## Desarrollo analítico para la determinación de metronidazol en óvulos Develop an analytical method for metronidazole determination in ovules

M. Hurtado-y-de-la-Peña <sup>a</sup>, J. Hernández-Osornio <sup>a</sup>, R. Medina-López <sup>a</sup>, G. Alarcón-Angeles <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Farmacocinética y Farmacodinamia, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco 04960, Ciudad de México.

### Resumen

Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación cuantitativa de metronidazol en óvulos vaginales. El tratamiento de la muestra es relativamente sencillo, rápido y permite el recobro del API en un rango del 97.8 a 99.8 % con un coeficiente de variación máximo de 3.8 % entre unidades individuales con una n=10. El sistema cromatográfico es en fase reversa con una columna C8 y una fase móvil de: ácido acético 1 %, 0.2 % octensulfonato de sodio:acetonitrilo (50:50) utilizando benzoil-metronidazol como estándar interno. El método se aplicó en dos productos comerciales (referencia y genérico) con resultados semejantes.

*Palabras Clave:* metronidazol, óvulos, pre-tratamiento.

### Abstract

An analytical method for metronidazole in vaginal ovules was developed. A simple and rapid sample treatment yielded high API (Active Pharmaceutical Ingredient) recoveries (97.8% to 99.8%), with a maximum relative standard deviation of 3.8%. The samples were clear and suitable for chromatographic injection. The system employed a reverse-phase column (C8) with a mobile phase consisting of 1% acetic acid, 0.2% octanesulfonate sodium, and acetonitrile in a 50:50 ratio. Benzoic metronidazole was used as the internal standard. The method was successfully applied to analyze two commercial products, including a reference product and a generic product.

*Keywords:* metronidazole, ovules, pre-treatment.

## 1. Introducción

El metronidazol (5-nitroimidazol) es un fármaco cuyo uso en el tratamiento de infecciones anaerobias bacterianas y parasitarias se ha mantenido en uso por varias décadas. Especialmente útil en el tratamiento de la tricomoniasis vaginal en su presentación de óvulos, dado su mecanismo de acción, el cuál se da mediante la activación del metronidazol a través de la reducción del grupo nitro en bajas concentraciones de oxígeno.

El epitelio vaginal tiene la característica de mantener bajas concentraciones de oxígeno lo que puede favorecer la formación del componente activo del metronidazol (Leitsch, D., 2019). La formulación de óvulos vaginales comparte con los supositorios las características, de formas farmacéuticas semisólidas sobre bases, que requieren la liberación completa del principio activo localmente, para su absorción o para ejercer un efecto en el sitio de aplicación.

La exitosa liberación del principio activo depende en gran medida de la selección adecuada de la base y su compatibilidad con el principio activo, actualmente existen alternativas de tipo hidrofóbicas e hidrofílicas, sus mecanismos se han clasificado en términos generales en:

- Supositorios de base oleosa, que funden a la temperatura corporal.
- Supositorios con base hecha de una mezcla de gelatina-glicerol que se disuelven en agua y liberan el principio activo.
- Bases para supositorios de polímeros o surfactantes miscibles con agua.
- Un grupo de bases que contienen agentes desintegrantes o agentes efervescentes para favorecer la liberación.

Independientemente de la base seleccionada, ésta debe cumplir con requisitos de estabilidad, inocuidad, características adecuadas de compresión y expansión para la

\*Autor para la correspondencia: mhurtado@correo.xoc.uam.mx

Correo electrónico: mhurtado@correo.xoc.uam.mx (Marcela Hurtado-Y-de-la-Peña), jjhosornio20@gmail.com (Jovany Hernández-Osornio), rmlopez@correo.xoc.uam.mx (Raúl Medina-López), galarcon@correo.xoc.uam.mx (Georgina Alarcón-Ángeles).

producción y lograr emulsificar el principio activo y liberarlo en la aplicación (Melnyk, *et al.*, 2020, Srividya, *et al.*, 2022).

Por otro lado, la determinación analítica debe buscar la no interferencia de los componentes de la fórmula en la cuantificación del principio activo.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos décimo tercera edición, contempla un método para la cuantificación de metronidazol en óvulos mediante una titulación en medio no acuoso con ácido perclórico después de fundir y disolver en ácido acético glacial con determinación de punto final potenciométricamente (FEUM 13).

Los óvulos son mezclas heterogéneas y como tales se podría recomendar como método alternativo al análisis al oficial, la separación del principio activo de los excipientes. Es necesario para ese objetivo, tomar en consideración las bases para supositorios más frecuentemente utilizadas tratando de que el método pueda ser útil en más de un producto comercial. (Srividya, *et al.*, 2022). Así mismo es indispensable tomar en cuenta las características del metronidazol.

El metronidazol es un compuesto con débil carácter básico con un pKa de 2.38 y poca afinidad por fases orgánicas, log P de -0.02. El compuesto presenta poca retención en sistemas cromatográficos de fase reversa, existen métodos reportados en este sistema que coinciden en proponer un pH ácido y una fase móvil con alta proporción de fase acuosa (Tavakoli ., *et al.*, 2007, Vosough., *et al.*, 2013, Matmour, *et al.*, 2023). En este trabajo se propone un método para la separación del principio activo de los excipientes y un sistema cromatográfico adecuado para su análisis, utilizando como estándar interno el benzoil metronidazol.

El objetivo del trabajo fue desarrollar un método analítico relativamente sencillo, que permitiera hacer la cuantificación del metronidazol con precisión y exactitud en dos productos comerciales distintos de óvulos de metronidazol cuya base utilizada tuviera características diferentes, a fin de demostrar la flexibilidad del método.

## 2. Material y Método

### 2.1.1. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo cromatográfico marca Knauer Smartline con un detector arreglo de diodos modelo A5251, bomba isocrática 100 y auto muestreador modelo 3950.

Como fase móvil a un flujo de 1 ml por minuto, una mezcla 50:50 de acetonitrilo: solución acuosa de ácido acético 1% y 0.2% de octen sulfonato de sodio. Una columna: C8 Alltech spherisorb waters 4.6x250 mm de 5 micrómetros de tamaño de partícula utilizando benzoil-metronidazol como estándar interno. La longitud de onda para la detección fue 278 nm. Se utilizó acetonitrilo grado HPLC marca J.T. Baker, agua grado HPLC obtenida del sistema Simplicity 185 Millipore, el octensulfonato de sodio grado HPLC marca Regis technologies. El ácido acético glacial, cloruro de sodio y metanol grado reactivo marca J.T. Baker. Estándar de referencia de metronidazol y benzoil-metronidazol marca Sigma. Se utilizaron filtros de jeringa de nylon de 25 mm de diámetro y 0.45 micrómetros de poro.

### 2.1.2. Tratamiento de la muestra

Colocar individualmente cada óvulo en 100 ml de mezcla 60:40 de metanol: solución acuosa 1 % v/v para ácido acético 10% p/v para cloruro de sodio. Posteriormente, colocar en baño María a 37°C, para fundir los óvulos. Posteriormente, colocar en baño de ultrasonido 10 minutos. Al enfriarse la mezcla los óvulos de tipo base grasa forman una capa sólida en la superficie que fácilmente se retira de la mezcla.

Los óvulos de gelatina se comportan de forma diferente, forma una suspensión. En cualquiera de los dos casos la mezcla se afora a 200 ml con la mezcla 60:40 de metanol: solución acuosa 1 % para ácido acético 10% para cloruro de sodio y se filtra utilizando filtros de jeringa de 0.45 micrómetros.

Una alícuota de 200 microlitros del filtrado más una alícuota de 1 ml de solución de estándar interno de una concentración de 0.5 mg/ml se aforan 10 ml con fase móvil. La solución anterior se inyecta al cromatógrafo en las condiciones mencionadas.

El tratamiento del óvulo, aplica el principio de efecto salino, al utilizar una concentración al 10% de cloruro de sodio en la mezcla de preparación disminuye la solubilidad de una base oleosa, la cual se separa de la solución facilitando la obtención de una muestra limpia para la inyección cromatográfica (Matmour D., *et al.*, 2020).

En las condiciones cromatográficas seleccionadas, se buscaba una mayor retención del metronidazol en un sistema de fase reversa, la concentración de 0.2 % de octensulfonato de sodio, en la fase móvil se utiliza como reactivo par iónico para compuestos con carácter básico permitiendo aumentar la retención del metronidazol (Andraws G. and Trefi S., 2020).

### 2.1.3. Validación, Curvas de calibración

El intervalo de concentraciones para la validación del sistema cromatográfico fue de 25 a 100 microgramos/ml con tres réplicas por concentración, evaluando la precisión, linealidad del sistema y la reproducibilidad del factor respuesta.

### 2.1.4. Precisión del método

Se evaluaron 6 unidades individuales de óvulos de producto referencia en el día uno y 6 unidades individuales en el segundo día determinando la desviación estándar relativa (RSD) para las muestras dentro de cada día y entre días. Con un producto genérico se evaluaron cinco unidades individuales en el día uno y cinco unidades individuales el segundo día determinado la desviación estándar relativa en cada caso.

### 2.1.5. Linealidad y exactitud del método

Se hicieron determinaciones por duplicado considerando pesos de óvulos equivalentes a contenidos desde el 90 % al 115 % del contenido de metronidazol con el producto referencia, evaluando los recobros del principio activo. Calculando con los resultados la relación entre cantidad añadida contra cantidad recuperada, así como las desviaciones del contenido determinado contra el esperado.

Los parámetros de validación utilizados y los criterios para su aceptación, se basan en los requerimientos farmacopéicos de validación y los criterios de aceptación en el análisis de unidades individuales (FEUM 13 Edición).

### 3. Resultados y Discusión

La Figura 1 presenta el cromatograma típico del método aplicado a óvulos de metronidazol, con picos para metronidazol (3.4 min) y benzoilmetronidazol (6.8 min) con una resolución adecuada, simetría de picos cercana a 1 y un tiempo de corrida de 8 minutos.

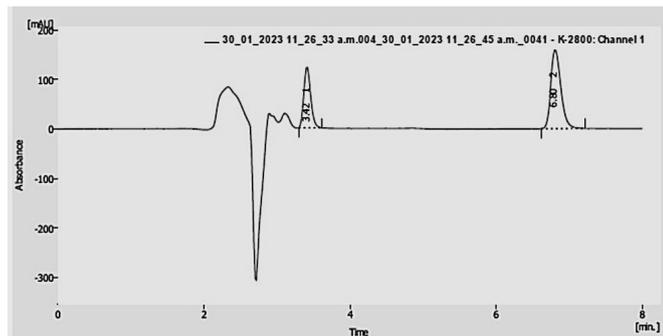


Figura 1: Cromatograma típico en el análisis de óvulos de metronidazol con el método propuesto.

#### 3.1.1. Linealidad y precisión del sistema

Los resultados en la evaluación del sistema se resumen en la Figura 2, representación promedio de tres curvas de calibración, con un coeficiente de correlación de 0.999 y una desviación estándar relativa para el factor respuesta de 1.3 %.

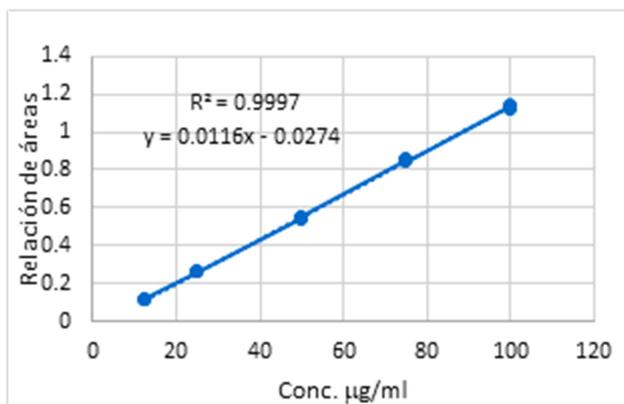


Figura 2: Linealidad del Sistema.

#### 3.1.2. Precisión del método:

La precisión obtenida para producto referencia (Tabla 1) y para un producto genérico (Tabla 2) fueron 3.05 and 3.7 % respectivamente. como valores máximos para la RSD en porcentaje. La precisión intermedia evaluada de acuerdo con la RSD en porcentaje fue para el producto de referencia 2.7% y para el producto genérico 3.8 %. En ambos casos, el contenido de los óvulos fue analizados individualmente y su contenido para metronidazol se encuentra dentro de los

límites de aceptación (92.5 -107.5%) con %RSD menor al 6%, (Magiera, S., et al, 2016).

% de Metronidazol recuperado	
Día 1	Día 2
100.4	106.8
100.5	105.3
100.7	101.0
103.9	106.9
106.6	105.1
106.8	102.6
Prom= 103.15	104.62
%RSD = 3.05	2.36

Tabla 1: Precisión del método (producto referencia).

% de Metronidazol recuperado	
Día 1	Día 2
100.4	100.1
102.4	106.5
106.2	100.0
107.1	97.7
106.1	97.5
Prom,= 104.44	100.36
%RSD = 2.89	3.65

Tabla 2: Precisión del método (producto genérico).

#### 3.1.3. Linealidad del método

El recobro en in intervalo de contenido de 90 a 115 % de metronidazol (por duplicado), presenta un coeficiente de correlación de 0.995 para la relación añadido vs encontrado, Figura 3.

Las desviaciones en por ciento entre lo esperado y lo determinado van de 0.7 a 3.5 %. El intervalo de confianza estimado para la exactitud es de: 97.8 a 99.8 % demuestra que el método tiene parámetros de linealidad y exactitud aceptables.

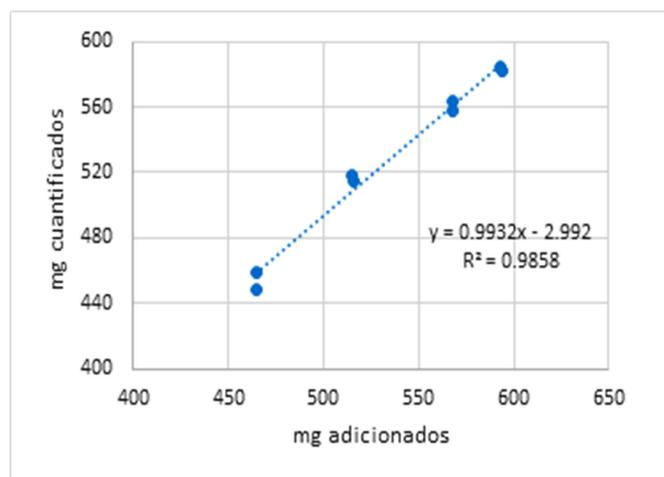


Figura 3: Linealidad del método.

aceptables. Es una alternativa viable y aplicable en óvulos con una base grasa como para óvulos de gelatina.

## Referencias

- Andraws, G., Trefi, S.,(2020). Ionisable substances chromatography: A new approach for the determination of Ketoprofen, Etoricoxib, and Diclofenac sodium in pharmaceuticals using ion – pair HPLC. *Heliyon*, 6, e04613. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04613>.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM 13 Edición, MGA 0991).
- Leitsch, D., (2019). A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology*, 146, 1167-78. DOI: 10.1017/S0031182017002025
- Magiera, S., Kolanowska, A., Baranowski, J.,(2016). Salting-out assisted extraction method coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of selected blockers and their metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 1022, 93–101. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122351
- Matmour, D., Hamoum, N., Eddine Hassam, K.,F., Meradb, Y. , Hamdi Ziani, N.(2023).Analysis of Seven Drug Related Impurities in Six Samples of Metronidazole API by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 3, 100048. DOI: 10.1016/j.jtemin.2023.100048
- Melnyk, G., Yarrykh, T., Herasymov, I.,(2020). Analytical Review of the Modern Range of Suppository Bases. *Systematic Reviews in Pharmacy* 11,503-8. DOI:10.31838/srp.2020.4.76
- Srividya, G., Jainaf-Nachiya, R.A..M., Ebrahim, D., El-Sagheer, A., M., Kayarohanam, S., Kumar-Janakiraman, A., Khan J., Mohamed M.M., (2022). Comparative study of semi-solid bases of naproxen: pharmaceutical technology aspects. *International Journal of Applied Pharmaceutics. Thematic special issue*, 132-37. DOI:10.22159/ijap.2022.v14ti.38
- Tavakoli ,N., Varshosaz, J., Dorkoosh, F., Mohammad, R., Zargarzadeh, (2007). Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. *Journal Chromatography and biomedical analysis* 43, 325-27. Doi:10.1016/j.jpba.2006.06.002
- Vosough, M., Mashhadiabbas H., Fast E., (2013). HPLC-DAD quantification procedure for selected sulfonamids, metronidazole and chloramphenicol in wastewaters using second-order calibration based on MCR-ALS. *Talanta* 113: 68-7. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.03.049

mg adicionados	mg cuantificados	% de recobro	% desviación
464.75	448.35	96.47	3.53
464.52	459.06	98.82	1.18
514.60	518.54	100.77	-0.77
515.72	514.62	99.79	0.21
567.64	563.15	99.21	0.79
567.55	558.26	98.36	1.64
593.42	581.72	98.03	1.97
593.20	584.83	98.59	1.41
		Prom=98.75 %	
		%RSD=1.27 %	
		IC=97.7-99.8	

Tabla 3: Exactitud del método.

## 4. Conclusiones

El método desarrollado para el análisis cromatográfico de metronidazol en óvulos cumple con criterios de linealidad, precisión y exactitud. Con un tratamiento relativamente sencillo de la forma farmacéutica, se obtienen recobros cuantitativos del principio activo y muestras finales limpias para su inyección cromatográfica, con características