

Marzena Podolska, Anna Kulik, Wanda Białecka, Barbara Kwiatkowska-Puchniarz,
Aleksander Mazurek

Chromatograficzna metoda HPLC identyfikacji oraz oznaczania ilościowego substancji czynnych w wieloskładnikowym produkcie leczniczym

Chromatographic Method HPLC for the Identification and Quantification of the Active Substances in a Multicomponent Drug Product

Z Zakładu Farmacji Podstawowej i Stosowanej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie

STRESZCZENIE

Celem pracy było opracowanie metody HPLC umożliwiającej identyfikację i oznaczenie zawartości metronidazolu i chlorochinaldolu w produkcie leczniczym Gynalgin – tabletki dopochwowe. Zadawalające wyniki uzyskano w dwóch układach gradientowych. W pierwszej metodzie wykorzystano kolumnę difenylową o długości 250 cm oraz fazy: A zawierającą 0,5 ml 85% H_3PO_4 w 1000 ml wody dejonizowanej i B zawierającą THF/ACN/ H_2O w stosunku 4:5:1. W drugiej metodzie wykorzystano kolumnę C_4 o długości 150 cm oraz fazy: A zawierającą 0,5 ml 85% H_3PO_4 w 1000 ml wody dejonizowanej doprowadzoną do pH 6,0 za pomocą 10% NaOH i B zawierającą ACN/ H_2O w stosunku 9:1. W obu przypadkach zastosowano przepływ fazy 1,5 ml/min oraz detekcję przy długości fali $\lambda = 220$ nm i $\lambda = 315$ nm. Przeprowadzona walidacja potwierdziła dobrą selektywność, precyzję i dokładność metod. Uzyskane powyżej 0,999 współczynniki korelacji wskazały na liniowy przebieg krzywych kalibracji dla substancji czynnych. Oba układy mogą mieć zastosowanie w rutynowej analizie produktu leczniczego.

Słowa kluczowe: metronidazol, chlorochinaldol, Gynalgin, metoda HPLC

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a HPLC method which allows the identification and determination of the content of metronidazole and chloroquinaldol in a drug product Gynalgin - vaginal tablets. Satisfactory results were obtained in two gradient systems. In the first method 250 cm diphenyl column and mobile phases were used (A, containing 0.5 ml of 85% H_3PO_4 in 1000 ml of deionized water, and B, containing THF/ACN/ H_2O in ratio of 4:5:1). In the second method the researchers used C_4 column of the length of 150 cm and the phases: A, containing 0.5 ml of 85% H_3PO_4 in 1000 ml of deionized water which was brought to pH 6.0 with 10% NaOH, and B, containing ACN/ H_2O in ratio of 9:1. In both cases, phase flow of 1.5 ml / min and detection at a wavelength $\lambda = 220$ nm and $\lambda = 315$ nm were used. Conducted validation confirmed good selectivity, precision and accuracy of the methods. The correlation coefficients above 0.999 indicate a linear calibration curves for the active substances. Both systems can be applied in routine analysis of the drug product.

Key words: metronidazole, chloroquinaldol, Gynalgin, the HPLC method

Wytwórcy wprowadzają na rynek coraz więcej produktów leczniczych zawierających kilka substancji czynnych. Pozwalają one na skuteczniejszą terapię, gdyż znacznie

Companies bring to market more and more products containing several active substances. They allow for more effective treatment as they significantly extend

rozszerzają spektrum działania. Wiele z tych substancji ma ugruntowane zastosowanie medyczne i jest opisanych w farmakopeach. Do tego rodzaju leków należy Gynalgin – tabletki dopochwowe, zawierający chlorochinaldol i metronidazol. Produkt jest stosowany miejscowo w leczeniu stanów zapalnych pochwy spowodowanych jednoczesnym występowaniem bakterii, rzęśistka pochwowego oraz grzybów. Wyżej wymienione substancje czynne zostały opisane w farmakopeach: chlorochinaldol w Farmakopei Polskiej VI, a metronidazol w Farmakopei Europejskiej, Farmakopei Polskiej VII i VIII. Produkty lecznicze z metronidazolem, takie jak żel, płyn do infuzji, zawiesina doustna, czopki i tabletki przedstawiono w BP, natomiast tabletki dopochwowe z chlorochinaldolem w Farmakopei Polskiej VI. Metoda HPLC opisywana jest tylko w monografii metronidazolu, do oznaczania czystości. Zawartość w tabletkach z metronidazolem przeprowadza się metodą miareczkową. Z kolei monografia chlorochinaldolu przewiduje do badania zawartości metodę spektrofotometryczną, a do czystości metodę TLC.

Celem poniższej pracy było opracowanie metody HPLC pozwalającej na oznaczenie w jednym układzie zawartości metronidazolu i chlorochinaldolu, w tabletkach dopochwowych Gynalgin.

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono tylko jedną pracę opisującą oznaczanie chlorochinaldolu – metodą spektrofotometryczną [1]. Pozostałe publikacje dotyczą metronidazolu badanego zarówno w materiale biologicznym jak i w produktach leczniczych. W produktach leczniczych związek ten oznaczano metodami: spektrofotometryczną [2–7], elektrochemiczną i woltamperometryczną [8–9], HPLC [10–17], chemiluminescencyjną [18], chromatografii fluidalnej [19], HPTLC [20], termogravimetryczną [21]. Część prac opisuje oznaczanie metronidazolu obok innych substancji czynnych, takich jak: klotrimazol [10,12], tinidazol [3], ciprofloksacyna [4], octan chloroheksydyny [12], witamina B6 [5], kwas nalidyksowy [6,20], pochodnych 5-imidazolu [16]. W ostatnich latach najwięcej publikacji dotyczy oznaczenia metronidazolu w materiale biologicznym metodami HPLC [22–23], HPLC-MS [24–26] i GC-MS [27].

Material i metody

Preparat: GYNALGIN – tabletki dopochwowe o składzie chlorochinaldol 100 mg + metronidazol 250 mg, wytwórca ICN Polfa Rzeszów S.A.

Substancje wzorcowe: chlorochinaldol, (ICN Polfa Rzeszów), 2-aminofenol (ICN Polfa Rzeszów), metronidazol (Ph.Eur.), 2- metylo-5- nitroimidazol (Ph.Eur)

Odczynniki i aparatura

Odczynniki wysokiej czystości do HPLC, chromatograf cieczowy sterowany komputerowo firmy Shimadzu z detektorami UV-VIS SPD-10AVP oraz SPD-M10AVP,

the spectrum of action. Many of these substances have well-established medical use and they are described in pharmacopoeias. An example of this type of medication is Gynalgin - vaginal tablets containing chloroquinaldol and metronidazole. The product is applied topically to treat inflammation of the vagina caused by the simultaneous occurrence of bacteria, *Trichomonas vaginalis* and fungi. The above-mentioned active substances are described in pharmacopoeias: chloroquinaldol in the Polish Pharmacopoeia VI, and metronidazole in the European Pharmacopoeia, Polish Pharmacopoeia VII and VIII. Drug products with metronidazole such as gel, fluid infusion, oral suspension, suppositories and tablets are presented in BP, while the vaginal tablets with chloroquinaldol in Polish Pharmacopoeia VI. The HPLC method is described only in the monograph of metronidazole, as for the determination of purity. The content of tablets with metronidazole is conducted by the titration method. Whereas the monograph of chloroquinaldol provides the spectrophotometric method for the study of the content, and for the purity the TLC method.

The aim of this study was to develop a HPLC method for the determination of content of metronidazole and chloroquinaldol in a single system in vaginal tablets Gynalgin.

In available literature it was possible to find only one paper describing the determination of chloroquinaldol by means of spectrophotometric method [1]. Other publications consider metronidazole tested both in the biological material as well as drug products. This compound was determined in drug products by means of following methods: spectrophotometric [2–7], electrochemical and voltamperometric [8–9], HPLC [10–17], chemiluminescence [18], fluid chromatography [19], HPTLC [20] and thermogravimetric [21]. Some of the studies describe the determination of metronidazole in addition to other active substances such as clotrimazole [10,12], tinidazole [3], ciprofloxacin [4], chlorhexidine acetate [12], vitamin B6 [5], nalidixic acid [6,20], and derivatives 5-imidazole [16]. In recent years, most publications have concerned the determination of metronidazole in biological material by HPLC [22–23], HPLC-MS [24–26] and GC-MS [27] methods.

Materials and methods

Material for research

Preparation: GYNALGIN-vaginal tablets containing chloroquinaldol 100 mg + metronidazole 250 mg, producer ICN Polfa SA Rzeszów

Standard Substances: chloroquinaldol, (ICN Polfa Rzeszów), 2-aminophenol (ICN Polfa Rzeszów), metronidazole (Ph. Eur.), 2 - methyl-5-nitroimidazole (Ph.Eur)

Reagents and apparatus

Reagents of high purity for HPLC, computer-controlled liquid chromatograph produced by Shimadzu company

z pompami LC-10ATVP i degazerem DGU-14A, kontrolerem SCL-10AVP, autosamplerem SIL-10ADVP.

Opracowanie metody HPLC

W początkowym etapie badań poszukiwano optymalnego układu HPLC, który umożliwiłby identyfikację i zapewnił dobre rozdzielenie metronidazolu oraz chlorochinaldolu.

Sprawdzono możliwość zastosowania metody HPLC opisanej w monografii metronidazolu w Ph.Eur., w której analizę przeprowadza się na kolumnie C18 w układzie izokratycznym. Jednak z powodu zbyt dużych różnic w czasach retencji metronidazolu i chlorochinaldolu metoda ta nie mogłaby mieć praktycznego zastosowania. Wprowadzenie elucji gradientowej także nie dało zadowalających wyników. Długi czas retencji chlorochinaldolu jest spowodowany dużym powinowactwem substancji do fazy stacjonarnej, co uniemożliwia zastosowanie wypełnienia C18. Z tego powodu zaistniała konieczność użycia kolumn z wypełnieniem o innym charakterze chemicznym. Sprawdzono wiele faz o różnej polarności – od wypełnień difenylowych, poprzez alkilowe C8, C6, C4 do cyjanowych. Na żadnej z wymienionych faz stacjonarnych nie udało się zastosować elucji izokratycznej umożliwiającej uzyskanie optymalnego rozdziału badanych substancji w stosunkowo krótkim czasie analizy. W związku z tym zbadano kilka wariantów gradientu na kolumnach o ww. wypełnieniach.

Po wykreśleniu widm badanych substancji w roztworach metanolowych wyznaczono długości fali do oznaczeń, tj. $\lambda = 220\text{nm}$ i $\lambda = 315\text{nm}$.

Ostatecznie wybrano dwa układy HPLC:

1. Układ chromatograficzny z zastosowaniem kolumny difenylowej

kolumna: Supelcosil LC-DP 250 x 4,6 mm, 5 μm

przepływ fazy: 1,5 ml/min.

detekcja: $\lambda = 220\text{nm}$ i $\lambda = 315\text{nm}$

temperatura kolumny 40°C

faza A: 0,5 ml H_3PO_4 w 1000ml H_2O

faza B: THF:ACN: H_2O (4:5:1)

Profil gradientu

czas (min)	A %	B%
0–4	80	20
4–10	15	85
10–15	15	85
15–17	80	20
17–20	80	20

Przykładowy chromatogram przedstawiono na rys. 1

2. Układ chromatograficzny z zastosowaniem kolumny C4

kolumna: YMC-Pack C4; 150x 4,6 mm, 3 μm

przepływ fazy : 1,5 ml/min.

detekcja : $\lambda = 220\text{nm}$ i $\lambda = 315\text{nm}$

temperatura kolumny 40°C

faza A : 0,5 ml 85% H_3PO_4 w 1000ml H_2O doprowadzona do pH 6,0 za pomocą 10% NaOH

with following detectors UV-VIS SPD-10AVP and SPD-M10AVP, with LC-10ATVP pumps and a degasser DGU-14A, a controller SCL-10AVP, an autosampler SIL-10ADVP.

Development of HPLC method

During the initial stage of the study the researchers were searching optimal HPLC system, which enables to identify and assure good separation of metronidazole and chloroquinaldol.

They examined the possibility of using the HPLC method described in the monograph of metronidazole in Ph.Eur., where the analysis is carried out on a C18 column in isocratic configuration. However, due to too large differences in retention times of metronidazole and chloroquinaldol, this method could not have practical application. The introduction of gradient elution also did not provide satisfactory results. Long retention time of chloroquinaldol is caused by high affinity of substance to stationary phase, which prevents the use of C18 filler. For this reason it was necessary to use columns with a filler of different chemical nature. They examined many phases of different polarity - from diphenyl fillers through alkyl C8, C6, C4 to **cyanic** ones. Any of these stationary phases could not be used for isocratic elution allowing optimal separation of the tested substances in a relatively short time of analysis. Therefore, the researchers examined several variants of the gradient on the columns of the above mentioned fillers.

After drawing the spectra of the examined substances in methanol solutions the researchers determined the wavelength for determination i.e. $\lambda = 220\text{nm}$, and $\lambda = 315\text{nm}$.

Finally the two sets of HPLC were chosen:

1. Chromatographic system using diphenyl column

column: Supelcosil LC-DP 250 x 4.6 mm, 5 μm

phase flow: 1.5 ml / min.

detection: $\lambda = 220\text{nm}$ and $\lambda = 315\text{nm}$

column temperature 40°C

phase A: 0.5 ml of H_3PO_4 in 1000ml H_2O

phase B: THF:ACN: H_2O (4:5:1)

Gradient profile

time (min)	A %	B%
0-4	80	20
4-10	15	85
10-15	15	85
15-17	80	20
17-20	80	20

A sample chromatogram is shown in Figure

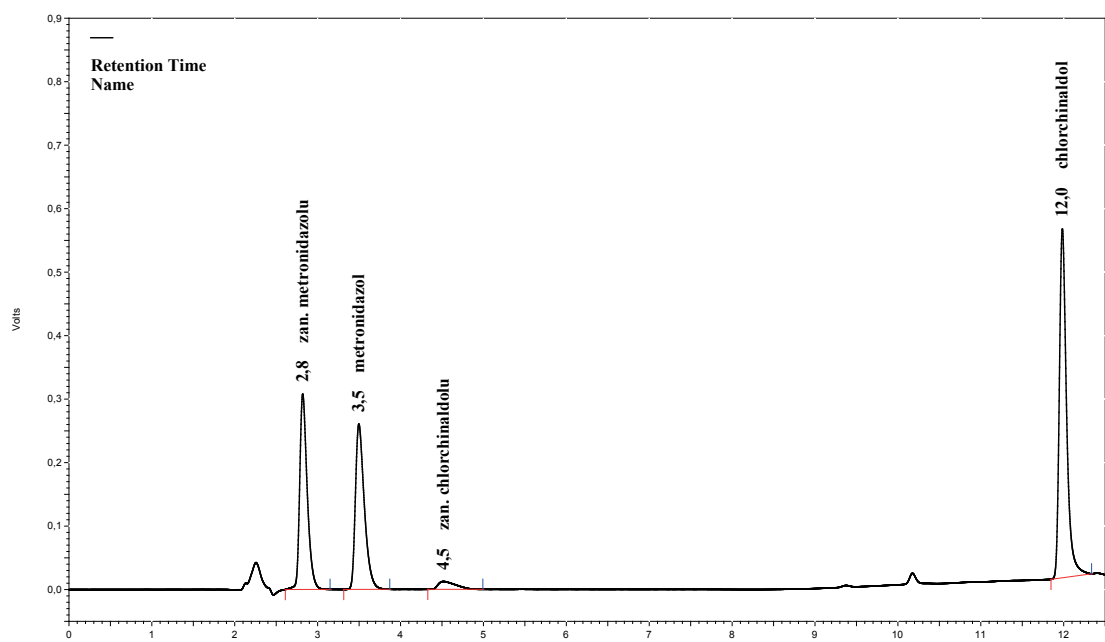
- 2 / Chromatographic system using a C4 column

column: YMC-Pack C4, 150x 4.6 mm, 3 μm phaseflow: 1.5 ml / min.

detection: $\lambda = 220\text{nm}$ and $\lambda = 315\text{nm}$

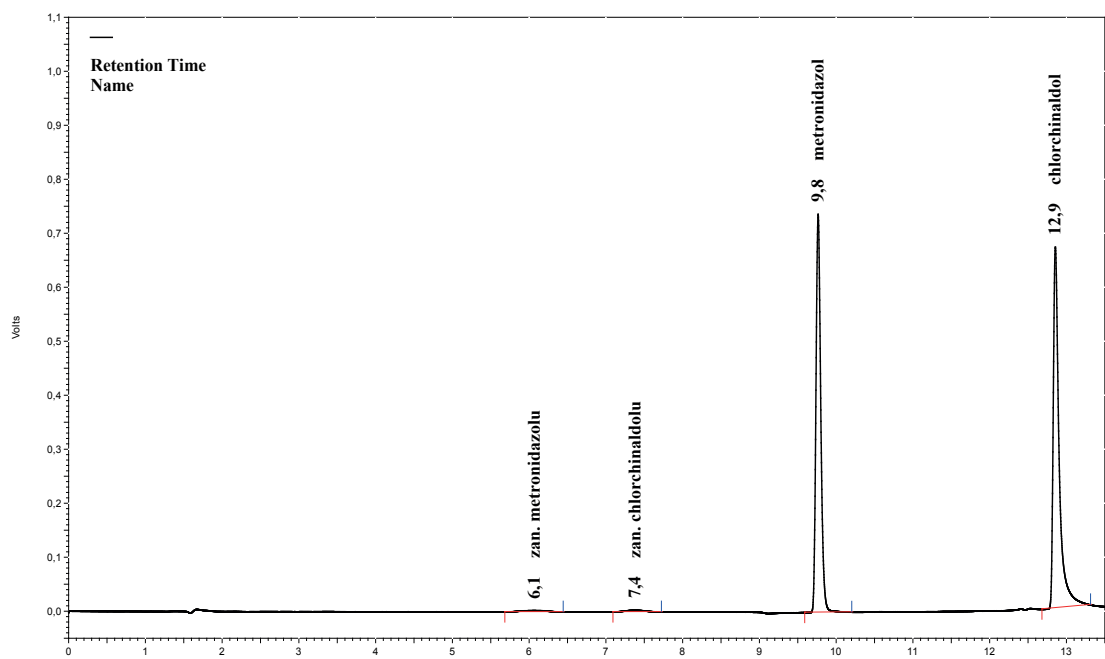
column temperature of 40°C

phase A: 0.5 ml of 85% H_3PO_4 in 1000 ml H_2O which was brought to pH 6.0 with 10% NaOH



Rys. 1. Chromatogram substancji czynnych i zanieczyszczeń, $\lambda=315$ nm, kolumna DP.
Czasy retencji: 2,8 min – 2-metylo-5-nitroimidazol (zan. metronidazolu), 3,5 min – metronidazol, 4,5 min – 2-aminofenol (zan. chlorochinaldolu), 12,0 min – chlorochinaldol

Fig. 1. Chromatogram of a mixture of active substances and impurities, $\lambda=315$ nm, column DP.
Retention times: 2,8 min – 2-methyl-5-nitroimidazole (imp. of metronidazole), 3,5 min – metronidazole, 4,5 min – 2-aminophenol (imp. of chlorquinaldol), 12,0 min – chlorquinaldol



Rys. 2. Chromatogram substancji czynnych i zanieczyszczeń, $\lambda=315$ nm, kolumna C4.
Czasy retencji: 6,1 min – 2-metylo-5-nitroimidazol (zan. metronidazolu), 7,4 min – 2-aminofenol (zan. chlorochinaldolu), 9,8 min – metronidazol 12,9 min – chlorochinaldol

Fig. 2. Chromatogram of a mixture of active substances and impurities, $\lambda=315$ nm, column C4.
Retention times: 6,1 min – 2-methyl-5-nitroimidazole (imp. of metronidazole), 7,4 min – 2-aminophenol (imp. of chlorquinaldol), 9,8 min – metronidazole 12,9 min – chlorquinaldol

faza B: ACN: H₂O (9:1)

Profil gradientu

czas (min)	A %	B%
0–5	100	0
5–10	10	90
10–15	10	90
15–17	100	0
17–20	100	0

Przykładowy chromatogram przedstawiono na rys. 2.

Oba opracowane układy HPLC w gradiencie z użyciem kolumny C4 i DP wykorzystano do oznaczania metronidazolu oraz chlorochinaldolu w produkcie leczniczym GYNALGIN – tabletki dopochwowe. Opierając się na danych farmakopealnych, do izolacji substancji czynnych z produktu leczniczego użyto metanolu.

Wyniki

1. Walidacja opracowanych metod HPLC

Specyficzność

Przeprowadzono badania stresowe celem potwierdzenia danych literaturowych podających, że metronidazol i chlorochinaldol ulegają degradacji w środowisku alkalicznym. Zarejestrowano chromatogramy rozpuszczalnika, roztworu uzyskanego z rozpuszczenia placebo, badanych substancji czynnych oraz głównych produktów rozkładu: metronidazolu (2-metylo-5-nitroimidazolu), chlorochinaldolu (2-aminofenolu). W obu opracowanych układach HPLC uzyskano satysfakcjonujący rozdział badanych substancji czynnych oraz zanieczyszczeń i nie stwierdzono interferencji pików pochodzących od rozpuszczalnika i roztworu placebo. Przykładowe chromatogramy przedstawiono na rys. 1 i 2.

Liniowość

Sporządzono metanolowe roztwory wzorców substancji czynnych. Wprowadzono je do kolumny, zarejestrowano chromatogramy i wyznaczono krzywe. W obu opracowanych układach HPLC potwierdzono liniowe zależności sygnału dla metronidazolu i chlorochinaldolu w szerokim zakresie stężeń.

Parametry krzywych kalibracyjnych zebrano w tabeli 1.

Precyzja układów

Do kolumny chromatograficznej C4 i DP sześciokrotnie wprowadzono roztwory wzorcowe badanych substancji. Sporządzono chromatogramy. Uzyskane wartości RSD < 2% dla powierzchni pików metronidazolu i chlorochinaldolu w opisanych wcześniej warunkach chromatograficznych potwierdziły precyzję obu opracowanych układów HPLC.

Precyzja i precyzja pośrednia

Precyzję pośrednią metod HPLC badania zawartości substancji czynnych w preparacie oceniono na podstawie wyników sześciu niezależnych prób. Badania przeprowadził inny analityk, zgodnie z opisaną wcześniej procedurą

phase B: ACN: H₂O (9:1)

Gradient profile

time (min)	A %	B%
0-5	100	0
5-10	10	90
10-15	10	90
15-17	100	0
17-20	100	0

A sample chromatogram is shown in Figure

Both studied HPLC systems in the gradient using C4 and DP columns were used for determination of metronidazole and chloroquinidol in the drug product GYNALGIN - vaginal tablets. Taking into account the pharmacopeal data, methanol was used to isolate the active substances of the drug product.

Results

1. Validation of developed HPLC methods

Specificity

The researchers conducted stress studies to confirm the reference data indicating that metronidazole and chloroquinidol degrade in alkaline medium. Chromatograms of the solvent were registered, the solution obtained from dissolved placebo, the studied active substances and the main products of decomposition: metronidazole (2-methyl-5-nitroimidazole), chloroquinidol (2-aminophenol). In both developed HPLC systems a satisfactory separation of active substances and impurities was achieved and there were no peaks interference originating from the solvent and the placebo solution. Sample chromatograms are shown in Figure 1 and 2.

Linearity

Methanol solutions of models of active substances were prepared. They were provided into the columns, chromatograms were recorded and the researchers determined the curves. In both HPLC systems linear signal dependence has been confirmed for metronidazole and chlorochinaldol in a wide concentration range. Parameters of calibration curves are summarized in Table 1

Precision of systems

Standard solutions of active substances have been provided six times into the chromatographic column C4 and DP. Chromatograms were prepared. Values RSD < 2% obtained for the peak area of metronidazole and chlorochinaldol in the described earlier chromatographic conditions confirmed the precision of both developed HPLC systems.

Precision and intermediate precision

Intermediate precision of HPLC methods for the study of active substances in the preparation was assessed on the base of six independent trials. The research was conducted by another analyst in accordance with the procedure described earlier changing column ranks, HPLC apparatus and series of reagents. The results are

Tabela 1. Parametry krzywych kalibracji $y = ax + b$; $n = 8$
Table 1. Calibration curves' parameters $y = ax + b$; $n = 8$

	kolumna C4		kolumna DP	
	$\lambda = 220 \text{ nm}$	$\lambda = 315 \text{ nm}$	$\lambda = 220 \text{ nm}$	$\lambda = 315 \text{ nm}$
metronidazol	$a \pm \Delta a$; S_a	27708 ± 211 ; $S_a = 89$	74737 ± 775 ; $S_a = 317$	29626 ± 691 ; $S_a = 161$
	$b \pm \Delta b$; S_b	46040 ± 56211 ; $S_b = 23771 = 91 = 91 = 91$	39972 ± 43840 ; $S_b = 17916 = 91 = 91 = 91$	65254 ± 192785 ; $S_b = 44806 = 91 = 91 = 91$
	S_y	40280	40280	60866
	Y_{int} (%)	0,28%	0,18%	0,66%
	r^2	0,99992	0,99987	0,99991
	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	2,8	0,8	5,0
	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	8,6	2,4	15,1
	zakres	$3 \mu\text{g/ml} - 596 \mu\text{g/ml} * 0,016 \div 596$	$1 \mu\text{g/ml} - 300 \mu\text{g/ml} *$	$3 \mu\text{g/ml} - 509 \mu\text{g/ml}$
	stężenie w próbnie	125 $\mu\text{g/ml}$		
chlorochinaldol	$a \pm \Delta a$; S_a	88674 ± 1333 ; $S_a = 545$	21877 ± 223 ; $S_a = 91$	84249 ± 1105 ; $S_a = 499$
	$b \pm \Delta b$; S_b	-80009 ± 165261 ; $S_b = 67539 = 91 = 91 = 91$	-29075 ± 27636 ; $S_b = 11294 11294 = 91 = 91 = 91$	-37533 ± 60765 ; $S_b = 21886 = 91 = 91 = 91$
	S_y	152210	25453	35228
	Y_{int} (%)	0,33%	0,48%	0,28%
	r^2	0,99977	0,99990	0,99982
	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	2,5	1,7	0,8
	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	7,6	5,2	2,6
	zakres	$2 \mu\text{g/ml} - 277 \mu\text{g/ml}$		$2 \mu\text{g/ml} - 160 \mu\text{g/ml} *$
	stężenie w próbnie	$50 \mu\text{g/ml}$ $0,04 \div 277$ $0,041 \div 277$ $0,04 \div 277$		

* powyżej zależność nieliniowa

Tabela 2. Wyniki oznaczenia zawartości substancji czynnych w produkcie leczniczym Gynalgin – powtarzalność opracowanych metod HPLC
Table 2. Results of the active substances assay in Gynalgin – intermediate precision of the developed HPLC methods

	kolumna C4				kolumna DP			
	λ=220 nm		λ=315 nm		λ=220 nm		λ=315 nm	
	analiza 1	analiza 2	analiza 1	analiza 2	analiza 1	analiza 2	analiza 1	analiza 2
metronidazol zawartość 250 mg deklarowana	249,60	245,39	244,73	246,59	247,66	246,29	243,96	242,66
	249,79	241,91	248,11	244,60	244,23	247,57	245,87	243,86
	247,85	247,93	248,87	247,26	247,70	248,28	242,47	244,49
	246,53	247,88	248,87	252,39	242,49	247,43	240,58	246,65
	246,44	244,37	245,80	250,89	242,73	248,72	247,08	246,01
	244,46	250,45	245,46	251,85	240,81	244,81	240,81	244,80
	247,45	246,32	246,97	248,93	244,27	247,23	243,46	244,75
	2,16	3,18	1,94	3,37	3,00	1,50	2,79	1,52
	2,05	3,04	1,85	3,20	2,86	1,44	2,66	1,44
	4,21	9,24	3,43	10,27	8,15	2,08	7,09	2,08
chlorochinaldol zawartość 100 mg deklarowana	0,83	1,23	0,75	1,29	1,17	0,58	1,09	0,59
	2,19		2,99		3,91		3,40	
	0,75		1,29		2,26*		1,04	
	97,32	97,95	97,89	97,39	98,84	99,54	98,64	99,28
	97,57	95,77	97,50	96,46	99,63	100,15	99,49	99,95
	97,35	96,86	97,94	97,29	98,78	101,03	97,78	100,24
	97,78	98,63	98,06	96,87	100,77	102,96	99,44	98,95
	97,85	96,45	98,28	95,99	98,96	99,66	98,36	99,62
	99,75	97,54	95,35	96,79	98,24	99,36	99,99	99,91
	97,94	97,20	97,50	96,80	99,20	100,45	98,95	99,66
średnia zawartość (mg) przedział ufności (±)	0,96	1,09	1,12	0,55	0,93	1,43	0,87	0,50
	0,91	1,04	1,09	0,52	0,89	1,37	0,83	0,48
	0,83	1,09	1,17	0,27	0,79	1,87	0,68	0,23
	0,93	1,07	1,11	0,54	0,89	1,36	0,84	0,48
	1,30		4,31		2,38		3,02	
	1,30		1,43		1,87		1,81	

a – na poziomie istotności α=0,05 b – dla prób niepowiązanych

Tabela 3. Porównanie precyzji opracowanych metod HPLC

Table 3. Comparison of precision of the developed HPLC methods

		kolumna C4		kolumna DP	
		λ=220 nm	λ=315 nm	λ=220 nm	λ=315 nm
metronidazol deklarowana zawartość 250 mg	analiza 1	średnia zawartość (mg)		247,45 246,32	243,46 244,75
		przedział ufności (±)		2,16 3,18	2,79 1,52
		odchylenie standardowe s		2,05 3,04	2,66 1,44
		względne odchylenie standardowe RSD %		0,83 1,23	1,09 0,59
		wariancja s ²		4,21 9,24	7,09 2,08
		test F _{max} Hartleya (13,7) ^a		2,4	
	analiza 2	średnia zawartość (mg)		247,23	244,75
		przedział ufności (±)		1,50	1,52
		odchylenie standardowe s		1,44	1,44
		względne odchylenie standardowe RSD %		0,58	0,59
		wariancja s ²		2,08 (s ² _{min})	2,08
		test F _{max} Hartleya (13,7) ^a		4,9	
chlorochinaldol deklarowana zawartość 100 mg	analiza 1	średnia zawartość (mg)		99,20	98,95
		przedział ufności (±)		0,93	0,87
		odchylenie standardowe s		0,89	0,83
		względne odchylenie standardowe RSD %		0,89	0,84
		wariancja s ²		0,79	0,68(s ² _{min})
		test F _{max} Hartleya (13,7) ^a		1,3	
	analiza 2	średnia zawartość (mg)		100,45	99,66
		przedział ufności (±)		1,43	0,50
		odchylenie standardowe s		1,37	0,48
		względne odchylenie standardowe RSD %		1,36	0,48
		wariancja s ²		1,87 (s ² _{min})	0,23
		test F _{max} Hartleya (13,7) ^a		6,9	

a – na poziomie istotności α=0,05

zmieniając szarże kolumny, aparat HPLC oraz serię odczynników. Wyniki zebrano w tabeli 2 . Porównanie precyzji metod oceniono w tabeli 3.

Dokładność

Dokładność metod zbadano dodając znane ilości substancji wzorcowych do placebo, a następnie przeprowadzając analizę w obu układach HPLC zgodnie z opisaną wcześniej procedurą oznaczania zawartości. Wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Stabilność roztworów

Roztwory prób badanych i wzorców pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej i w lodówce, a następnie wprowadzono na stosowane kolumny chromatograficzne. Do oceny stabilności zastosowano względne odchylenie standardowe RSD liczone łącznie z nastrzyków świeżych roztworów i przechowywanych 24 h. Zanotowano pola powierzchni pików metronidazolu przy długości fali λ= 315 nm i chlorochinaldolu przy długości fali λ=220 nm. Wartości RSD nie przekroczyły kryterium akceptacji 2%,

summarized in Table 2. Comparison of precision of the methods is evaluated in Table No. 3.

Accuracy

The accuracy of the methods was examined by adding known amounts of reference substances to placebo, and then the analysis was performed in both HPLC systems in accordance with the previously described procedure determining the content. The results are shown in Table No. 4

Stability of solutions

The solutions of tested samples and standard solutions were left for 24 h at room temperature and in the refrigerator, and then they were provided to the used chromatographic columns. To assess the stability the researchers used the relative standard deviation RSD counted together with injections of fresh solution and stored for 24h. It has been reported surface of peak area of metronidazole at a wavelength λ = 315 nm and chlo-roquinaldol at a wavelength λ = 220 nm. RSD values did not exceed the acceptance criterion of 2%, so it was found

Tabela 4. Wyniki badania odzysku w produkcji
leczniczym Gynalgin – dokładność opracowanych
metod HPLC

Table 4. Recovery of the active substances in Gynalgin -
accuracy of the developed HPLC methods

	kolumna C4		kolumna DP	
	λ=220 nm	λ=315 nm	λ=220 nm	λ=315 nm
metronidazol	98,84	98,98	99,65	99,71
	99,43	98,99	99,44	99,27
	99,03	98,50	99,63	99,42
	98,91	99,33	99,66	99,43
	99,69	100,71	99,17	98,91
	99,23	99,24	100,32	99,91
średnia (%)	99,18	99,28	99,65	99,44
przedział ufności (±)	0,34	0,75	0,40	0,36
odchylenie standardowe s	0,33	0,71	0,38	0,35
wariancja s ²	0,11	0,51	0,14	0,12
względne odchylenie standardowe RSD %	0,33	0,72	0,38	0,35
test F Snedecora (5,05) ^a	4,77		1,20	
test t-Studenta (2,23) ^{a,b}	0,27		0,97	
chlorochinaldol	98,50	101,50	101,18	99,21
	100,47	102,70	99,83	100,29
	101,06	101,68	99,53	98,24
	100,37	100,44	98,61	98,22
	100,94	101,15	97,25	100,02
	100,83	100,77	99,88	100,38
średnia zawartość (mg)	100,36	101,37	99,38	99,39
przedział ufności (±)	1,00	0,83	1,40	1,04
odchylenie standardowe s	0,95	0,79	1,33	0,99
wariancja s ²	0,90	0,63	1,77	0,98
względne odchylenie standardowe RSD %	0,95	0,78	1,34	1,00
test F Snedecora (5,05) ^a	1,43		1,80	
test t-Studenta (2,23) ^{a,b}	2,00		0,02	

a – na poziomie istotności α=0,05
b – dla prób niepowiązanych

więc uznano, że roztwory wzorców i prób są stabilne przez 24 h przechowywania zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w lodówce.

Odporność

Na kolumnę C4 i DP wprowadzono metanolowe roztwory badanych substancji czynnych metronidazolu i chlorochinaldolu oraz ich zanieczyszczeń: 2-metylo-5-nitroimidazolu oraz 2-aminofenolu. Stwierdzono, że w układzie chromatograficznym z zastosowaniem kolumny C4 odczyn fazy A znacznie wpływa na retencję 2-aminofenolu (zanieczyszczenie chlorochinaldolu), co w konsekwencji wpływa na kolejność elucji badanych związków. W zakresie pH 2–4 pierwszy zostaje eluowany 2-aminofenol, przy pH około 5 następuje koelucja z 2-metylo-5-nitroimidazolem (zanieczyszczeniem metronidazolu). Rozdzielenie wszystkich składników uzyskano przy pH 5,8–6,6 , co potwierdza współczynnik rozdzielczości $R_s > 2$ między pikami 2-metylo-5-nitroimidazolu oraz 2-aminofenolu.

Badano odporność obu opracowanych metod HPLC, sprawdzając wpływ szybkości przepływu fazy ruchomej

that standard solutions and samples are stable for 24 hours storage both at room temperature and in the refrigerator.

Resistance

To C4 and DP columns were provided methanolic solutions of the tested active substances metronidazole and chloroquinaldol and their impurities: 2-methyl-5-nitroimidazole and 2-aminophenol. It was found that in the chromatographic system using a C4 column the phase A reaction greatly influences the retention of 2-aminophenol (the impurity of chloroquinaldol), which in consequence affects the elution order of the tested compounds. In range of pH 2 – 4, 2-aminophenol is eluted first, at a pH of about 5 coelution of 2-methyl-5-nitroimidazoles (the impurity of metronidazole) occurs. Separation of all components was achieved at a pH 5.8 - 6.6, which confirms the resolution factor $R_s > 2$ between the peaks of 2-methyl-5-nitroimidazole and 2-aminophenol.

Resistance of both HPLC methods has been studied by checking the impact of rate of the mobile phase flow (± 0.2 ml / min.), the temperature of column work (± 10

Tabela 5. Odporność opracowanej metody HPLC – kolumna C4
Table 5. Robustness of the developed HPLC method, column C4

	Czas retencji (min)				Współczynnik asymetrii $A_{10\%}$				Rozdzielczość R_s			
	zan metronidazolu	zan chlorochinaldolu	iozondazol	chlorochinaldol	zan metronidazolu	zan chlorochinaldolu	iozondazol	chlorochinaldol	zan metronidazolu	zan chlorochinaldolu	iozondazol	chlorochinaldol
przepływ fazy	1,3ml/min	6,9	8,4	10,4	13,5	0,89	1,03	1,24	1,58	---	---	---
	1,5ml/min	6,1	7,4	9,8	12,9	0,86	1,09	1,18	1,60	---	---	---
	1,7ml/min	5,5	6,6	9,3	12,4	0,96	1,08	1,16	1,69	---	---	---
temperatura kolumny	30°C	7,0	8,2	9,9	12,9	0,87	1,08	1,24	1,71	---	---	---
	40°C	6,1	7,4	9,8	12,9	0,86	1,09	1,18	1,60	---	---	---
	50°C	5,5	6,6	9,6	12,7	0,85	1,08	1,12	1,67	---	---	---
pH fazy A	pH 5,8	6,0	7,2	9,8	12,9	0,89	1,07	1,16	1,65	---	---	---
	pH 6,0	6,1	7,4	9,8	12,9	0,86	1,09	1,18	1,60	---	---	---
	pH 6,2	6,1	7,4	9,8	12,8	0,90	1,09	1,15	1,46	---	---	---
kolumna (seria)	0415132710	6,1	7,4	9,8	12,9	0,86	1,09	1,18	1,60	---	---	---
	041570567	4,9	5,5	9,5	12,8	0,90	0,96	0,91	1,48	---	---	---

Tabela 6. Odporność opracowanej metody HPLC – kolumna DP
Table 6. Robustness of the developed HPLC method, column DP

	Czas retencji (min)				Współczynnik asymetrii A _{10%}				Rozdzielczość R _s			
	metronidazolu zan	metronidazol	chlorochinaldolu zan	chlorochinaldol	metronidazolu zan	metronidazol	chlorochinaldolu zan	chlorochinaldol	metronidazolu zan	metronidazol	chlorochinaldolu zan	chlorochinaldol
przepływ fazy	1,3ml/min	3,2	3,9	5,2	12,7	1,42	1,54	1,98	1,33	---	3,5	3,6
	1,5ml/min	2,8	3,5	4,5	11,9	1,38	1,46	1,92	1,30	---	3,5	3,6
	1,7ml/min	2,5	3,0	4,0	11,2	1,31	1,42	1,90	1,34	---	3,4	3,5
temperatura kolumny	30°C	2,8	3,5	4,5	12,0	1,33	1,51	1,85	1,36	---	3,4	3,0
	40°C	2,8	3,5	4,5	11,9	1,38	1,46	1,92	1,30	---	3,5	3,6
	50°C	2,7	3,3	4,5	11,8	1,35	1,45	2,00	1,35	---	3,3	4,0
	0,4ml H ₃ PO ₄	2,8	3,4	5,3	11,9	1,30	1,46	2,10	1,34	---	3,6	5,0
faza A	0,5ml H ₃ PO ₄	2,8	3,5	4,5	11,9	1,38	1,46	1,92	1,30	---	3,5	3,6
	0,6ml H ₃ PO ₄	2,7	3,3	4,5	11,8	1,35	1,46	2,04	1,46	---	3,1	4,3
kolumna (seria)	48241-05	2,8	3,5	4,5	11,9	1,38	1,46	1,92	1,30	---	3,5	3,6
	84165-04	2,8	3,5	4,4	12,2	1,35	1,79	1,81	1,28	---	3,5	3,8

($\pm 0,2$ ml/min), temperatury pracy kolumny ($\pm 10^\circ\text{C}$), szarży kolumn, składu fazy A ($\pm 0,1$ ml H_3PO_4) dla układu HPLC z zastosowaniem kolumny DP oraz pH fazy A ($\pm 0,2$ ml H_3PO_4) dla kolumny C4.

Oceniono czasy retencji, współczynniki asymetrii $A_{10\%}$ oraz rozdzielczość. Wyniki zebrano w tabelach 5 i 6.

2. Oznaczanie zawartości

Roztwory wzorców i prób przygotowywano w kolbach z ciemnego szkła.

Przygotowanie roztworów wzorcowych:

Przygotowano metanolewe roztwory wzorcowe badanych substancji czynnych o stężeniu: 0,125 mg/ml metronidazolu i 0,05 mg/ml chlorochinaldolu

Przygotowanie roztworów prób:

Odważono około 0,25 g produktu leczniczego (około 62,5 mg metronidazolu i 25 mg chlorochinaldolu) do kolby o pojemności 100,0 ml i dodano około 50 ml metanolu. Następnie wytrząsano około 30 minut, uzupełniono tym samym rozpuszczalnikiem i przesączono, używając sączków celulozowych o dużej twardości. 5,0 ml przesączu uzupełniono metanolem do 25,0 ml.

Do kolumny chromatograficznej C4 i DP wprowadzono po 20 μl przygotowanych roztworów. Badania przeprowadzono w obu opracowanych, opisanych wcześniej układach HPLC. Uzyskane wyniki oznaczania zawartości substancji czynnych zebrano w tabeli 2.

Wnioski

Przedstawione w powyższej pracy dane pozwalają stwierdzić, że opracowane układy HPLC umożliwiają identyfikację i oznaczenie ilościowe metronidazolu i chlorochinaldolu w preparacie leczniczym. W wyniku przeprowadzonej walidacji spełniono wymagane kryteria akceptacji. Uzyskane dla ww. związków współczynniki korelacji powyżej 0,999 dowiodły liniowości krzywych kalibracji. Wyniki oznaczenia zawartości ($\text{RSD} < 2\%$) potwierdziły precyzję opracowanych metod. Natomiast analiza odzysku substancji czynnych w preparacie w granicach 99,2–101,4% wykazała dokładność metod. Dodatkowo pozytywnym parametrem jest możliwość rozdzielania zanieczyszczeń, a także przeprowadzenie analizy w stosunkowo krótkim czasie (20 min). Roztwory wzorców i prób są stabilne przez 24 h zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w lodówce. Metoda wykazała dużą odporność, co pomaga w odtworzeniu warunków koniecznych dla zapewnienia dokładności w wykonaniu analizy. Opracowane metody można z powodzeniem zastosować w rutynowej analizie.

$^\circ\text{C}$), the ranking of columns, the composition of phase A (± 0.1 ml H_3PO_4) for the HPLC system using a DP column and pH A phase (± 0.2 ml H_3PO_4) for the C4 column. The researchers assessed retention times, asymmetry coefficients $A_{10\%}$ and resolution. The results are summarized in Table 5 and 6.

2. Determination of the content

Standard solutions and samples were prepared in dark glass flasks.

Preparation of standard solutions:

Methanolic standard solutions of the studied active substances were prepared with a concentration: 0.125 mg / ml metronidazole and 0.05 mg / ml chloroquinaldol

Preparation of sample solutions:

About 0.25 g of drug product (about 62.5 mg metronidazole and 25 mg chlorochinaldol) was measured to the 100.0 ml flask and approximately 50 ml of methanol was added. Then, it was shaken for about 30 minutes, supplemented with the same solvent and filtered using cellulose filter papers of high hardness. 5.0 ml of the filtrate was supplemented with methanol to 25.0 ml.

The researchers provided 20 μl of the prepared solutions to C4 and DP chromatographic columns respectively. The study was conducted in both developed, and previously described HPLC systems. The results obtained for content determination of the active substances are summarized in Table 2.

Conclusions

The data presented in this work enables the researchers to conclude that the developed HPLC systems allow the identification and quantification of metronidazole and chloroquinaldol in the drug product. As a result of the validation the researchers have achieved the required acceptance criteria. Correlation coefficients above 0.999 obtained for the discussed compounds proved the linearity of calibration curves. The results of content determination ($\text{RSD} < 2\%$) confirmed the accuracy of the developed methods. However, the analysis of recovery of active substances in the preparation within the range 99.2 - 101.4% has indicated the accuracy of the methods. In addition, the positive parameter is the possibility to separate the impurities, as well as conducting the analysis in a relatively short time (20 min.). Standard solutions and samples are stable for 24 h either at room temperature or in the refrigerator. The method showed a high resistance, which helps to restore the conditions necessary to ensure the accuracy of the conducted analysis. Developed methods can be usefully applied in routine analysis.

Piśmiennictwo / References

1. Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, TomasV, Carpena J. *Spectrofluorimetric flow-injection method for the successive determination of chloroxine and chlorquinaldol in pharmaceutical preparations*. Anal.Chim.Acta 1996;326:41–47.
2. Medeiros EP, Nascimento ECL, Medeiros ACD, Neto JGV, da Silva EC. *Multicommutated generation of concentration*

- gradients in a flow-bath system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs. *Anal.Chim. Acta* 2004; 511:113–118.
3. Nagaraja P, Sunitha KR, Vasantha RA, Yathirajan HS. Spectrophotometric determination of metronidazole and tinidazole in pharmaceutical preparations. *J.Pharm. Biomed. Anal.* 2002;28:527–535.
 4. Vega E, Sola N. Quantitative analysis of metronidazole in intravenous admixture with ciprofloxacin by first derivative spectrophotometry. *J.Pharm.Biomed Anal.* 2001;25:523–530.
 5. Zhang SF, Li HN, Zhang DM, Zhou QZ. Simultaneous determination of metronidazole and vitamin B6 by derivative spectrophotometry. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 1998; 18:488–491.
 6. Jadhar GP, More HN, Mahadik KR. Simultaneous estimation of nalidixic acid and metronidazole using uv/visible spectrophotometer. *Indian Drugs* 1998;35:475–480.
 7. Saffaj J, Charrouf M, Abourriche A, Abboud Y, Bennamara A, Berrada M. Spectrophotometric determination of metronidazole and secnidazole in pharmaceutical preparations. *Il Farmaco* 2004;59:843–846.
 8. Lu SF, Wu KB, Dang XP, Hu SS. Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode. *Talanta* 2004;63:653–657.
 9. Zhi Y, Hu JB, Wu ZD, Li QL. Study on the voltammetric behaviour of metronidazole and its determination at a cobalt/glassy carbon modified electrode. *Anal.Lett.* 1998;31:429–437.
 10. Huang DP, Wang LS. RP-HPLC determination of metronidazole, clotrimazole and chlorhexidine acetate in shuangzuaotai suppository compound. *Yaomu Fenxi Zazhi* 2002;22:129–131.
 11. Frasey AH, Bayer-Grand A, Pouget MP, Vennat B, Lartigue C, Galmier MJ. Validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of metronidazole in transparent oil-water-gel formulations. *Microchim.Acta* 2004;144:171–176.
 12. Quing Z. HPLC determination of metronidazole, clotrimazole and chlorhexidine acetate in their compound effervescent tablets. *Yaowu Fenxi Zazhi* 2001;21:335–337.
 13. Fang ZJ, Sun HQ, Wang YJ, Sui ZY. Determination of metronidazole effervescent tablets. *Yaowu Fenxi Zazhi* 1998;18:335.
 14. Akay C, Ozkan SA, Sentürk Z, Cevheroğlu S. Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Farmaco* 2002;57: 953–957.
 15. Mishal A, Sober D. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of metronidazole benzoate and dioxanide furoate as bulk drug and in suspension dosage form. *J. Pharm and Biomed. Anal.* 2005;39:819–823.
 16. Bembong DK, Manning RG, Mirza T, Bhattacharyya L. A stability-indicating HPLC assay for metronidazole benzoate. *J.Pharm. Biomed. Anal.* 2005;38:776–780.
 17. Fu ZF, Chen H, Zhang ZJ. Determination of metronidazole in preparations by flow injection chemiluminescence analysis. *Fenxi Shiyanshi* 2004;23:1–4.
 18. Patel Y, Dhorda UJ, Sundaresan M, Bhagwat AM. Separation and estimation of five imidazoles by packed column supercritical fluid chromatography. *Anal.Chim.Acta* 1998;362: 271–277.
 19. Bari VR, Dhorda UJ, Sundaresan M. Simultaneous estimation of nalidixic acid and metronidazole in dosage forms using packed column supercritical fluid chromatography. *Anal. Chim.Acta* 1998;376:221–225.
 20. Meshram DB, Bagade SB, Tajne MR. Simultaneous determination of metronidazole and miconazole nitrate in gel by HPTLC. *Pak.J. Pharm.Sci.* 2009;22:323–328.
 21. Gomes APB, Correia LP, Simões MOS, Macêdo RO. Development of thermogravimetric method for quantitative determination of metronidazole. *J.Therm. Anal. Calorim.* 2007;88:383–387.
 22. Maher HM, Youssef RM, Khalil RH, El-Bahr SM. Simultaneous multiresidue determination of metronidazole and spiramycin in fish muscle using high performance liquid chromatography with UV detection. *J.Chromatogr. B Analyt. Technol.* 2008;876:175–181.
 23. Zhou J, Shen J, Xue X, Zhao J, Li Y, Zhang J, Zhang S. Simultaneous determination of nitroimidazole residues in honey samples by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. AOAC* 2007;90:872–878.
 24. Wang H, Wang Z, Liu S, Jiang Y, Wu Y, Shan J. Quantification of nitroimidazoles residues in swine liver by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2009;82:411–414.
 25. Cronly M, Behan P, Foley B, Malone E, Regan L. Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.A* 2009;216:8101–8109.
 26. Zeleny R, Harbeck S, Schimmel H. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of 5-nitroimidazole drugs and their corresponding hydroxy metabolites in lyophilised pork meat. *J. Chromatogr.A* 2009;1216:249–256.
 27. Polzer J, Gowik P. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed Sci Appl.* 2001;761: 47–60.

Adres do korespondencji / Mailing address:

marza@il.waw.pl (Marzena Podolska)
akulik@il.waw.pl (Anna Kulik)
wbialecka@il.waw.pl (Wanda Białecka)
fax: 022 841 18 88 w 272