

PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO DE UHPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL

Optimization and Validation of an Uhplc Analytical Method for the Quantification of Metronidazole

Manuel DE LA MATA CHESA 

Cristina MADERUELO MARTÍN 

Aránzazu ZARZUELO CASTAÑEDA* 

Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, C. Lic. Méndez Nieto, s/n, 37007 Salamanca.

* Correo-e: drury@usal.es

RESUMEN: El metronidazol es un agente antimicrobiano y antiprotazoario de amplio uso clínico, por lo que resulta esencial contar con métodos precisos para su cuantificación en el desarrollo y control de nuevas formas farmacéuticas. En este trabajo se desarrolló y validó un método analítico basado en cromatografía líquida de ultra alta eficiencia para determinar metronidazol en formulaciones experimentales de microesferas obtenidas con goma xantana y quitosán. El protocolo de validación se elaboró y ejecutó conforme a los requisitos normativos internacionales.

Para la validación se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad ($r > 0,999$), exactitud (recuperación 95,0-105,0 %), precisión ($CV < 5,0$ %) y robustez ($CV < 3,0$ % ante cambios deliberados). La separación cromatográfica se efectuó con columna Titan C18 (1,9 mm, $2,1 \times 100$ mm) y fase móvil compuesta por ácido fórmico 0,1% y acetonitrilo (85:15, v/v), con detección ultravioleta a 256 nm.

El método presentó una adecuada linealidad en intervalos de 0,5-75,0 µg/ml y 50,0-1000,0 µg/ml, siendo aplicable en estudios de liberación *in vitro* y ensayos de contenido. Las disoluciones analíticas se mantuvieron

estables al menos 15 días en condiciones de almacenamiento ambiente y refrigerado.

En conclusión, el método cromatográfico desarrollado demuestra especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y robustez, constituyendo una herramienta eficiente para la cuantificación de metronidazol en matrices poliméricas experimentales.

Palabras clave: Metronidazol; UHPLC; Desarrollo de métodos; Validación de métodos.

ABSTRACT: Metronidazole is an antimicrobial and antiprotozoal agent widely used in clinical practice; therefore, accurate quantification methods are essential for the development and quality control of new pharmaceutical formulations. In this study, an analytical method based on ultra-high-performance liquid chromatography was developed and validated for the determination of metronidazole in experimental microsphere formulations prepared with xanthan gum and chitosan. The validation protocol was designed and executed in compliance with international regulatory requirements.

Validation included the assessment of specificity, linearity ($r > 0.999$), accuracy (recoveries between 95.0-105.0%), precision ($CV < 5.0\%$), and robustness ($CV < 3.0\%$ under deliberate variations). Chromatographic separation was performed using a Titan C18 column ($1.9\ \mu\text{m}$, $2.1 \times 100\ \text{mm}$) and a mobile phase consisting of 0.1% formic acid and acetonitrile (85:15, v/v), with ultraviolet detection at 256 nm.

The method demonstrated suitable linearity across the ranges 0.5-75.0 $\mu\text{g/ml}$ and 50.0-1000.0 $\mu\text{g/ml}$, making it applicable to *in vitro* release studies and content assays. Analytical solutions remained stable for at least 15 days under both ambient and refrigerated storage conditions.

In conclusion, the developed chromatography method exhibits high specificity, sensitivity, reproducibility, and robustness, providing an efficient tool for the quantitative determination of metronidazole in experimental polymeric matrices.

Keywords: Metronidazole; UHPLC; Method development; Method validation.

1. INTRODUCCIÓN

El metronidazol (MTZ) es un antibiótico perteneciente al grupo de los nitroimidazoles indicado en el tratamiento de la tricomoniasis causada por *Trichomonas vaginalis*, vaginosis bacteriana, amebiasis e infecciones anaeróbicas (Martínez, 2001). Es ampliamente utilizado fuera de indicación (*off-label*) para el tratamiento de la Enfermedad de Crohn, como profiláctico postquirúrgico (Hernández *et al.*, 2019) y en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* (Lamp *et al.*, 2009).

Aunque el metronidazol es un fármaco ampliamente conocido y utilizado, sigue siendo de gran interés terapéutico, por lo que se trabaja en la mejora de algunas formulaciones ya disponibles en el mercado. Estas mejoras buscan optimizar su eficacia y seguridad, beneficiando así a los pacientes que lo utilizan (Waszczykowska *et al.*, 2020; Jahura *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2023).

El primer paso para la preparación de nuevas formulaciones es el desarrollo de un método analítico capaz de cuantificar el fármaco en la forma farmacéutica objeto de estudio, de forma rápida y específica. Los métodos cromatográficos, en particular la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC), ofrecen estas características. La UHPLC es una técnica avanzada de cromatografía líquida que utiliza columnas con un tamaño de partícula < de 2 µm y altas presiones para separar, identificar y cuantificar compuestos con una mayor sensibilidad, resolución y con menor tiempo de elución que la cromatografía líquida tradicional de HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography). (McShane *et al.*, 2014; Benkeblia *et al.*, 2023)

Este trabajo consiste en la puesta a punto y validación de un método analítico para la cuantificación de metronidazol durante el desarrollo de formulaciones de microesferas en cuya composición se incluye chitosán o goma xantana.

2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este estudio han sido los siguientes:

- Puesta a punto de un método analítico de UHPLC para la cuantificación de metronidazol en formulaciones de microesferas.
- Validación del método analítico de cuantificación de metronidazol en microesferas puesto a punto, siguiendo la normativa ICH.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Búsqueda bibliográfica

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos (Science Direct, PubMed, NCBI) con el fin de recopilar trabajos relacionados con

el fármaco objeto de estudio, sus características fisicoquímicas, los métodos de cuantificación por cromatografía líquida y los protocolos de validación analítica. Se han empleado palabras clave como “UHPLC”, “quantification”, “metronidazole”, “validation protocol” y “set-up”. Mientras que para la búsqueda general no se han aplicado restricciones de fecha, en el caso específico de los métodos y protocolos de validación sí se ha limitado la búsqueda a los últimos cinco años (2019-2024), dado que los estudios en este campo son recientes y en constante evolución.

3.2. Metodología

3.2.1. Instrumentos

La cuantificación fue llevada a cabo en un equipo UPLC Waters con una columna Titan C18 (1,9µm, 2,1 x 100mm).

3.2.2. Reactivos

Ácido fórmico grado HPLC; acetonitrilo grado HPLC-gradiente; metronidazol (Fagron Ibérica S.A.U); placebo de goma xantana: goma xantana (Xantural® 75), alginato sódico (Guinama), solución de cloruro de calcio 6 %, glutaraldehído (Sigma Aldrich), agua purificada; Placebo de chitosán: chitosán 2000-3500 cP, NaOH 1M, alginato sódico, solución de cloruro de calcio 6%, glutaraldehído (Sigma Aldrich), agua purificada, ácido láctico 2 %.

3.2.3. Validación del método

Los parámetros evaluados han sido selectividad y especificidad, linealidad y rango, precisión, exactitud y robustez.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta a punto del método

Tras la revisión de los métodos de HPLC publicados, las primeras pruebas se llevaron a cabo utilizando como fase móvil mezclas de ácido ortofosfórico 0,2 %/acetonitrilo y de ácido fórmico 0,1 %/acetonitrilo, observándose que no había diferencias entre el uso de uno u otro ácido, por lo que se seleccionó el ácido fórmico, reactivo de mayor pureza para su uso en UHPLC. Una vez seleccionada la composición de la fase móvil se testaron diferentes flujos de trabajo, obteniéndose los mejores resultados con una proporción de fase acuosa/orgánica 85/15 y un flujo de 0,4 ml/min.

El resto de las condiciones cromatográficas optimizadas son las siguientes:

- Columna cromatográfica: Titan C18 (1,9 μm , 2,1 x 100 mm).
- Temperatura columna 40 °C/T^a inyector: 22°C.
- $\lambda=256$ nm.
- Volumen de inyección: 0,5 μl (100,0 $\mu\text{g/ml}$ -1000,0 $\mu\text{g/ml}$) y 5,0 μl (0,5 $\mu\text{g/ml}$ -75,0 $\mu\text{g/ml}$).

4.2. Validación del método

El método ha sido validado para dos rangos de concentraciones (50,0-1000,0 $\mu\text{g/ml}$ y 0,5-75,0 $\mu\text{g/ml}$).

4.2.1. Selectividad y especificidad

La especificidad se evaluó para demostrar que el método separa los picos correspondientes al metronidazol de cualquier otro pico correspondiente a otros productos como excipientes presentes en la solución o compuestos de degradación.

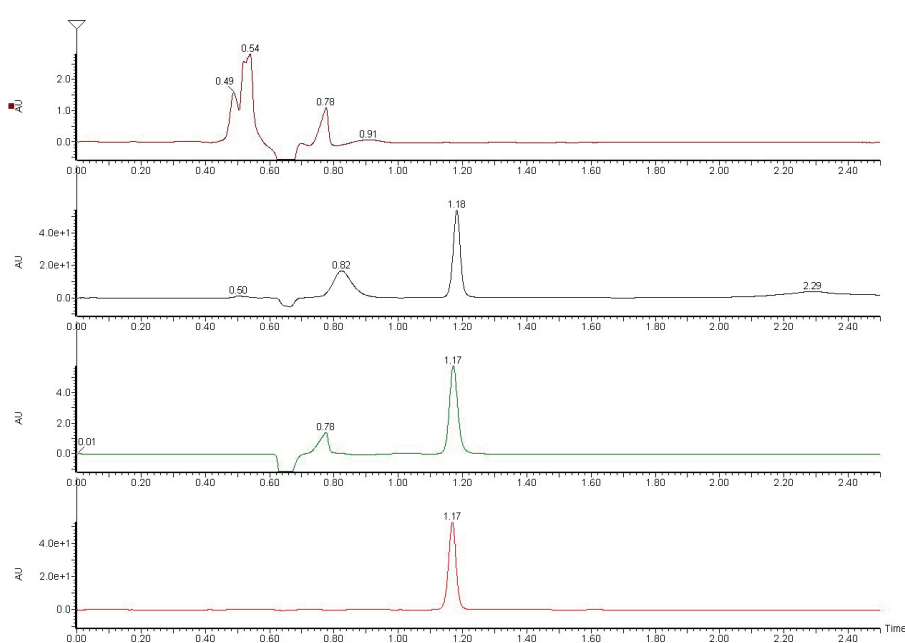


Figura 1. Cromatograma de una muestra placebo (a), muestra de microesferas (b), patrón de 10,0 $\mu\text{g/ml}$ (c) y patrón de 750,0 $\mu\text{g/ml}$ (d).

En primer lugar, se comprobó la concordancia de los tiempos de retención y de los espectros del MTZ en la disolución patrón y en la muestra, siendo tanto el tiempo de retención como el espectro del analito de interés similar en ambas muestras.

La figura 1 muestra un cromatograma de un blanco, de una muestra de microesferas y una muestra de un estudio de cesión, quedando de manifiesto que el pico del MTZ está bien resuelto del resto de picos presentes en el cromatograma, con un valor de resolución entre el MTZ y cualquier otro analito $>1,5$. Todo ello pone de manifiesto la selectividad y especificidad del método.

4.2.2. Linealidad y rango

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de la recta de calibrado quedan recogidos en la tabla 1 para los dos rangos de concentración, 50,0-1000,0 $\mu\text{g/ml}$ y 0,5-75,0 $\mu\text{g/ml}$ de metronidazol.

Tabla 1. Análisis estadístico del estudio de linealidad y rango para las concentraciones 50,0-1000,0 $\mu\text{g/ml}$ de MTZ y 0,5-75,0 $\mu\text{g/ml}$ de MTZ.

	50,0-1000,0 $\mu\text{g/ml}$	0,5-75,0 $\mu\text{g/ml}$
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9997	0,9999
Ordenada origen	-141,8	21,5
Intervalo confianza ordenada 95%	-494,2 - 210,6	-138,9 - 181,9
$t_{\text{experimental}}$ ordenada	-0,8	0,3
Pendiente	88,6	872,1
Intervalo confianza pendiente 95%	87,9 - 89,3	866,9 - 877,4
$t_{\text{experimental}}$ pendiente	274,5	346,7

Como queda recogido en la tabla, la recta de calibrado es lineal y proporcional en ambos rangos de concentraciones para un intervalo de confianza del 95 %:

- En el rango de 50,0-1000,0 $\mu\text{g/ml}$ la ordenada en el origen es inferior al 3,0 % de la respuesta del analito en el valor nominal, las varianzas de la respuesta a cada concentración son homogéneas, los residuales no tienen tendencia en los valores y el coeficiente de correlación es superior a 0,999.
- En el rango 0,5-75,0 $\mu\text{g/ml}$ la ordenada en el origen es menor al 5,0 % de la respuesta del analito en el valor nominal, las varianzas de la respuesta a cada concentración son homogéneas, los residuales no tienen tendencia en los valores y el coeficiente de correlación es superior a 0,999.

4.2.3. Exactitud

La exactitud ha sido determinada calculando la recuperación de los dos placebos (goma xantana y chitosán) dopados con concentraciones conocidas de MTZ para 6 concentraciones diferentes preparadas por triplicado (3 del rango de concentraciones de 50,0-1000,0 µg/ml y 3 del rango de concentraciones de 0,5-75,0 µg/ml).

Para la goma xantana, el valor medio de recuperación obtenido ha sido 101,3 % para el rango de 50,0-1000,0 µg/ml y de 100,7 % para el rango de 0,5-75,0 µg/ml, mientras que para el chitosán los valores medio de recuperación han sido 101,1% para el rango de 50,0-1000,0 µg/ml y de 99,5 % para el rango de 0,5-75,0 µg/ml, cumpliendo todos los rangos, en las dos formulaciones, con el criterio de aceptación previamente establecido (% recuperación: 95,0 %-105,0 %), por lo que el método se considera exacto para cuantificar MTZ en ambas la formulación dentro de los rangos establecidos.

4.2.4. Precisión

a) Repetibilidad del sistema

La repetibilidad del sistema se ha determinado mediante la desviación estándar y el coeficiente de variación calculado a partir de seis inyecciones de patrón de MTZ a dos concentraciones distintas, una de 10,0 µg/ml y otra de 750,0 µg/ml, con unos coeficientes de variación de 0,4 y 0,3 %, por lo que cumple la especificación fijada, $CV \leq 3,0$ %.

b) Precisión intradía e interdía

La precisión intradía fue determinada mediante el análisis de 6 muestras de diferentes concentraciones de MTZ (0,5 µg/ml; 25,0 µg/ml; 50,0 µg/ml; 750,0 µg/ml) y calculando el respectivo CV para cada concentración.

La precisión interdía se ha determinado comparando los resultados obtenidos por un analista siguiendo el mismo procedimiento analítico que se utilizó para evaluar la repetibilidad del método (intradía) con los resultados obtenidos por el mismo analista en las mismas muestras, en días diferentes y con diferentes reactivos (tres días). Se utilizan las mismas concentraciones que para la precisión intradía.

El coeficiente de variación para los resultados obtenidos de los ensayos de repetibilidad intradía es inferior al 3,0 % en el rango de concentraciones 50,0-1000,0 µg/ml e inferior a 5,0 % en el rango 0,5-75,0 µg/ml. Asimismo, el coeficiente de variación para los resultados obtenidos de los ensayos de precisión interdía es inferior al 5,0 % en el rango de concentraciones 50,0-1000,0 µg/ml e inferior a 7,5 % en el rango 0,5-75 µg/ml, por lo que se puede concluir que el método es preciso en términos de precisión intradía e interdía.

4.2.5. Robustez

a) Estabilidad de las soluciones

Se ha medido la estabilidad de dos patrones, 10,0 µg/ml y 500,0 µg/ml, durante 15 días tras almacenamiento en frigorífico con una temperatura controlada y estable (2-8 °C) y a temperatura ambiente, quedando de manifiesto que los patrones son estables durante 15 días almacenadas tanto en frigorífico como a temperatura ambiente, ya que la variación en el área es ≤ 3,0 % para el patrón de 500,0 µg/ml y ≤5,0 % para el patrón de 10,0 µg/ml; además, no presentando picos de degradación adicionales.

b) Robustez instrumental

Para la evaluación de la robustez del método, se han llevado a cabo distintos ensayos variando las condiciones cromatográficas de una en una (tabla 2):

- Temperatura de la columna: 35 °C y 45 °C.
- Flujo de la columna: 0,35 y 0,45 ml/min.
- Fase móvil: ácido fórmico 0,15 %/Acetonitrilo (85:15; v/v).

Tabla 2. Resultados de la valoración de las formulaciones de goma xantana y chitosán para distintas concentraciones de MTZ y para los diferentes métodos analíticos en comparación con el método original (m.o).

	goma xantana 10,0 µg/ml		chitosán 10,0 µg/ml		goma xantana 500,0 µg/ml		chitosán 500,0 µg/ml	
	% MTZ	Diferencia m.o (%)	% MTZ	Diferencia m.o (%)	% MTZ	Diferencia m.o (%)	% MTZ	Diferencia m.o (%)
Método original	96,5±2,2	-	102,4±3,6	-	100,3±1,3	-	101,2±0,4	-
Flujo 0,35 ml/min	97,1±3,3	0,61	101,8±0,7	0,6	100,2±1,6	0,10	101,7±1,8	0,5
Flujo 0,45 ml/min	96,9±1,4	0,41	102,7±1,4	0,3	99,6±2,1	0,70	100,5±0,9	0,7
Tº columna 35°C	95,9±3,6	0,62	102,0±1,1	0,4	100,9±2,6	0,60	99,9± 1,2	1,3
Tº columna 45°C	96,1±1,9	0,41	102,0±1,0	0,4	98,8±1,1	1,51	101,7±0,8	0,5
0,15% fórmico	97,1±2,0	0,62	101,7±2,1	0,7	101,4±2,4	1,10	101,9±1,8	0,7

Los parámetros que se han medido son el tiempo de retención del metronidazol y % de metronidazol.

Como queda recogido en la tabla 2, el CV para cada uno de los resultados obtenidos de la comparación del método original con los cambios realizados para la evaluación de la robustez instrumental es inferior al 5,0 %, valor establecido en el protocolo de validación por lo que el método es robusto respecto a la variación de flujo, temperatura de la columna y concentración de ácido fórmico.

5. CONCLUSIONES

El método propuesto para la cuantificación de metronidazol en formulaciones de microesferas elaboradas con goma xantana o chitosán ha demostrado cumplir con los criterios establecidos para la validación de métodos analíticos. La evaluación de la linealidad reveló una adecuada correlación en los intervalos de concentración comprendidos entre 50,0-1000,0 µg/ml y 0,5 -75,0 µg/ml, lo que garantiza su aplicabilidad en un amplio rango de niveles de concentración, tanto para cuantificar la riqueza del principio activo como para monitorizar su liberación desde la matriz polimérica.

Asimismo, el estudio de precisión ha confirmado la reproducibilidad del método, mientras que los ensayos de robustez evidenciaron que pequeñas variaciones en parámetros críticos, como el flujo de la fase móvil ($\pm 0,05$ ml/min), la temperatura de la columna (35 °C y 45 °C), y la concentración de ácido fórmico en la fase móvil (+0,05 %); no afectan significativamente los resultados, lo que otorga al método una alta fiabilidad en condiciones rutinarias de laboratorio. Por otro lado, se ha comprobado la estabilidad de las disoluciones patrón durante al menos 15 días, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración (2-8 °C).

En conjunto, estos resultados permiten concluir que el método desarrollado es adecuado para la determinación cuantitativa de MTZ en formulaciones de microesferas, siendo además un procedimiento sencillo, rápido y de bajo coste en cuanto a reactivos y recursos técnicos, lo que lo convierte en una herramienta útil tanto para el control de calidad como para estudios de liberación *in vitro* del principio activo.

6. BIBLIOGRAFÍA

Benkeblia N. Gas Chromatography-mass Spectrometry and Liquid Chromatography-mass Spectrometry Metabolomics Platforms: Tools for Plant Oligosaccharides Analysis. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2023 1;5.

- Hernández Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L. Therapeutic Uses of Metronidazole and its Side Effects: An Update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(1):397-401.
- Jahura FT, Ferdousi FK, Mostofa Kamal AH, Ul-Hamid A, Ehsan MQ, Hossain MA. Electrostatic adsorptive loading of ciprofloxacin and metronidazole on chitosán nanoparticles to prolong the drug delivery process with preserved antibacterial activities: formulation and characterization. *Nanoscale Adv.* 2024 22;7(2):621-33.
- Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole Antimicrobials. *Clin Pharmacokinet.* 1999;36(5):353-73.
- Lin T, Qin T, Jiang S, Zhang C, Wang L. Anti-inflammatory and anti-biotic drug metronidazole loaded ZIF-90 nanoparticles as a pH responsive drug delivery system for improved pediatric sepsis management. *Microb Pathog.* 2023 1;176:105941.
- Martinez V, Caumes E. Métronidazole [Metronidazole]. *Ann Dermatol Venereol.* 2001;128(8-9):903-9.
- McShane AJ, Farrokhi V, Nemati R, Li S, Yao X. An Overview of Quantitative Proteomic Approaches. *Comprehensive Analytical Chemistry.* 2014 1;63:111-35.
- Waszczykowska A, Żyro D, Jurowski P, Ochocki J. Effect of treatment with silver(I) complex of metronidazole on ocular rosacea: Design and formulation of new silver drug with potent antimicrobial activity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2020 1;61:126531.