



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DETERMINACION SIMULTANEA DE METRONIDAZOL Y ACIDO  
(2-METIL-5-NITRO-IMIDAZOLIL-1) ACETICO POR  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA

## T E S I S

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

MA. EUGENIA GUERRERO GUTIERREZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

- I. INTRODUCCION.
- II. GENERALIDADES.
  - 1. Antecedentes del metronidazol.
  - 2. Farmacocinética.
  - 3. Descripción y propiedades.
  - 4. Métodos de análisis del metronidazol.
- III. PARTE EXPERIMENTAL
  - 1. Equipo, material y reactivos.
  - 2. Selección de condiciones cromatográficas.
  - 3. Linealidad y cantidad mínima detectable.
  - 4. Métodos de extracción en plasma.
- IV. RESULTADOS Y DISCUSION.
- V. CONCLUSIONES.
- VI. BIBLIOGRAFIA

## I. INTRODUCCION

Tanto la industria farmacéutica como los estudiosos de la biofarmacia requieren de métodos analíticos que les permitan realizar, en forma confiable y rápida, la determinación cuantitativa de fármacos activos y de sustancias afines como los metabolitos o subproductos de síntesis.

El propósito de este trabajo es presentar un método que permite determinar simultáneamente el metronidazol (I) y el ácido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético (J). El método desarrollado consiste en la separación y cuantificación de estos compuestos por cromatografía líquida moderna, con detección espectrofotométrica en la región ultravioleta. Se describen las condiciones apropiadas de fase móvil, de la columna y las características y límites de la determinación cuantitativa. Además, se demuestra que es posible utilizar métodos simples de preparación de muestras plasmáticas sin interferencias apreciables.

## **II. GENERALIDADES**

La amibiasis es una enfermedad infecciosa que constituye un problema de salud pública ya que es causa de un gran índice de mortalidad en muchos países, por lo que ha habido mucho interés en obtener fármacos que ayuden a resolver este problema.

El fármaco que se usó por más de 50 años para el tratamiento de la amibiasis disintérica fue el clorhidrato de emetina, después, con algunas ventajas sobre el anterior apareció la dehidroemetina. A partir de 1961 se descubrió la actividad anti-amibiana del metronidazol (1), que en los últimos años se ha considerado como el fármaco de elección en el tratamiento de la forma de amibiasis mencionada.

Está clasificado en el grupo de compuestos que tienen acción tanto en los tejidos como en la luz intestinal y que se administra por vía oral (1).

Esta sustancia era ya conocida como tricomonocida efectivo, además se ha señalado su uso para el tratamiento del alcoholismo crónico (2) ya que se produce una acumulación de acetaldehído, producto intermedio en la oxidación del etanol a anhídrido carbónico y agua (3). La efectividad del metronidazol no se limita ahí, ya que también actúa contra Giardia lamblia, hay testimonios de su utilidad en el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad de Vincent (4) y se usa para eliminar el gusano de Guinea (Dracunculus) en la dracunculiasis (5); además, muestra actividad contra microorganismos anaeróbicos.

Los amebicidas actúan por varios mecanismos. Algunos actúan suprimiendo el agente etiológico, otros actúan indirectamente destruyendo las bacterias intestinales necesarias para la supervivencia de las amibas u otro parásito. Un tercer tipo actúa en ambas maneras, directa e indirectamente. El metronidazol pertenece a este tercer grupo, por lo que ejerce su acción sobre todas las zonas donde normalmente se encuentran los parásitos.

#### Farmacocinética del metronidazol (6).

La biodisponibilidad del metronidazol es virtualmente del 100% administrado oralmente, por lo que muchos pacientes pueden ser tratados con medicación oral y obtener así niveles terapéuticos excelentes en 1 ó 2 horas.

Los modelos farmacocinéticos demuestran que el metronidazol tiene un volumen aparente de distribución grande, esto se confirma por las altas concentraciones encontradas en la mayoría de los tejidos analizados: hueso, tejido de la pelvis, fluido seminal y saliva, entre otros.

La vida media de eliminación es aproximadamente de 8 horas. La constante de absorción por vía oral ( $K_a$ ) es de aproximadamente  $3.02 \text{ h}^{-1}$ , el volumen aparente de distribución está dentro del intervalo de 0.50 a 0.853 l/kg.

Durante la biotransformación del metronidazol en el hombre

tiene lugar la formación de algunos compuestos que se detectan inicialmente en la orina.

Los compuestos que se forman son los metabolitos hidróxido y ácido: 1-(2-hidroxietil)-2-hidroxi-metil-5-nitroimidazol y 1-ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol respectivamente. Después de la oxidación del hidroximetabolito resulta la formación de pequeñas cantidades de 1-(2-hidroxietil)-2-carboxi-5-nitroimidazol. También se forman los derivados glucoronidos y sulfato de metronidazol que también son detectados en la orina.

El metronidazol y sus metabolitos de oxidación excretados en orina, representan aproximadamente el 35 al 65% de la dosis administrada. Los metabolitos de reducción del grupo nitro del metronidazol son el ácido N-(2-hidroxietil)oxámico y la acetamida. Estos compuestos se detectan en la orina y representan aproximadamente 1 a 2% de la dosis administrada.

Después de una dosis de 500 mg de metronidazol por vía oral o intravenosa, los niveles en plasma del hidroximetabolito son de aproximadamente de 1 a 2  $\mu\text{g/ml}$  y del metabolito ácido se detectan solamente 0.20  $\mu\text{g/ml}$ . Después de una dosis de 1500 mg de metronidazol, el hidroximetabolito se detecta en concentraciones altas, aproximadamente 9 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Con dosis múltiples de metronidazol por vía endovenosa, los niveles sanguíneos del hidroximetabolito representan el 30% de la dosis y los del ácido solamente el 3%.

La vida media del hidroximetabolito es ligeramente mayor - que la del metronidazol y es de aproximadamente 9.7 horas.

Efectos adversos del metronidazol.

Las dosis masivas pueden ocasionar náuseas asociadas con - vómito, pero las dosis terapéuticas generalmente sólo producen lige- ras molestias gastrointestinales y se puede experimentar un gusto me tático, por la secreción de (I) en la saliva.

Cuando la terapia es prolongada y con dosis altas se puede producir leucocitopenia, que es reversible cuando se deja de adminis- trar éste fármaco. La coloración café o café rojiza de la orina se atribuye a la formación de compuestos azoxi que son el resultado de la reducción del grupo nitro del metronidazol, probablemente causada por las nitroreductasas de la flora intestinal. (6)

Se han reportado casos de alteración nerviosa con dosis - grandes y/o en terapias prolongadas, presentándose ataxia, disnea y confusión. El mecanismo de este efecto adverso se desconoce pero se atribuye a la acumulación de I en el tejido nervioso.

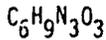
Los estudios realizados en animales y bacterias han mostra- do evidencia de potencial mutagénico, tumorogénico y dismorfogénico del metronidazol y sus metabolitos de oxidación y reducción, pero mu chos de estos estudios han sido considerados sin valor científico, - ya que al realizar un análisis retrospectivo sobre la incidencia de

tumores en los pacientes de tricomoniasis, no se encontró un incremento en dicha incidencia. Por lo tanto es necesario definir con mayor claridad el mecanismo de acción del metronidazol, lo cual ayudaría a entender su potencial de toxicidad celular.

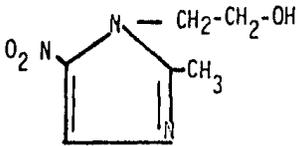
Descripción y propiedades del Metronidazol. (21)

Nombre Químico: 2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol; 2-metil-5-nitro-1-imidazoetanol; 1-(2-hidroxietyl)-2-metil-5-nitroimidazol; - 1-(β-etinol)-2-metil-5-nitro-3-azopirrol.

Fórmula condensada:



Fórmula desarrollada:



Peso molecular 171.15

Descripción:

Es un polvo cristalino de color blanco o crema, de olor débil, de sabor amargo y ligeramente salino. No es higroscópico.

Solubilidad:

Soluble en ácidos diluidos, poco soluble en agua y en dimetilformamida, ligeramente soluble en alcohol, cloroformo y éter.

Punto de fusión:

Funde entre 159° y 163° C

Absorción al U.V:

La solución al 0.02 por 1000 (p/v) en ácido clorhídrico -

0.1 N presenta un mínimo de absorción a 240 nm y un máximo a 277 nm con  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 370$ .

#### Métodos de análisis para metronidazol.

Los métodos de análisis del metronidazol pueden clasificarse en tres grupos. El primero agrupa aquellos que utilizan las propiedades químicas o electroquímicas del grupo nitro. Su principal desventaja es la falta de especificidad y selectividad, pues se cuantifican sin distinción tanto el metronidazol como sus productos de oxidación.

En el segundo grupo se incluyen las técnicas cromatográficas, con las que es posible obtener selectividades adecuadas para la valoración individual de metronidazol y otras sustancias.

En el tercer grupo se encuentran aquellos métodos que se basan en la medición de la bioactividad, pero tampoco es posible diferenciar con ellos al metronidazol de sus metabolitos.

Además de la selectividad, una diferencia importante entre los tres grupos, es que mientras que con el último es posible medir la bioactividad total del espécimen ensayado, con los dos primeros no es posible obtener ésta información.

Para fines de comparación, a continuación se describen brevemente los principales métodos informados para los tres grupos.

## GRUPO I

### a) Método volumétrico. (7)

Es una titulación no acuosa, empleando ácido perclórico como agente titulante. La muestra se disuelve en ácido acético y como indicador se usa verde de malaquita. Se hace un blanco para hacer la corrección necesaria. Es muy poco sensible.

### B) Método espectrofotométrico. (8), (9)

Este método se basa en la determinación de la absorbancia de una solución de metronidazol a 274 nm. La muestra se disuelve en una solución de ácido sulfúrico 0.1N en metanol, tratándose de igual manera a una solución estándar. Esta determinación requiere de una separación previa (si es que no se encuentra en un estado puro) por cromatografía en capa delgada. La cantidad mínima detectable que puede obtenerse mediante estos métodos oscila entre 0.5 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$ .

### C) Método colorimétrico. (7)

El metronidazol puede ser analizado por colorimetría, por reducción del grupo nitro a la amina correspondiente, que a su vez es determinada por la formación de la sal de diazonio y posterior copulacion con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (reactivo de Bratton-Marshall).



solución de concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  en solución amortiguadora de  $\text{pH} = 3.8 \pm 0.2$ . El valor máximo del pico es aproximadamente - 0.23 volts contra un electrodo saturado de calomel. El método es rápido. La cantidad mínima detectable varía de 0.1 a - 0.3  $\text{g/ml}$ .

## Grupo 2

Dentro de este grupo encontramos los métodos cromatográficos, los cuales son selectivos. Las técnicas que se encuentran descritas en la literatura son:

### A) Cromatografía en capa delgada. (7), (12)

ADSORBENTE	ELUYENTE	DETECCION	R <sub>f</sub>	REFERENCIA
Gel de sílice	E-1	1	0.76	7
Gel de sílice	E-2	1	0.65	7
Gel de sílice	E-3	1	0.36	7
Gel de sílice	E-4	1,2	0.66	7
Sílica F 254	E-5	3	0.15	7,12

E-1 : Cloroformo:Metanol:Agua:Acido acético 74:20:4:2

E-2 : Acetona

E-3 : Benceno:Metanol:Hidróxido de amonio 79:20:1

E-4 : Cloroformo:Metanol:agua Acido acético 74:24:4:2

E-5 : Cloroformo:Acido acético 9:1

1. Atomizar con tricloruro de titanio al 1% y calentar a 130°C durante 3 minutos. Atomizar después con dimetilaminobenzaldehído en ácido clorhídrico 2N.
2. Saturar la placa con hipoclorito de t-butilo. Atomizar con una solución de almidón al 1% solución de yoduro de potasio al 1% - (es más sensible que 1).
3. Absorción a 254 nm.

B) Cromatografía de gases. (7), (10), (8), (12)

Existen un gran número de métodos descritos en la literatura para analizar metronidazol por cromatografía de gases, algunos de ellos se mostrarán a continuación:

Empaque	Tem.horno (°C)	Gas (ml/min)	Detector	T.R. (min)	Est.Int (T.R.)	Derivado
OV-1 Gas Chrom. Q	3% 160	N <sub>2</sub> (70)	DIF	4.1	Alcohol miristi lico(5,1)	Trimetil sili
OV-17 Gas Chrom. Q	3% 160	Argón: metano 90:10 (70)	DCE	-	-	Trimetil sili
OV-225 Gas Chrom. W	3% 250	N <sub>2</sub> (50)	DCE	6.1	-	-

DIF : Detector de ionización de flama.

DCE : detector de captura de electrones

La cantidad mínima detectable más pequeña entre los sistemas antes descritos, es de 0.01 µg/ml.

C) Cromatografía líquida moderna. (13), (14), (12)

El metronidazol y sus metabolitos pueden cuantificarse utilizando la técnica de cromatografía líquida moderna. A continuación se presentarán algunas condiciones de operación descritas en la literatura.

Columna (cmXmm)	Empaque (um)	Fase móvil	Flujo (ml/min)	Detector (nm)	T.R. (min)	Estándar Interno
30 x 3.9	uBondapackC <sub>18</sub>	E-1	2.3	313	5.7	-
30 x 4	uBondapackC <sub>18</sub>	E-2	2.0	324	5.0	-
15 x 4.6	Spherisorb 5 ODS (5)	E-3	1.0	320	5.0	1-(hidroxipropil-2-metil-5-nitroimidazoles.
30 x 4	uBondapackC <sub>18</sub>	E-4	1.5	320		-

E - 1 = Metanol:acetonitrilo:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.005 M pH = 4 4:3:93

E - 2 = Acetonitrilo:Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH = 4 8:92

E - 3 = Acetonitrilo:Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH = 5.5 15:85

E - 4 = Acetonitrilo:Solución amortiguadora de acetatos 20 mM pH = 4 7:93

La cantidad mínima detectable encontrada bajo estas condiciones es de 0.1 µg/ml.

### GRUPO 3

Dentro de este grupo se encuentran las técnicas que cuantifican directamente la bioactividad del metronidazol y de sus metabolitos inespecíficamente.

Una de las técnicas que se utilizan, es la de tubo de dilución inhibitoria con Tricomona vaginalis como organismo de prueba.

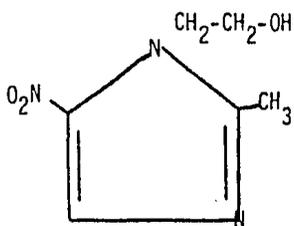
Otro de los métodos utilizados es la técnica de dilución de agar que se basa en el principio de encontrar la cantidad mínima inhibitoria que proporciona un inóculo bacteriano específico que se expone al fármaco en una serie de cajas de agar incorporadas con metronidazol. El medio elegido contiene: tripticasa 1%, gelisato 1%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 0.1%, piruvato 0.1%, arginina 0.1%, cloruro de sodio 0.5%, vitamina K 0.5 µg/ml, y agar. El medio tiene los componentes ideales nutricionales más adecuados para los microorganismos anaeróbicos. Una ventaja específica de este método es que no se utiliza el medio enriquecido con sangre. Los organismos de prueba son: C. perfringes, B. fragilis, B. thetaiota omi---cron. (6), (15).

La elección de la técnica depende de múltiples factores, pero en primer término de las características de la muestra que se desea analizar. En el caso del presente trabajo, en concreto, se deseaba desarrollar un método que permitiera determinar simultáneamente el metronidazol y el producto de oxidación (J). Imponiendo el re

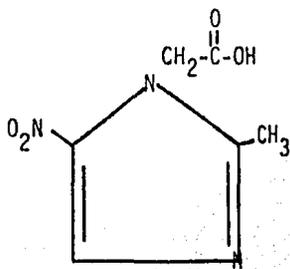
quisito de que fuera útil, por una parte, para determinar el metabolito en muestras de metronidazol y determinar el metronidazol en una muestra del metabolito elaborado en los laboratorios del Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales de la DEPg.

Adicionalmente el método debía poderse extender a la determinación de ambos compuestos en muestras plasmáticas. Así la necesidad de disponer de un método selectivo conduce a elegir alguna de las técnicas cromatográficas. Además, la excesiva poca volatilidad de (J) hace que las técnicas de cromatografía líquida sean las más favorecidas y de ellas, por las ventajas que presenta, la cromatografía líquida moderna.

Aún cuando en la literatura, como ya se mencionó, se encuentran citados sistemas para el análisis de (I) y algunos de sus metabolitos, no es el caso para el metabolito ácido. Por lo que fue necesario estudiar el efecto de las diversas variables del sistema cromatográfico.



I



J

La cromatografía es una técnica de separación que asociada a sistemas de detección de gran selectividad la han convertido en uno de los procedimientos más populares de análisis. En sus ya casi 80 años de existencia, la cromatografía es un área de la química analítica aún joven y en pleno desarrollo. Uno de sus aspectos más recientes es la cromatografía líquida moderna, que se inicia a principios de los años 70 cuando el desarrollo tecnológico permite hacer realidad y llevar a la práctica las predicciones elaboradas años antes. Las características más sobresalientes de la técnica son:

- . Columnas reusables y de diámetro pequeño (2-5 mm)
- . Columnas empacadas con partículas de muy pequeño diámetro (2-10  $\mu\text{m}$ ).
- . Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlable de la fase móvil.
- . Introducción precisa de cantidad de muestra y sin la necesidad de usar muestras grandes.
- . Instrumentos automatizados.
- . Análisis rápidos.
- . Alta resolución.

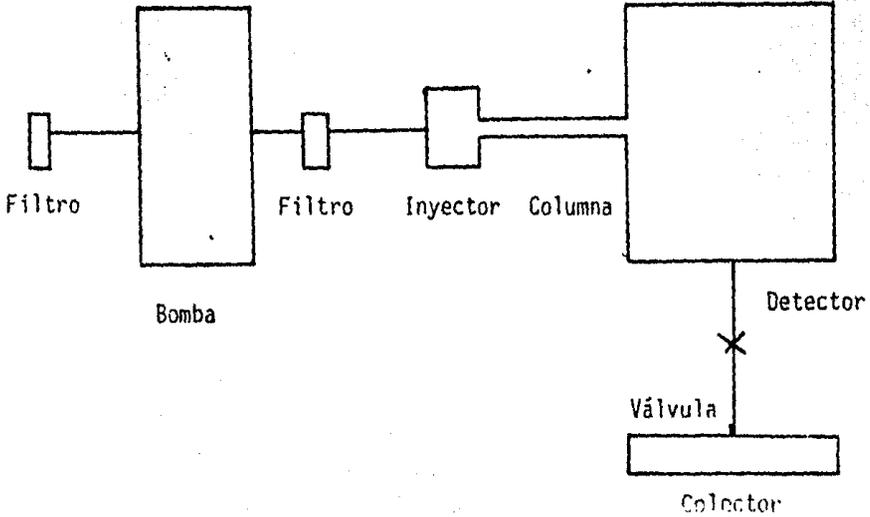
Usualmente la técnica se refiere como HPLC, siglas en inglés de cromatografía líquida de alta presión. Una desafortunada

elección que nombra a la técnica por una de sus desventajas, la presión es el precio que se debe pagar por la gran eficiencia que se obtiene. Reconociendo el error pero tratando de conservar el acrónimo HPLC, ya muy difundido, se cambia "pressure" por "performance" (funcionamiento, ejecución) que nuevamente con poca fortuna se traduce - al español como "eficiencia". En los últimos años y reconociendo - que, aunque falta mucho por desarrollar, difícilmente se producirán cambios drásticos, se ha preferido llamarla cromatografía líquida moderna para diferenciarla de la cromatografía líquida clásica (lo que aún hoy, se realiza básicamente de la misma manera en que la concibió Tswet a principios del siglo. (17).

En vista de que existen numerosos textos que describen la - técnica, especialmente el libro de L.R. Snyder y J.J. Kirkland (16), obviaremos la descripción de los detalles más generales y dedicare--mos las siguientes páginas a la presentación de los conceptos utilizados en el desarrollo de este trabajo.

La cromatografía líquida moderna se fundamenta en la distribución de los componentes de la muestra inyectada, entres dos fases. Una de estas dos fases es la fase estacionaria con gran área de su--perficie y la otra es la llamada fase móvil. La migración diferen--cial de los componentes de la muestra es resultado del equilibrio de distribución de los diferentes solutos entre las partículas de la fase estacionaria y la fase móvil.

El equipo cromatográfico básicamente está constituido por - un inyector, un sistema de bombas de alta presión, columna empacada con una fase estacionaria de partícula muy pequeña y un sistema de - detección muy sensible. A continuación se presenta un esquema típico del sistema cromatográfico.



Tiempo de retención: es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna. Se mide desde el momento de la inyección hasta que eluye el máximo del pico.

En una columna la fase móvil y las condiciones de operación dadas son constantes para cada compuesto.

Tiempo muerto: se representa por  $t_0$  o  $t_m$ . Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida por la columna. Se mide con el tiempo de retención de la fase móvil o de algún disolvente - similar.

Tiempo de retención ajustado;  $t_r'$ : es la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto. Es el tiempo que permanece el soluto en la fase estacionaria.

Factor de capacidad;  $k'$ : es la relación entre el número - de moles del soluto en la fase estacionaria y el número de moles en la fase móvil en condiciones de equilibrio.

$$k' = n_e / n_m = K V_e / V_m$$

El factor de capacidad puede calcularse a partir del cromatograma, la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto se divide entre el tiempo muerto.

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

El factor de capacidad está estrechamente ligado a la resolución y al tiempo de análisis lo cual se muestra de la siguiente manera:

$$t = t_2 = t_0 (1 + k_2')$$

En el siguiente cromatograma se mostrarán gráficamente algunas definiciones cromatográficas.

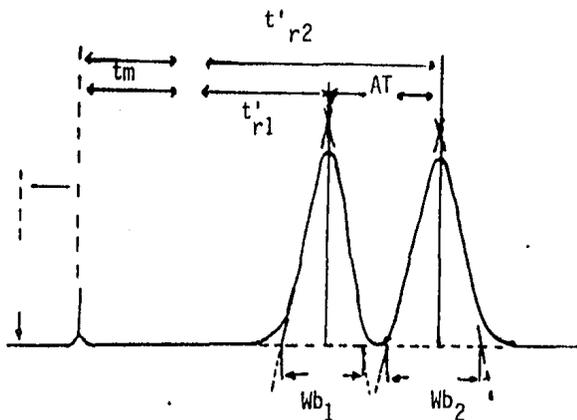


Figura K

Selectividad ( $\alpha$ ): es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. La selectividad es un parámetro importante dentro de la cromatografía, influye estrechamente en lograr una buena resolución.

$$\alpha = t'_{r2} / t'_{r1} = k_2' / k_1'$$

Eficiencia: es un sistema cromatográfico la eficiencia se define como la cantidad de platos teóricos obtenidos o la altura equivalente de plato teórico (HEPT). La ecuación de N (número de platos teóricos) se obtiene considerando que la forma de la señal obtenida en el cromatograma es Gaussiana y en el ancho en la base de esa señal es aproximadamente 4 veces el valor de  $\sigma$ .

$$N = 16 (t_r / w_b)^2 \quad N = L/H$$

donde  $w_b$  es el ancho del pico y H es HEPT

La eficiencia es un parámetro que afecta la resolución.

Se ha mostrado que la eficiencia es función de:

- Diámetro de las partículas del empaque de la columna.
- Flujo de la fase móvil.
- Viscosidad de la fase móvil.
- Tipo de muestra y concentración de ésta.
- Temperatura de separación.
- Longitud de la columna.

Resolución: es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos en una columna determinada. La resolución se puede calcular utilizando las señales o picos del cromatograma con la siguiente relación: (Figura K)

$$R_s = (t_2 - t_1) / 1/2 (t_{w1} - t_{w2})$$

Un valor de  $R_s$  igual a 1.0 significa que solamente el 2% - de uno de los picos se superpone sobre el otro pico. Un  $R_s$  igual a 1.5 significa una separación completa. Asumiendo que el número de platos teóricos (N) se mantiene constante para todos los picos del - cromatograma, también que  $t_1 \approx t_2$  y por lo tanto  $t_{w1} \approx t_{w2}$ , además

sustituyendo ciertos parámetros de las ecuaciones de  $k'$ ,  $N$  y selectividad ( $\alpha$ ) se llega a la siguiente ecuación:

$$R_s = (1/4) \sqrt{N} (\alpha-1) (k'/1+k')$$

Es decir, la resolución de dos picos depende de la selectividad de la fase móvil, de la eficiencia de la columna y del factor de capacidad.

Tiempo de análisis: es aproximadamente igual a tiempo de retención del último pico del cromatograma. Depende de la longitud de la columna y del flujo y por lo tanto de la permeabilidad de la columna, factor de resistencia al flujo, caída de presión a través de la columna, viscosidad de la fase móvil y diámetro de las partículas del empaque.

Problema general de la elución: el problema general de la elución ocurre en todas las formas de cromatografía cuando los valores de  $k'$  para los primeras y últimas señales de un sistema multicomponente difieren por más de 10 unidades de  $k'$ . Los primeros picos se presentan poco resueltos (valores de  $k'$  bajos) y los últimos picos están resueltos pero muy difusos, tanto que, la detección es muy pobre o bien no se realiza.

La manera más común de resolver este problema es mediante el uso de la técnica llamada gradiente de elución donde la composi--

ción de la fase móvil varía continuamente a través de todo el análisis. Otra manera de resolver el problema general de la elución es - variar la temperatura de la columna o el flujo. Se ha observado que con la variación de la temperatura se gana muy poco ya que los cambios de viscosidad y la falta de equilibrio térmico en la columna reducen la resolución. La desventaja de la programación de flujo es - que el equipo necesario es costoso. Un camino alternativo es analizar - la muestra con 2 ó 3 sistemas de disolventes diferentes.

Gradiente de elución; llamado también "programación de disolventes". En el gradiente de elución se desarrolla un cambio en - la composición de la fase móvil aumentando progresivamente la "fuerza" del disolvente. Al inicio del programa, la concentración del disolvente "débil" es mayor proporcionando de esta manera valores más grandes de  $k'$  mostrando así una mayor separación.

Progresivamente la fuerza del disolvente se va incrementando y los últimos picos reducen sus valores de  $k'$  proporcionando un - tiempo de análisis menor. Empleando ésta técnica es posible obtener un máximo en la resolución y en la sensibilidad. El gradiente de - elución puede ser lineal, cóncavo o convexo.

La ventaja principal de la técnica es que proporciona máxima resolución por unidad de tiempo, y una desventaja es que limita - el número de detectores que se pueden emplear.

Los requerimientos básicos para un sistema de gradiente de elución son:

- El gradiente debe ser reproducible.
- El flujo debe ser constante ya que éste afecta el tiempo de retención y por ende los resultados cuantitativos.

Selección de la fase móvil: al elegir una fase móvil se debe pensar en las siguientes condiciones:

- La muestra debe ser soluble en la fase móvil.
- No debe degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Debe ser compatible con el tipo de detector usado.
- Tener la polaridad conveniente para permitir una retención aceptable de la muestra. Es deseable en general un valor de  $k'$  entre 2 y 10.

Fase químicamente unida: los empaques de columnas más utilizados son los de fase estacionaria orgánica químicamente unida. Estos empaques son muy estables ya que la fase estacionaria está químicamente unida al soporte y es difícil que esta se pierda durante el uso. Tiene la ventaja que puede usarse en técnicas de gradiente de elución, pero tiene la desventaja de la pobre reproducibilidad de algunos empaques comerciales.

Los empaques mas estables son los siloxanos ( $\text{Si-O-Si-C}_n$ ) -

Estas fases son hidrolíticamente estables en un intervalo de pH entre 2 y 8.5.

El mecanismo de retención en este tipo de fases no está bien definido. Existe una teoría que dice que los solutos se adsorben en la superficie del recubrimiento orgánico y otra de que existe un fenómeno de partición de las moléculas del soluto entre las moléculas de la fase estacionaria y la fase móvil.

Cromatografía en fase inversa: la cromatografía en fase inversa utiliza una fase estacionaria no polar, usualmente químicamente unida de grupos alquil (hidrocarburos de 8 a 18 carbonos). La retención del soluto se incrementa al aumentar la longitud de la cadena alquílica o el % de carbón. También existe una relación entre el tamaño del grupo alquil y la capacidad de la muestra. Si aumenta el contenido de carbón de la fase estacionaria también aumenta la capacidad de la muestra.

La fase móvil usualmente está constituida por mezclas de metanol/agua donde la proporción de éstos debe encontrarse experimentalmente. Otros disolventes que pueden sustituir al metanol son: acetonitrilo y tetrahidrofurano.

En el caso de que el soluto contuviera moléculas ionizadas o ionizables, es necesario fijar el pH en la fase móvil. También -

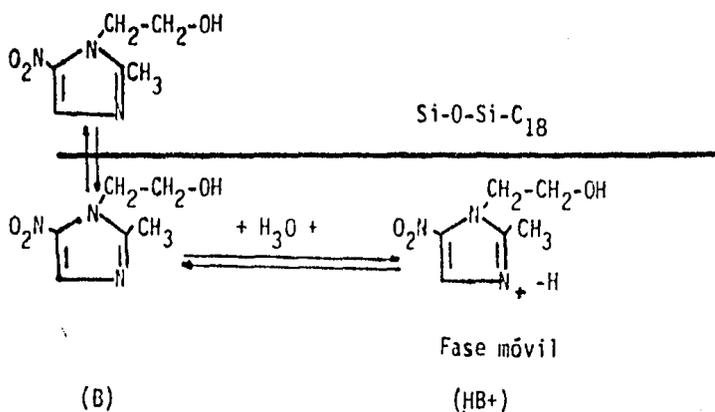
con el pH se logra modificar la selectividad entre moléculas neutras e ionizadas.

Equilibrios químicos secundarios: cuando en el sistema de separación se presentan equilibrios químicos secundarios que proporcionan una posibilidad adicional para el control de la distribución de los componentes de una muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil.

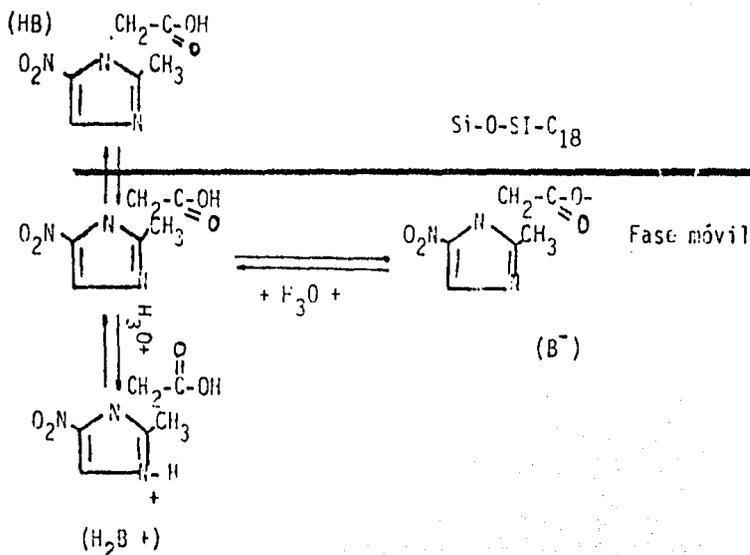
La conversión de un ácido orgánico o base en una sal soluble en agua, permite su extracción acuosa de la fase orgánica. De ésta manera las bases y los ácidos orgánicos pueden ser separados de compuestos orgánicos neutros.

A continuación se mostrará una figura donde se presentan los equilibrios químicos secundarios de las muestras de interés para este trabajo.

(B)

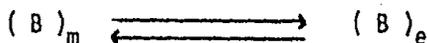


Distribución de metronidazol entre la fase estacionaria y la fase móvil y el equilibrio ácido-base en la fase móvil.



Distribución de metabolito entre la fase estacionario y la fase móvil y los equilibrios ácido-base en la fase móvil.

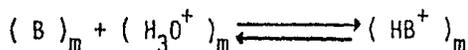
El aspecto cuantitativo de éste fenómeno puede describirse de la siguiente manera:



Con la constante de reparto  $K = (B)_e / (B)_m$

donde  $(B)_e$  es la concentración de B en la fase estacionaria.  $(B)_m$  es la concentración de B en la fase móvil.

Cuando la columna es no polar (octadesilsilano) como es éste caso, la fase móvil es polar (acuosa) y cuando los solutos tienen equilibrios ácido-base, se establecen equilibrios de disociación en la fase móvil.



Con la siguiente constante de disociación.

$$k_a = (H_3O^+)_m (B)_m / (HB^+)_m$$

Considerando otro término, la razón de distribución (D).

$$D = (B)_e / (B)_m + (HB^+)_m$$

De ésta ecuación y de la constante de acidez se obtiene la siguiente relación:

$$D = K (H_3O^+) / (H_3O^+) + k_a$$

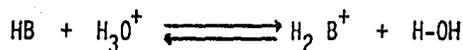
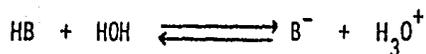
La ecuación anterior nos permite hacer las siguientes consideraciones:

Si  $(H_3O^+) \gg k_a$  entonces  $D = K$

Si  $(H_3O^+) = k_a$  entonces  $D = K/2$

Si  $(H_3O^+) \ll k_a$  entonces  $D = K$

Los equilibrios de la especie HB son similares.



Con sus respectivas constantes de reparto y acidez:

$$D = (HB)_e / (HB)_m$$

$$D = (HB)_e / (HB)_m + (H_2B^+)$$

$$D = K (H_3O^+) / (H_3O^+) + k_a$$

NOTA: la especie B representa al metronidazol y HB al ácido  
(2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético.

La retención también se ve afectada por la constante de reparto, la constante de acidez y el pH como se muestra a continuación:

$$V_R^- = V_R - V_M = K^- V_L \quad D = (HA)_e / (HA)_m$$

$$K_a = (H_3O^+)_m (A^-) / (HA)_m$$

$$K^- = (S)_e^t / (S)_m^t = (HA)_e / (HA)_m + (A^-)_m$$

$$K^- = (HA)_e / (HA)_m + K_a (HA)_m / (H_3O^+)_m$$

$$\log V_R^- = \log D V_L - \log \left( 1 + K_a / (H_3O^+) \right)$$

Si  $pH \ll pK_a$  entonces  $(H_3O^+) \gg K_a$  entonces  $1 \gg K_a / (H_3O^+)$

$$\log V_R^- = \log D V_L - \log 1 = \text{constante.}$$

Si  $pH \gg pK_a$  entonces  $(H_3O^+) \ll K_a$  entonces  $1 \ll K_a / (H_3O^+)$

$$\log V_R^- = \log D V_L - \log \left( K_a / (H_3O^+) \right)$$

$$\log V_R^- = \log D V_L + PK_a - pH$$

Detector U.V.: es el detector usado más ampliamente ya - que tiene una gran sensibilidad y permite obtener alta reproducibilidad.

La concentración del soluto en la celda de flujo se rela-- ciona con la fracción de luz transmitida a través de la celda. Esta relación sigue la Ley de Beer.

$$A = \log I_0 / I = bc$$

Estos detectores son apropiados para determinaciones por - gradiente de elución. La elección de los disolventes de la fase mó- vil no constituiye una limitación práctica ya que la mayoría de éstos no absorben en el intervalo ultravioleta más usado.

Las características de este detector se resumen a continuación:

- Tiene sensibilidad muy alta.
- Posee un buen intervalo lineal (aprox.  $10^5$ ).
- Se usan pequeños volúmenes.
- Es relativamente insensible a los cambios de flujo de la - fase móvil y a los cambios de temperatura.
- Fácil de operar.
- Es muy confiable.
- No destruye la muestra.

- Variación grande en la respuesta para solutos diferentes.
- Es factible hacer gradiente de elución.
- La longitud de onda puede seleccionarse.

Sensibilidad: se define como la relación que existe entre la señal generada y la cantidad de muestra que genera dicha señal. Esta propiedad nos proporciona información acerca de la cantidad mínima detectable ya que ésta puede estar severamente limitada por el ruido.

Ruido: es la variación de la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra. Las señales del ruido aparecen en forma aleatoria afectando el límite de detección. Algunas fuentes del ruido son inherentes al detector o a los cambios de temperatura, la composición de la fase móvil, el flujo y la presión.

Linealidad del detector: el intervalo lineal del detector se puede definir como la relación entre la concentración máxima y mínima respecto a las cuales la respuesta es lineal, es decir la señal es directamente proporcional a la cantidad de muestra.

Cantidad mínima detectable: se considera como la concen-  
tración o masa de soluto que pasa a través del detector por unidad -  
de tiempo que proporciona una señal de razón 2 respecto al ruido.  
Generalmente se considera como la mínima concentración o masa de so-  
luto que puede ser detectada adecuadamente. Este parámetro es depen  
diente del sistema cromatográfico.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

I. EQUIPO.

- . Cromatógrafo de líquidos con detector de longitud de onda fija u.v - visible Modelo 440 y programador de disolventes Modelo 660, Waters Ass.
- . Registrador Omniscrite, Houston Instruments.
- . Integrador Hewlett-Packard Modelo 3390 A
- . Columna de acero inoxidable uBondapack C<sub>18</sub> de 10 µm, 25 cm de longitud y 0.2 cm de diámetro, Waters Ass.
- . Precolumna uBondapack C<sub>18</sub> Waters Ass.
- . Potenciómetro Beckman Century.
- . Espectrofotómetro Beckman DU-7.
- . Agitador vortex Maxi-mix, Thermolyne.
- . Baño ultrasónico.

II. MATERIAL Y REACTIVOS.

- . Microjeringa de 25 µl Hamilton.
- . Microjeringa de 100 µl Hamilton.
- . Metronidazol, proporcionado por Laboratorios Syntex, S.A. Lote RF-15A.
- . Acido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético; obtenido y -

purificado en el Departamento de Química Farmacéutica y -  
Productos Naturales de la División de Estudios de Posgrado  
de la Facultad de Química UNAM. Proporcionado por la Dra.  
Ofelia Espejo.

- . Plasma obtenido de voluntarios.
- . Acido clorhídrico 0.1 N Merck.
- . Fosfato monobásico de sodio R.A. Baker.
- . Fosfato dibásico de sodio R.A. Baker.
- . Acido fosfórico R.A. Baker.
- . Acetato de sodio R.A. Merck.
- . Acido acético R.A. Baker.
- . Acido tricloroacético Baker, solución al 5%.
- . Hidróxido de sodio 0.5 N Merck.
- . Cloroformo R.A. Merck.
- . Acetonitrilo Uvasol Merck.
- . Metanol Uvasol Merck.

### III. DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.

III.1 Absorción del metronidazol y del ácido (2-metil-5-nitro -imidazolil-1) acético en el intervalo ultravioleta. Se obtuvieron los espectros de absorbancia en función de la longitud de onda, en la región de 400 a 200 nm. Para ello se prepararon soluciones de 50  $\mu\text{g/ml}$ , de cada uno de los compuestos en ácido clorhídrico 0.1 N. Las condiciones de operación del espectrofotómetro fueron las siguientes: abertura 0.2 nm, velocidad de barrido 100 nm/min, espesor de la celda 1 cm.

### III.2 Selección de las condiciones de elución cromatográfica:

En todos los casos se utilizó la columna de fase inversa - descrita. Se estudió el comportamiento de los solutos con las fases móviles que se describen en la Tabla I, con un flujo de 1 ml/min, e inyectando 10  $\mu\text{l}$  de soluciones de 50  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de ellos en ácido clorhídrico 0.1 N. La detección se realizó a 280 nm, con una amplificación de 0.1 AUFS. En cada caso se determinan los valores de  $k'$ ,  $\eta$ , y N (factor de capacidad, simetría y número de platos teóricos) para ambos compuestos.

TABLA I

1.	Metanol : Agua (1% ácido acético) De 10% a 90% de metanol en sistema isocrático.
2.	Solución amortiguadora de acetatos pH=4.7 : Metanol De 10% a 60% de metanol en sistema isocrático.
3.	Solución amortiguadora de fosfatos pH=5.5 : Acetonitrilo 85 : 15 (14), (12)
4.	Solución amortiguadora de fosfatos pH=5.5 : Metanol De 5% a 90% de metanol en sistema isocrático.
5.	Solución amortiguadora de fosfatos pH=4.5: Metanol 98 : 2 ; 95 : 5 ; 85 : 15 en sistemas isocráticos.
6.	Solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5: Metanol 95:5 : 85:15 en sistemas isocráticos.

### III.3 Elección de un gradiente de composición de la fase móvil:

Con el objeto de mejorar la calidad de los cromatogramas - de la mezcla de los compuestos, se estudiaron los gradientes de composición que se indican en las Tablas II y III. Las demás condiciones fueron las mismas que en III.2.

TABLA II

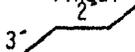
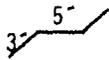
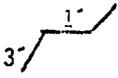
% Metanol	Tiempo (minutos)	Curva
2-50	20	lineal
2-50	10	lineal
2-15	15	lineal
2-15	25	lineal
2-30	15	lineal
2-30	20	3" 
2-15	15	3"  5"

TABLA III

% Tampon de fos fatos pH = 5.5	Tiempo (min)	Curva
98-50	15	lineal
98-80	25	lineal
98-80	15	lineal
98-80	15	4" 
98-80	15	3"  1"

### III.4 Cantidad mínima detectable.

Para la determinación de la cantidad mínima detectable, se inyectaron 5  $\mu$ l de soluciones de metronidazol y su metabolito en ácido clorhídrico 0.1 N de las siguientes concentraciones:

Metronidazol: 15  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, y 1  $\mu$ g/ml.

Metabolito: 20  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, y 1  $\mu$ g/ml.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Gradiente de elución de 98 - 80% de amortiguador de fosfatos pH=5.5 y metanol en 15 minutos con una curva lineal.

Flujo de 1 ml/min, detección a 280 nm, con una amplificación de 0.05 AUFS, atenuación 8, velocidad de la carta a 0.5 cm/min.

La cantidad mínima detectable fue considerada como la mínima concentración que pudo ser detectada adecuadamente.

### III.5 Linealidad de la respuesta.

Para determinar el intervalo lineal de respuesta, se inyectaron 5  $\mu$ l de soluciones de los compuestos en ácido clorhídrico 0.1 N de las siguientes concentraciones:

Metronidazol: 5,10,40,60,80,100,200,320,400 y 600  $\mu$ g/ml

Metabolito: 5,10,40,60,80,100,200,320,400 y 600 µg/ml

Utilizando las mismas condiciones de operación que el III.4

#### IV. PREPARACION DE MUESTRAS PLASMATICAS.

##### IV.1 Extracción del metronidazol.

Se realizó de acuerdo a la referencia (19) que consiste en lo siguiente:

- a) A 1 ml de plasma se le adiciona 1 ml de ácido tricloroacético al 5%, se agita vigorosamente y se centrifuga.
- b) El sobrenadante se separa y se le ajusta el pH a un valor de 9.0 con hidróxido de sodio 0.5 N.
- c) Se extrae 4 veces con 6 ml de cloroformo agitando durante 2 minutos, se recolectan los extractos y se evaporan.
- d) El residuo se reconstituye con 2 ml de ácido clorhídrico - 0.1 N.
- e) Finalmente se inyectan 25 µl de cada solución reconstituida en el cromatógrafo.

Para comprobar la efectividad del método en la determinación de metronidazol en plasma, se preparó una muestra de plasma con 5 µg/ml de metronidazol adicionado in vitro.

Para esto se tomaron 50  $\mu$ l de una solución en cloroformo - de metronidazol en concentración de 0.1 mg/ml. En un tubo se evaporó el cloroformo con ayuda de una baño de vapor y una fuente de nitrógeno y se adicionó 1 ml de plasma, agitando enérgicamente. La muestra así tratada se preparó siguiendo el procedimiento de extracción descrito. Simultáneamente se extrajo una muestra de plasma a la que no se le adicionó metronidazol. De las soluciones finales se inyectaron 25  $\mu$ l al sistema cromatográfico, utilizando las condiciones descritas en III.4.

#### IV.2 Extracción del ácido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1)acético.

La extracción se realizó de la siguiente manera:

- a) Se toma 1 ml de plasma y se transfiere a un tubo de ensayo, se adiciona 1 ml de ácido tricloroacético al 5%, se agita vigorosamente y se centrifuga.
- b) Se prepara el sobrenadante y se le ajusta a pH 9 con hidróxido de sodio 0.5 N. El metabolito ácido está en forma disociada.

Se lava con 10 ml de cloroformo, desechándose después la fase orgánica.

- c) Se inyectan 5  $\mu$ l de esta solución en el cromatógrafo.

De igual manera que en el caso del metronidazol, se preparó una muestra de plasma adicionado de la sustancia en cuestión.

Se utilizaron las condiciones descritas en III.4.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

### Elección del Detector.

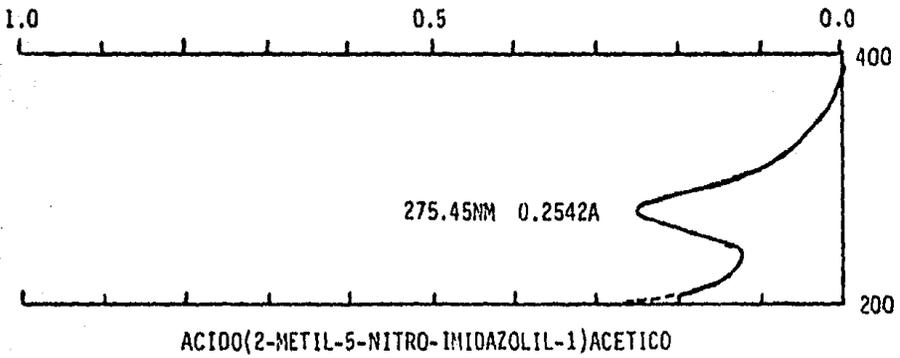
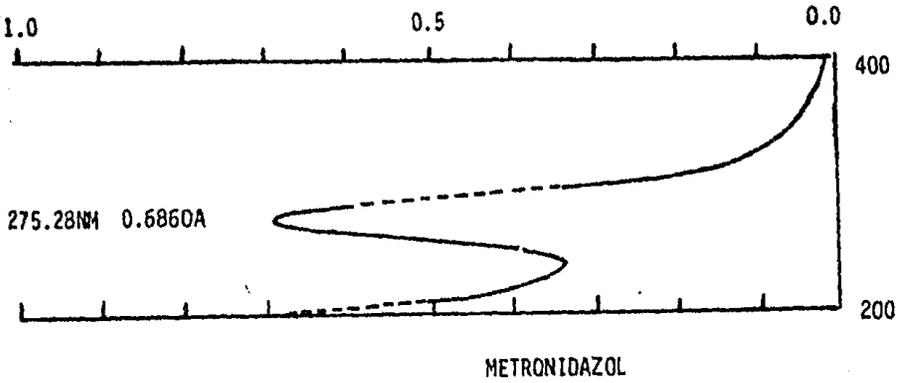
En la figura 1 se encuentran los espectros de absorción en la región de ultravioleta del metronidazol y su metabolito. Los dos compuestos presentan un máximo de absorción a 276 nm, lo que coincide satisfactoriamente con el valor (272 nm) informado para el metronidazol. Los coeficientes de absorción calculados son 13.72 y -6.084 para (I) y (J) respectivamente. Estos resultados muestran que es posible utilizar satisfactoriamente el detector de u.v. disponible, de longitud de onda fija de 280 nm. El uso del detector u.v. tiene ventajas, pues además de su estabilidad y bajo nivel de ruido permite utilizar gradientes de elución sin problemas.

### Elección de la Columna.

Como se puede observar, en los datos mostrados en la página 13, en los trabajos publicados para la determinación de metronidazol por Cromatografía de líquidos de alta resolución, se han utilizado en todos los casos columnas de fase inversa químicamente unida. Esto se debe a la solubilidad de (I) en soluciones acuosas o hidrógenas en medio ácido, con lo que es posible trabajar con este tipo de columnas. Ya que (J) también es soluble en estos medios, se decidió utilizar una columna de estas características y aprovechar las ventajas de este tipo de cromatografía.

FIGURA 1

Espectros de absorción ultravioleta



### Elección de la fase móvil.

Una vez elegida la columna es necesario seleccionar la fase móvil apropiada. Esto es, que debemos obtener una retención adecuada ( $2 \leq k' \leq 10$ ) de los compuestos de interés, con selectividad suficiente ( $\alpha > 1$ ) para resolver adecuadamente el problema ( $R > 1$ ). En el caso de fase inversa, es frecuente utilizar mezclas Agua/Metanol además de tener propiedades cromatográficas adecuadas son, dentro de los disolventes para cromatografía líquida moderna, los de menor costo. La variación de la composición de mezclas de un disolvente "fuerte" (Metanol) y un "débil" (Agua) permite manipular en un amplio intervalo la retención de los solutos. Si una vez que se ha obtenido una retención apropiada la selectividad no es suficiente, deberá cambiarse el disolvente fuerte por otro con otras interacciones específicas. Por ejemplo el metanol puede cambiarse por acetonitrilo o tetrahidrofurano.

Adicionalmente, en el caso del metronidazol y de su metabolito es necesario controlar sus equilibrios ácido-base que se presentan como equilibrios químicos secundarios. Esto es posible fijando el valor del pH de la fase móvil. Por esta razón se intentó determinar los valores de  $pK_a$ , que no se encuentran informados, a partir de los datos de valoraciones potenciométricas y por cromatografía líquida moderna. Sin embargo las curvas de titulación obtenidas no mos--

traron un punto de equivalencia lo suficientemente cuantitativo para realizar la determinación con confiabilidad, así mismo los tr no mos traron diferencias apreciables.

Así se decidió estudiar el comportamiento cromatográfico a diferentes valores de pH.

En cada uno de los sistemas estudiados (Tablas I, II y II) se encontraron los valores de  $k'$ ,  $\eta$  y N que se muestran en las Ta---blas A, B, C y D. Los valores de N (número de platos teóricos) no se determinaron para todos los casos, solamente para aquellos que de acuerdo con los otros parámetros resultaban prácticos.

TABLA A

Metanol : Agua con 1% de ácido acético.					
	Metronidazol		Metabolito		
% Metanol	$k'$	$\eta$	% Metanol	$k'$	$\eta$
90	0.24	2.1	90	0.10	0.33
80	0.22	2.5	80	0.10	3.33
70	0.27	2.35	70	0.06	2.7
60	0.29	2.05	60	0.00	1.8
50	0.49	2.00	50	0.00	2.33

Los valores obtenidos de  $k'$  para metronidazol y su metabolito ácido, son demasiado pequeños, no se separan del volumen muerto, además no hay resolución entre las dos señales. Esto significa que los equilibrios del tipo  $B + H_3O^+ = HB^+ + HOH$  para el metronidazol - y  $HB + H_3O^+ = H_2B^+ + HOH$  para el metabolito, en la fase móvil, están desplazados hacia la derecha, impidiendo así su retención en la fase estacionaria. La simetría no es adecuada para ninguno de los dos casos. Esta simetría se debe quizá a la fuerte interacción entre las moléculas del soluto que se encuentran ionizadas y los grupos libres Si-OH de la fase estacionaria o bien que puede coexistir la especie HB. Los cambios en la proporción de metanol casi son independientes de  $k'$  ya que pueden caer dentro del error experimental a excepción - del metronidazol a un 50% de metanol donde sufre un cambio de aproximadamente de 0.2 unidades.

TABLA B

Solución amortiguadora de acetatos pH=4.7 : Metanol				
Metronidazol			Metabolito	
% Metanol	$k'$	$\eta$	$k'$	$\eta$
90	0.00	1.5	0.00	2.0
80	0.00	2.0	0.00	2.0
70	0.00	1.5	0.00	2.17
60	0.21	2.67	0.00	2.31
50	0.24	3.33	0.00	4.00

En este caso también se observa que las señales del metronidazol, aún tienen un valor de  $k'$  muy parecido al volumen muerto - sin importar la proporción de metanol, lo cual indica que a este valor de pH la especie que predomina es  $\text{HB}^+$ . La señal no es simétrica para ninguno de los casos de variación de metanol en la fase móvil.

Observando los resultados del ácido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético, también se deduce que predomina la especie  $\text{H}_2\text{B}^+$  ya que la señal se obtiene en el volumen muerto. Todas las señales presentan asimetría debido quizá a la interacción de la especie  $\text{B}^-$  y - los grupos Si-OH libres de la fase estacionaria.

TABLA C

Solución amortiguadora de fosfatos pH=5.5 : Metanol						
Metronidazol			Metabolito			
% Metanol	$k'$	$\eta$	N	$k'$	$\eta$	N
90	0.12	1.29	451	0.00	5.00	-
80	0.14	1.49	312	0.00	1.89	130
70	0.16	3.00	218	0.00	1.96	254
60	0.18	4.60	203	0.00	3.88	190
50	0.24	2.67	1812	0.00	2.25	1594
40	0.24	3.50	231	0.00	2.97	133
20	1.00	1.75	2381	0.14	2.50	1156
15	2.22	1.27	3298	0.25	2.00	1093
11.11	4.25	1.5	6359	0.64	1.30	1586
5	10.21	1.09	4719	1.46	1.20	1919
2	-	-	-	2.09	0.86	2759

Los valores de  $k'$ ,  $\eta$  y N del metronidazol a un 2% no se obtuvieron ya que resultaba impráctico porqué el tiempo de análisis era muy grande. Dentro de estos valores a pH=5.5 ya que se observan cambios en el factor de capacidad y simetría por lo que se deduce que ambas sustancias no están completamente como las especies  $HB^+$  y  $H_2B^+$ .

Con los datos obtenidos se construyó una gráfica del factor de capacidad contra % de metanol, ver Figura II y III. Se observa que los valores más adecuados de  $k'$  para ambas sustancias no coinciden a la misma proporción de metanol en la fase móvil. El valor óptimo para metronidazol se encuentra entre un 5 y 15% de metanol y para el metabolito está por debajo de 2%, lo que sugiere que en un sistema isocrático no lograríamos una separación adecuada de ambas sustancias en un tiempo razonable, por lo que fue necesario buscar un sistema de programación de disolventes.

En cuanto se refiere a la asimetría del metronidazol, se observa un aumento de ésta a medida que disminuye la proporción de metanol en el sistema de elución, hasta llegar a un 60%, ya que después las señales son más simétricas. El valor más adecuado de simetría para ésta sustancia se encuentra entre un 5 y 15% de metanol.

En el caso del ácido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético se observan valores muy heterogéneos, pero la mejor proporción para lograr una buena simetría está entre 2 y 5% de metanol.

La máxima eficiencia en éstas condiciones de operación es a un 11.11% de metanol para el metronidazol y a un 2% para el metabolito. Ver Figuras IV a XI.

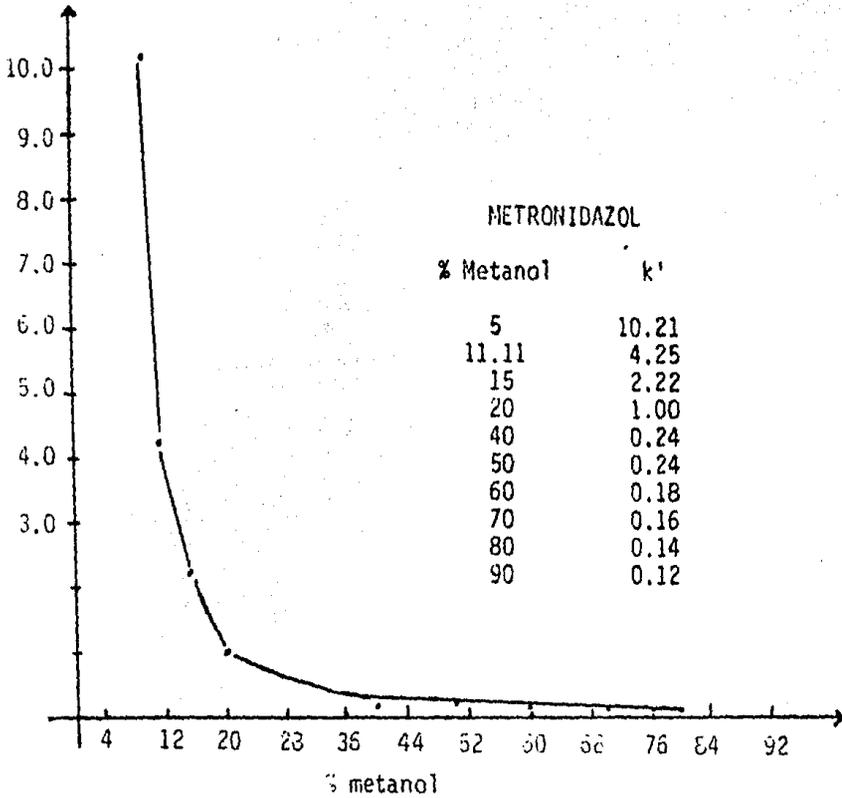


FIGURA II. Gráfica de  $k'$  de metanol vs  $k'$

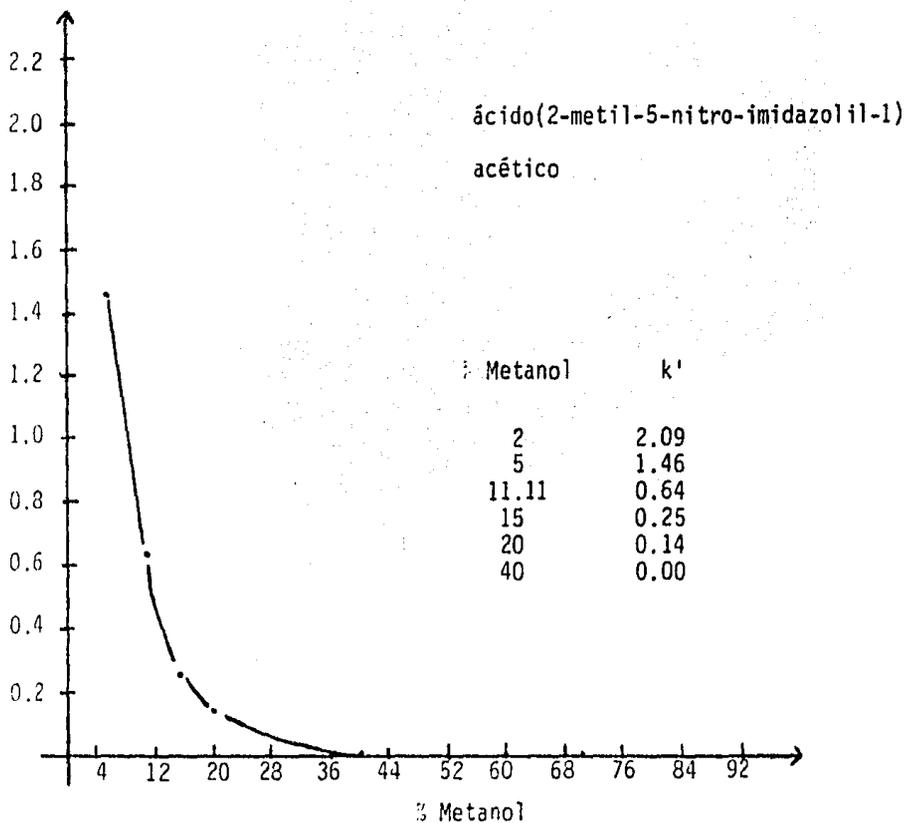


FIGURA III. Gráfica de % metanol vs k' para el metabolito ácido.

FIGURA IV

11.11 Metanol:  
88.89 Amortiguador de  
fosfatos pH = 5.5

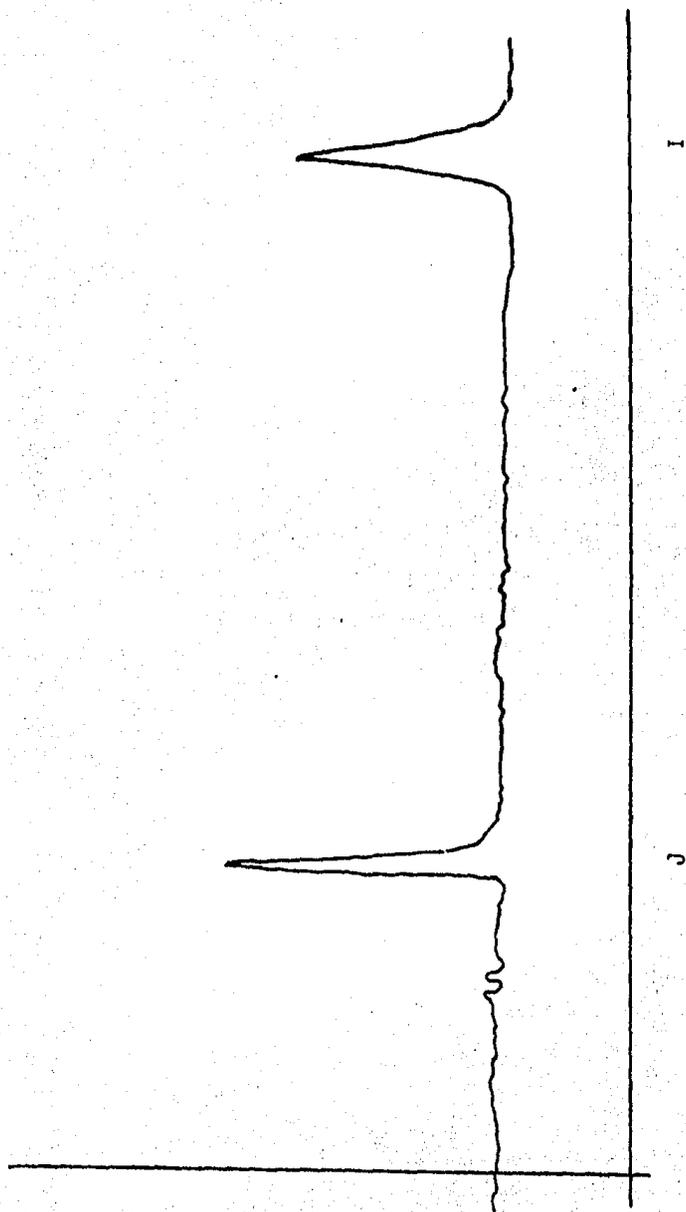
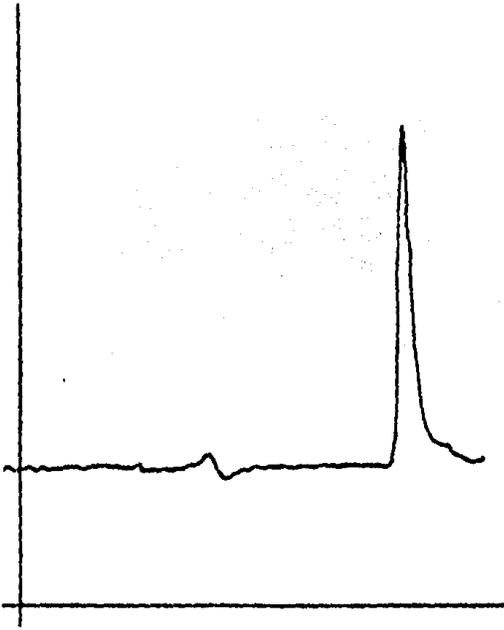
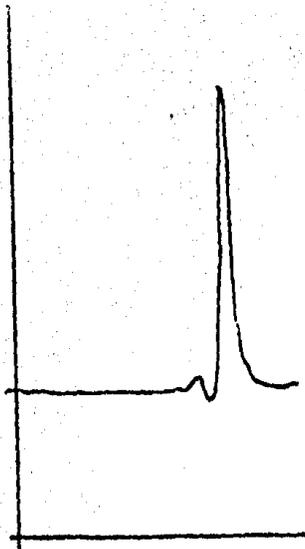


FIGURA V

20% Metanol:80% Amortiguador  
de fosfatos pH = 5.5



1

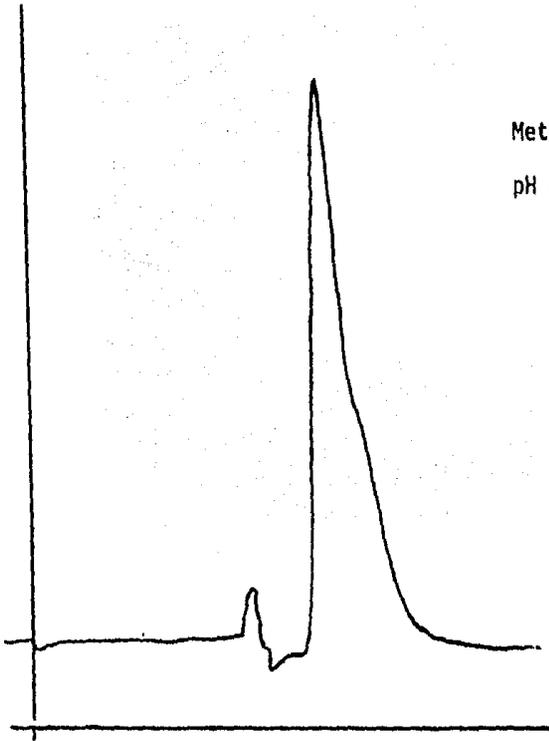


1

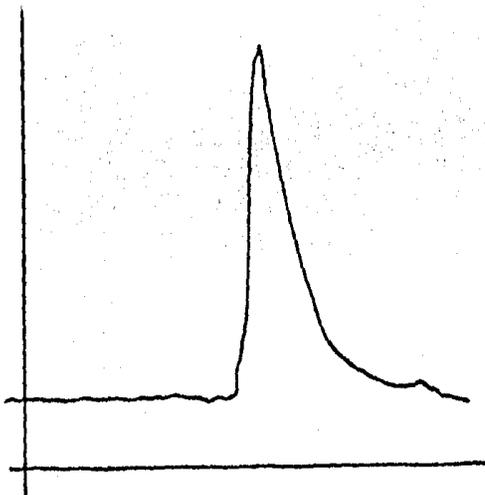
FIGURA VI

Metanol : Amortiguador fosfatos

pH = 5.5 40:60



I



J

FIGURA VII

Metanol : Amortiguador fosfatos pH = 5.5 50:50

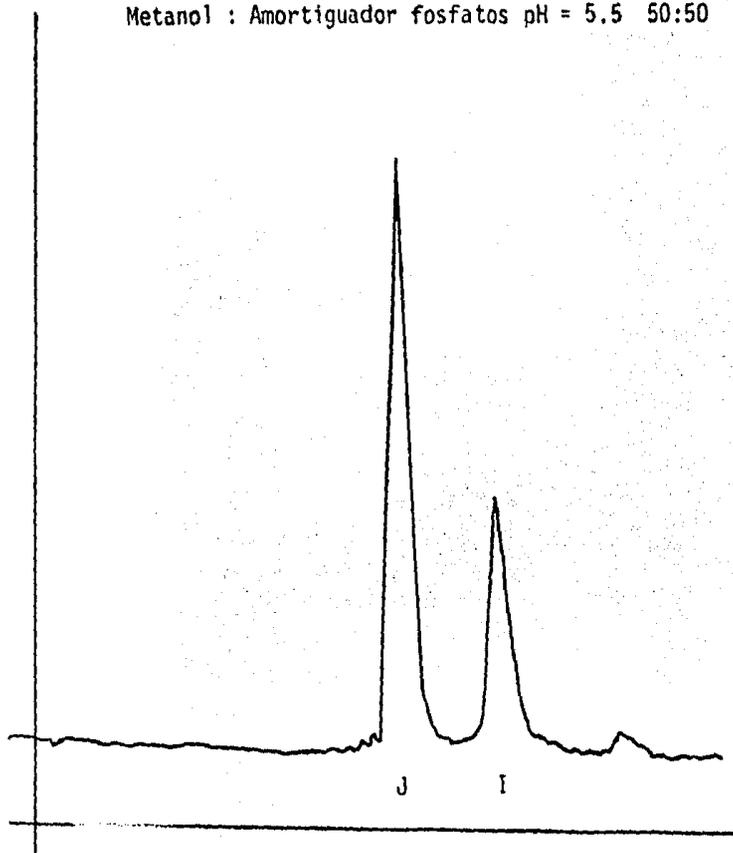


FIGURA VIII

Metanol : Amortiguador fosfatos

pH = 5.5 60:40

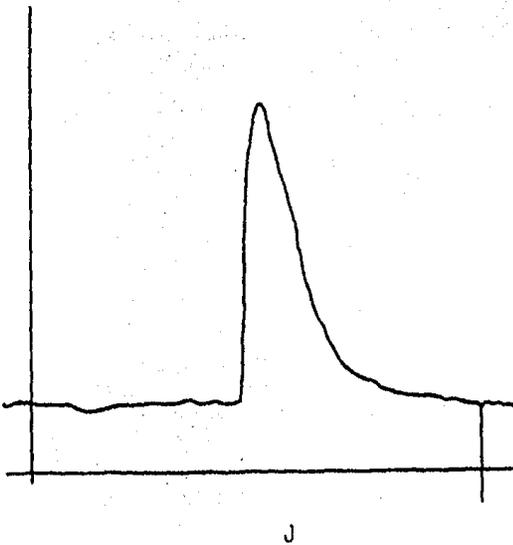
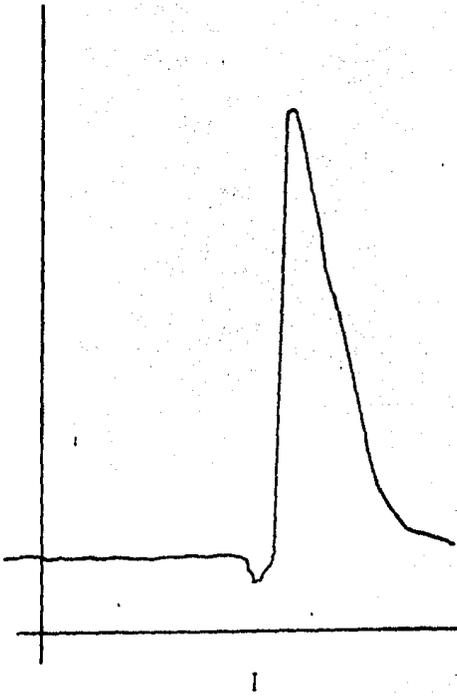
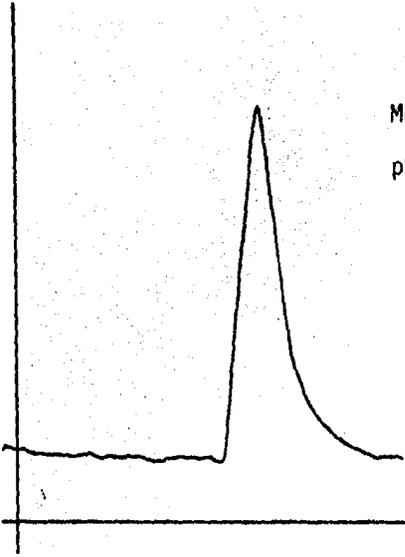


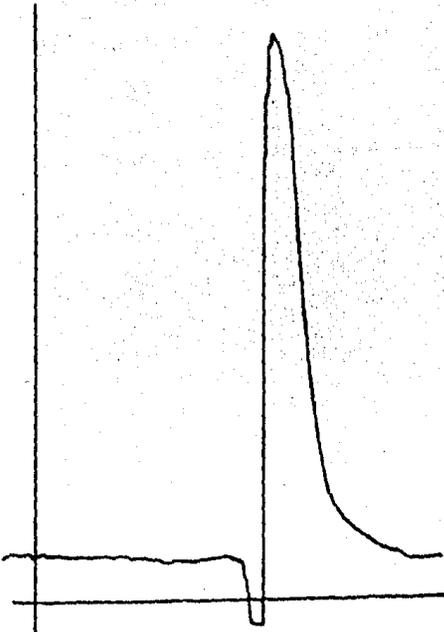
FIGURA IX

Metanol : Amortiguador fosfatos

pH = 5.5      70:30



J



I

FIGURA X

Metanol : Amortiguador fosfatos  
pH = 5.5 30:20

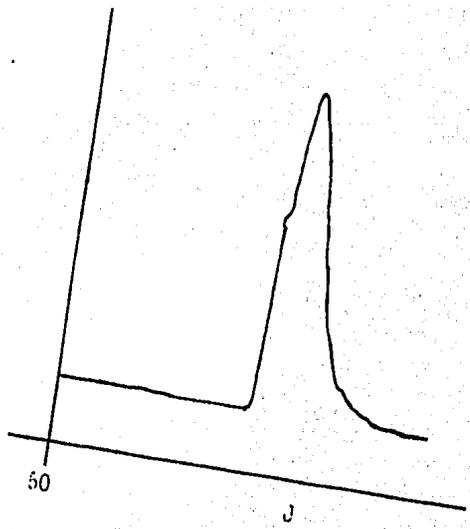
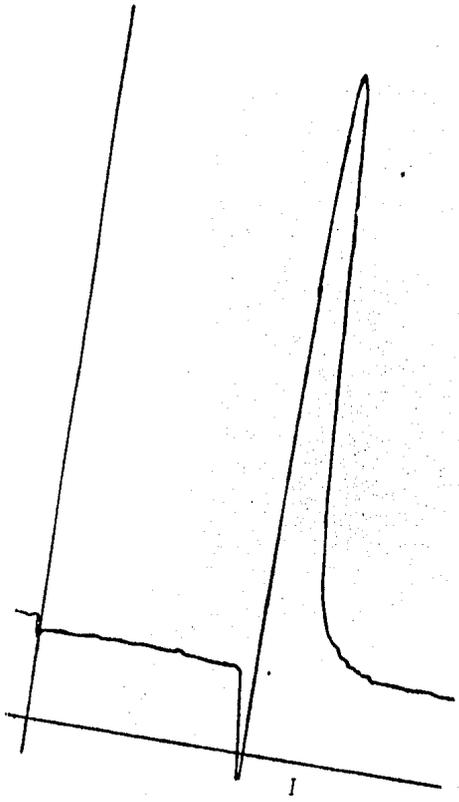
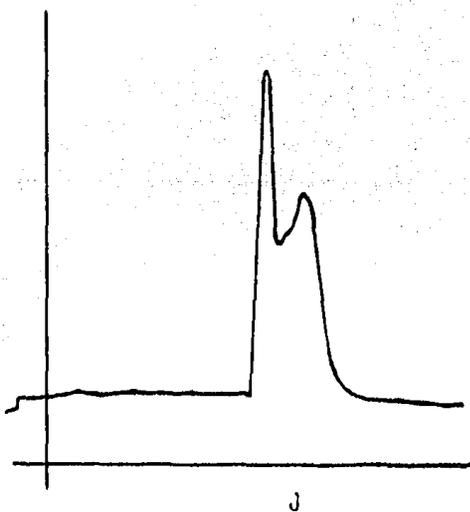
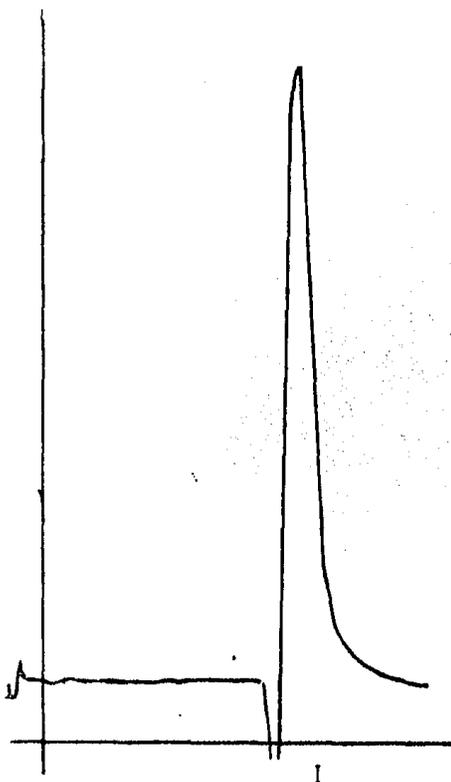


FIGURA XI

Metanol : Amortiguador fosfatos

pH=5.5      90:10



Con el objeto de lograr una mejoría en el factor de capacidad, simetría y eficiencia en las señales de ambas sustancias, se hicieron modificaciones en el pH de la solución amortiguadora de la fase móvil. Los pHs estudiados fueron 4.5 y 6.5.

En la siguiente tabla se anexarán algunos resultados que ya se mostraron antes (con solución amortiguadora a pH=5.5) para hacer más fácil la comparación en los tres valores de pH.

TABLA D

Solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5 y 6.5 : Metanol.							
% Amortiguador	pH	Metronidazol			Metabolito		
		k'	$\eta$	N	k'	$\eta$	N
85	4.5	2.25	1.96	2763	0.59	2.00	1892
	5.5	2.22	1.27	3298	0.25	2.00	1093
	6.5	2.68	1.36	2500	0.61	1.63	3600
95	4.5	-	-	-	1.26	2.06	2787
	5.5	10.21	1.09	4719	1.46	1.20	1919
	6.5	-	-	-	2.55	1.95	4056
98	4.5	-	-	-	2.04	2.02	3556
	5.5	-	-	-	2.09	0.86	2759
	6.5	-	-	-	-	-	-

Los valores que no aparecen a un 95 y 98% es porqué resultaba poco práctico obtenerlos ya que los resultados del metabolito no mostraron ser mejores que a pH=5.5, por lo tanto si una señal no es adecuada, entonces la cuantificación simultánea no resulta.

Analizando los valores obtenidos de metronidazol, se observa que el factor de capacidad casi no sufre ningún cambio a un 85% de solución amortiguadora, pero sí sucede con la simetría de la señal, el valor que más se acerca al valor teórico más adecuado es a pH=5.5. A este mismo valor de pH se observa una mejor eficiencia de la señal.

También a un 85% de solución amortiguadora se estudió al metabolito, la mejor eficiencia y simetría de la señal se encontró a pH de 6.5.

Con 95% de solución amortiguadora de fosfatos se encontró una muy pequeña mejoría de  $k'$  del metabolito a un pH de 6.5 pero que no se repitió con la simetría la cual resultó ser mejor a pH=5.5. La eficiencia resultó ser mejor a pH 6.5.

A un 98% de solución buffer,  $k'$  casi no varió, la simetría más adecuada se encontró a un pH de 5.5, lo que no sucedió con la eficiencia que se encontró a pH 4.5.

Al comprobar que a pH de 5.5 se obtienen los mejores resultados, además de que el metronidazol y su metabolito no se eluyen en

la misma composición de la fase móvil, fue necesario probar algunos sistemas de programación de disolventes para así obtener un tiempo - razonable de análisis.

Los sistemas de programación probados pueden observarse en las Tablas II y III.

En todos los sistemas de programación no se observó una me jo ria notable con respecto a los sistemas isocráticos ya que todo pa re cia indicar que se requería de un cambio grande en la proporción - de los disolventes y en un tiempo muy corto. Sin embargo, se encon tró un sistema de programación de disolventes que resolvía el proble ma y que además eluía un pico adicional que quizá es una impureza - que contiene el metabolito. En éste sistema, la "corrida" termina - en aproximadamente 7 minutos lo cual resulta conveniente para un aná l i s de rutina. Un cromatograma se muestra en la Figura XII.

Los valores de  $k'$  aparente, simetría y eficiencia obtenidos son:

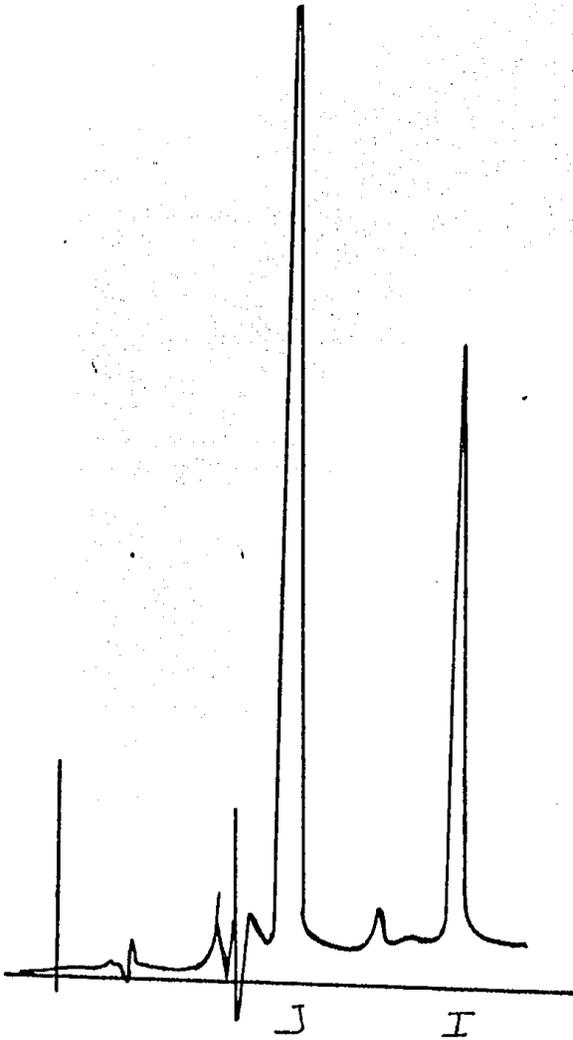
Metronidazol			Metabolito		
$k'$	$\eta$	N	$k'$	$\eta$	N
5.9	1.2	3653	3.0	1.07	1267

Estos parámetros nos indican que éste sistema de programación resulta conveniente ya que su simetría y eficiencia son buenas, además de que el factor de capacidad de ambas sustancias permiten un tiempo de análisis muy corto.

El sistema de elución es el siguiente:

98-80% de solución amortiguadora de fosfatos pH=5.5 con Metanol en 15 minutos con una curva lineal.

Figura XII



### Cantidad mínima detectable.

La cantidad mínima detectable para ambas sustancias es de 5 ng en las condiciones del método desarrollado, a una atenuación de 8 y una sensibilidad de 0.05 AUFS. No se usó una atenuación menor por inestabilidad de la línea base, por lo que mínimo detectable se ve limitado por la estabilidad del sistema.

La cantidad mínima detectable se encontró al inyectar 5  $\mu$ l de distintas soluciones a diferentes concentraciones y que se detectan adecuadamente. De ahí se deduce que si 5 ng están en 5  $\mu$ l entonces tenemos 1 ng/ $\mu$ l y por lo tanto se puede cuantificar 1  $\mu$ g/ml de plasma.

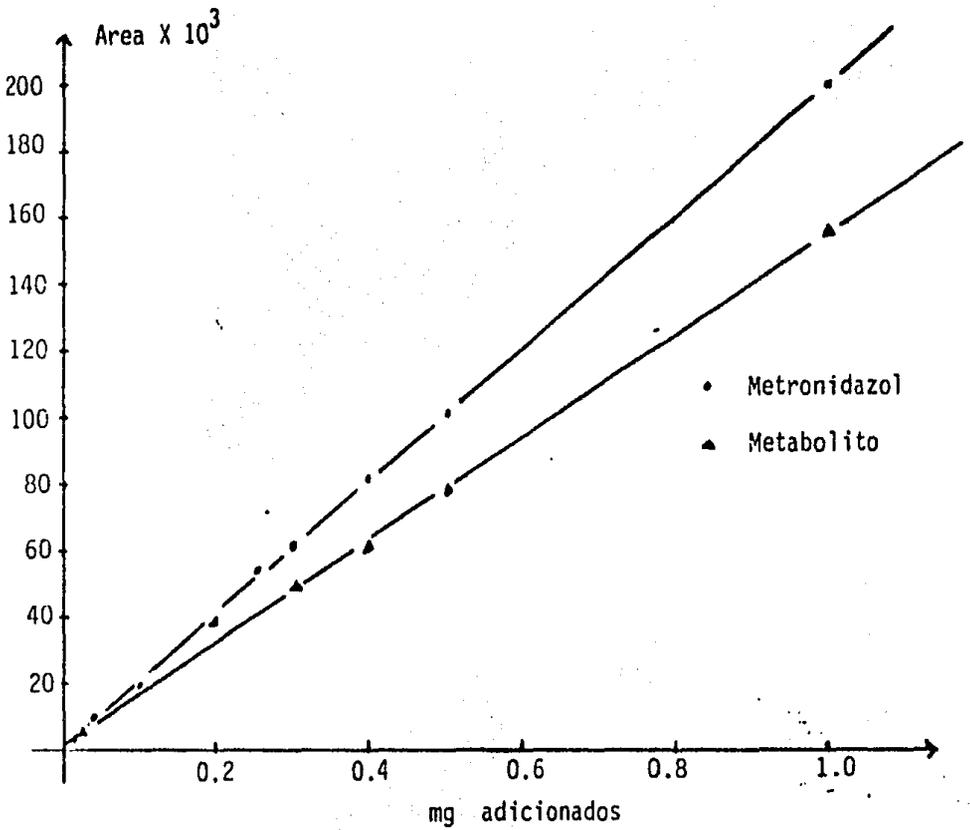
### Linealidad de la respuesta.

En las Tablas IV y V se muestran los resultados de la curva de concentración contra área, lo cual demuestra que la curva es lineal en ese intervalo de concentración. También se proporcionan los valores de la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación.

Los resultados que se muestran son el promedio de tres valores.

En la Figura XIII se muestra la curva de linealidad para ambas sustancias.

FIGURA XIII



GRAFICA III.- Linealidad de la respuesta

TABLA IV

Metronidazol	
$\mu\text{g}$	Area $\times 10^3$
0.02	3.638
0.05	9.531
0.10	19.736
0.20	39.574
0.25	50.487
0.30	61.811
0.40	82.048
0.50	101.040
1.00	205.541
<p>Factor de correlación 0.99995</p> <p>Pendiente = <math>206.0887 \times 10^3</math></p> <p>Intercepto = <math>0.8627 \times 10^3</math></p>	

TABLA V

Acido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético	
$\mu\text{g}$	Area x $10^3$
0,025	4.678
0.05	9.029
0.20	30.872
0.30	49.270
0.40	61.308
0.50	78.350
1.00	157.078
<p>Factor de correlación = 0.9998</p> <p>Pendiente = <math>155.98 \times 10^3</math></p> <p>Intercepto = <math>0.648063 \times 10^3</math></p>	

### Métodos de extracción en plasma.

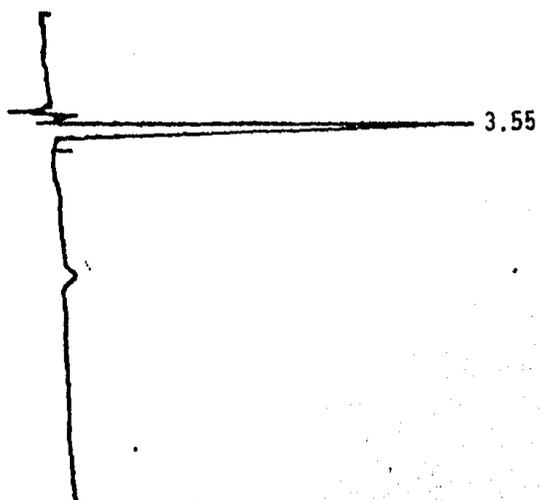
Confirmando las propiedades ácido-base del metronidazol y de su metabolito, la extracción se realiza ajustando el pH a un valor de 9.0 (12). A éste pH la especie que predomina es la neutra en el caso del metronidazol y para el caso del metabolito ácido es la especie desociada  $HB^-$  de ahí que se desprende que el metronidazol se cuantifique en la fase orgánica y el metabolito en la fase acuosa.

Esta extracción resulta difícil ya que la extracción sí se puede realizar en la misma muestra de plasma pero inyectando la fase acuosa y la fase orgánica.

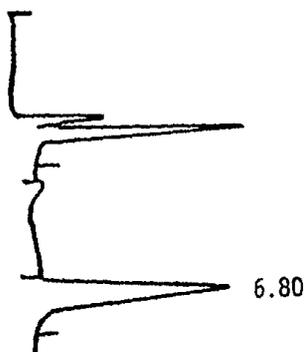
El sistema de elución resultó adecuado para cuantificar ambas sustancias sin interferencias de especies del plasma.

FIGURA XIV

Extracción de metronidazol en plasma.



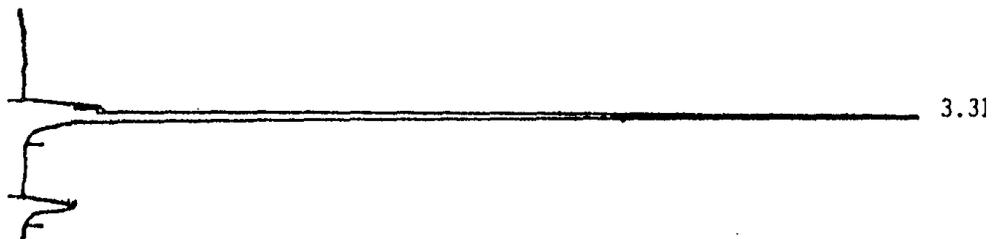
Solución blanco



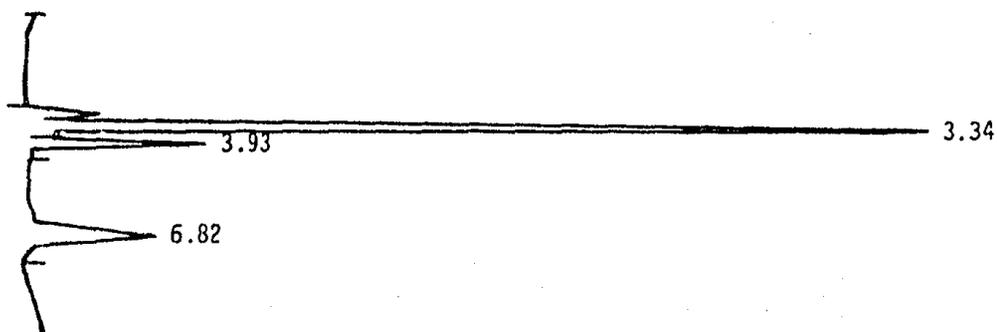
Muestra

FIGURA XV

Extracción del metabolito en plasma



Solución blanco



Muestra

## **V. CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se desarrolló un método para cuantificar metronidazol y uno de sus metabolitos por cromatografía de líquidos de alta presión, determinando la cantidad mínima detectable y la linealidad de la respuesta.

Y se llegaron a las siguientes conclusiones:

- La separación y cuantificación simultánea se realiza empleando un gradiente de elución de 98-80% solución amortiguadora de fosfatos pH=5.5 y metanol en 15 minutos y con una curva lineal a 280 nm y un flujo de 1 ml/min, mostrando así valores adecuados de simetría, eficiencia y factor de capacidad.

La cantidad mínima detectable es de 5 ng/ml de plasma para ambas sustancias, además el método es lineal en un rango de 0.02 a 1.0 µg para ambas sustancias.

- La muestra del ácido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético tiene como contaminantes al metronidazol y otra sustancia que no fue identificada.
- Empleando las curvas de % metanol vs  $k'$  se pueden elegir las condiciones de la elución o separación que convenga en determinado momento, tanto para el metronidazol como para el ácido (2-metil-5-nitro-imidazolil-1) acético, obteniendo la ventaja que podemos contar con algunas condiciones

de separación y cuantificación de dicho metabolito después de no tener conocimiento de ninguna información en la literatura.

- Los equilibrios químicos secundarios ácido-base juegan un papel importante en esta separación ya que contamos con dos especies donde una de ellas es una base y la otra es un anfolito observándose la dependencia del tiempo de retención con el valor de pH y del pka.
- El método de extracción en plasma es selectivo al pH de extracción usado, esto beneficia la especificidad del método ya que también el sistema de elución es selectivo para ambas sustancias no mostrando interferencias del plasma en el cromatograma.
- Este trabajo además presenta la ventaja de que se realizó una comparación gruesa de las diferentes técnicas de análisis del metronidazol con el objeto de comparar ventajas y desventajas entre ellos y así elegir la adecuada a nuestras necesidades y alcances.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. A. Korolkovas, J.H. Burckhalter  
Compendio esencial de Química Farmacéutica. Editorial Reverté. 1978.
2. Ivan H. Stockley.  
Pharmacy international vol. 4, No. 1 1983 (37)
3. Goodman y Gilman  
Bases farmacológicas de la terapéutica Interamericana. Quinta edición 1978.
4. Enslie R.D. Treatment of acute ulcerative gingivitis  
Br. Dent. J. 1967, 122, 307-308.
5. Padono K.O. A controlled trial of metronidazole in the treatment of dracontiasis in Nigeria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1973, 22, 42-44.
6. Edward D. Ralph  
Clinical Pharmacokinetics of metronidazole.  
Clinical Pharmacokinetics 8: 43-62 (1983).
7. Lorraine L. Wearley y Gaylord D. Anthony.
8. Pinal Bertha.  
Facultas de Química UNAM.  
Evaluación de los detectores de ionización de flama, de ionización de flama alcalina y de captura de electrones para la determinación cuantitativa de metronidazol en fluidos biológicos. 1980.

9. Klaus Florey  
Analytical Profiles of drug substances, Volume 5 1976.
10. Silva, Munno y Srojny.  
Absorptiometric, polarographic y gas chromatographic assays -  
for the determination of N-1 substituted nitroimidazoles in -  
blood and urine.
11. Brooks, L.D. Arconte, Silva  
Determination of nitroimidazoles in Biological Fluids by -  
Differential Pulse Polarography  
Journal of Pharmaceuticals Sciences. Vol. 65, No. 1, January  
1976.
12. Zweig y Sherma  
Handbook of Chromatography. Vol. 2
13. Wheeler, DeMeo, Halula y Heseltine  
Use of High pressure liquid chromatography to determine plasma  
levels of metronidazole and metabolites after intravenous -  
administration  
Antimicrobial Agents and Chemoteraphy 13:205-209 (1978).
14. Kerstin Lanbeck y Lindstrom  
Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and  
feces by high-performance liquid chomatography  
Journal of Chomatography, 162 (1979) 117 - 121.

15. Victor Lorian  
Antibiotic in Laboratory Medicine  
Williams and Wilkins. 1980.
16. Snyder y Kirkland  
Introduction to Modern Liquid Chromatography  
Segunda edición. 1979.
17. XYost, Etre y Conlon  
Practical Liquid Chromatography  
Perkin-Elmer. 1980.
18. Csaba Horváth  
High-Performance liquid chromatography advances and perspectives  
Vol. 3  
Academic Press. U.S.A. 1983.
19. Hamilton, Sewell  
Introduction to high performance liquid chromatography Chapman  
and Hall. 1977.
20. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 27 th Edition edited by  
Ainhey-Wode the Pharmaceutical Press, London. 1976.
21. The Unites States Pharmacopeia USP XX.
22. The Merck Index, 9 th Edition, published by Merck & Co, Inc.  
Rahway, N.J. 1976.