

Dezvoltarea și validarea metodei RP- HPLC de determinare cantitativă a bromadiolone din produsul Ratitox F

Development and validation of a RP- HPLC method for the quantitation studies of bromadiolone in Ratitox F

Elena Gabriela Oltean
Romvac Company SA

Rezumat

A fost dezvoltată și validată o metodă isocratică de lichid cromatografie de performanță înaltă pentru determinarea cantitativă a bromadiolone din produsul RATITOX F–raticid. Separarea HPLC a fost realizată prin cromatografie în fază inversă pe o coloana ODS 2 Hypersil C18 (mărimea particulelor 5 μm; 250 x 4,6 mm diametrul intern), termostată la 25°C. Faza mobilă a fost metanol/ acid fosforic 0.1% soluție apoasă (90/ 10 v/ v), cu debit de 1 ml/ min. și detecție UV la 265 nm. Pentru validarea metodei au fost urmăriti următorii parametri–linearitatea ($r^2=0,9999$), intervalul, precizia, acuratețea, specificitatea, cantitatea minimă decelabilă LOD, cantitatea minimă măsurabilă LOQ. Metoda descrisă poate fi utilizată cu succes pentru analiza compusului activ din produsul RATITOX F.

Cuvinte cheie: bromadiolone, Ratitox F, UV–VIS cromatografie de lichide de performanță ridicată de fază inversă, validare

Abstract

An isocratic high-performance liquid chromatography (HPLC) procedure was developed for quantitative determination of bromadiolone (hydroxycoumarins), in RATITOX F products–rodenticide. HPLC separation was carried out by reversed phase chromatography ODS 2 HYPERSIL C₁₈ (250 mm x 4.6 mm i.e.; 5 μm particle size), held at 25°C. The mobile phase consisted of methanol/ 0.1% aqueous solution phosphoric acid (90/ 10 v/ v), run at flow rate of 1 mL/ min and with UV detection at 265 nm. Method validation investigated parameters such as linearity ($r^2=0.9999$), range, precision, accuracy, specificity, limit of detection and limit of quantification. The described method can be successfully applied for the analysis of RATITOX F–rodenticide.

Key words: bromadiolone, Ratitox F, reversed phase high performance liquid chromatography RP–HPLC UV–VIS, validation

Scopul lucrării a fost dezvoltarea și validarea unei metode HPLC sensibile, aplicabile pentru determinarea cantității de bromadiolone din produsul Ratitox F, contribuind la controlul de calitate și siguranța acestui tip de preparat.

Materiale și metode

Reactivi

Bromadiolone standard de referință a fost furnizat de Sigma.

Metanolul, dimetilformamida și acidul fosforic a fost furnizate de Merck.

Produsul Ratitox F a fost furnizate de Romvac Company și utilizat în timpul perioadei de valabilitate.

Toate substanțele chimice utilizate au fost de grad farmaceutic sau analitic.

A fost utilizată apă dublu distilată, filtrată pe membrane 0,45 μm.

Sistemul și condițiile cromatografice

Metoda HPLC a fost realizată pe un LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA) echipat cu pompă cuaternară, autosampler, buclă de

25μl și detector UV–VIS–diode array (Thermo Electron Corporation, USA). Integrarea picurilor cromatografice a fost realizată cu softul ChromQuest (Thermo Electron).

Analizele au fost realizate prin utilizarea unei coloane ODS 2 Hypersil C₁₈ (mărimea particulelor 5μm; 250x4,6 mm diametrul intern).

Probele au fost eluate isocratic cu metanol și soluție apoasă acid fosforic 0,1% (90/ 10 v/ v), cu debit de 1 ml/min.

Fiecare probă a fost filtrată înainte de injectare prin filtru de PVDF 0,45 μm (Thermo Electron).

Volumul de injectare al probelor a fost de 5μl, iar detecția s-a realizat la 265nm, la 25°C.

Prepararea soluțiilor standard de referință

Soluția standard de lucru bromadiolone a avut o concentrație finală de 0,025mg/ ml, preparată în metanol.

Soluțiile standard pentru liniaritate s-au încadrat în domeniul 0,005–0,05 mg/ml pornind de la o soluție stoc de bromadiolone de 1 mg/ml preparată în dimetilformamida.

Toate probele au fost realizate în triplicat. Soluția stoc de bromadiolone se păstrează la +4°C timp de o săptămână.

Prepararea soluțiilor de probe

Se cântăresc 30 g produs peste care se adaugă 5 ml dimetilformamida și se ultrasonează timp de 15 minute; se adaugă 10 ml metanol și se ultrasonează 15 minute.

Se filtrează pe hârtie de filtru. Înainte de injectare soluțiile se filtrează prin filtru PVDF de 0,45 μm.

Validarea metodei cromatografice

După stabilirea condițiilor cromatografice metoda a fost validată urmărind următorii parametri: linearitatea, intervalul de lucru, precizia, acuratețea, limita minimă de detecție, limita minimă de cuantificare, specificitatea și conformitatea sistemului, utilizând ghidul ICH.

Linearitatea și intervalul de lucru

Curba analitică s-a obținut cu ajutorul a 5 concentrații diferite de bromadiolone situate în domeniul 0,005–0,05 mg/ml, preparate în triplicat. Linearitatea a fost evaluată prin analiza regresiei lineare.

Sistemul a fost echilibrat timp de cel puțin 30 minute. Au fost injectate câte 3 replicat din fiecare concentrație de standard bromadiolone în volum de 5 μl, pentru verificarea reproductibilității răspunsului detectorului la fiecare nivel de concentrație.

Precizia

Precizia metodei a fost determinată prin repetabilitate (în aceeași zi) și precizia intermediară (între mai multe zile).

Repetabilitatea a fost determinată prin 12 analize repetate ale aceleiași soluții de probă Ratitox F, în aceeași zi, în aceleași condiții experimentale.

Precizia intermediară a metodei a fost determinată prin analiza în 2 zile (între zile), respectiv și de către un alt analist în cadrul aceluiași laborator (între analiști).

Acuratețea

Pentru confirmarea acurateței metodei propuse au fost analizate 9 probe utilizând 3 nivele concentrație care să acopere intervalul de lucru.

Conformitatea sistemului

Pentru asigurarea validității metodei analitice a fost realizat testul de conformitate a sistemului. În acest scop au fost injectate 6 probe conținând 0,025 mg/ml bromadiolone, injectate în volum de 5 μl.

Evaluarea conformității sistemului a fost realizată cu ajutorul softului ChromQuest, prin evaluarea parametrilor—arie, timp de retenție, asimetrie.

Analiza bromadiolonei din produs

Analiza conținutului în bromadiolone din Ratitox F a fost realizată pe baza metodei dezvoltate și propuse pentru validare utilizând standardul de referință.

Rezultate și discuții

Pentru determinarea cantității de bromadiolone din Ratitox F a fost propusă o metodă HPLC de fază inversă, fiind selectate condițiile optime de separare cromatografică.

Din analiza cromatogramelor se constată că nu există interferențe între compusul de interes și restul constituenților matricei, timpul de retenție fiind de 4,292 min. Asimetria peak-ului a fost bună, egală cu 1,0.

Curbele de calibrare pentru bromadiolone au fost construite prin reprezentarea ariei peak-ului față de concentrație.

A fost observată liniaritatea în domeniul de referință ales.

Intervalul de concentrație a fost 20–200% față de concentrația de lucru.

Aplicând regresia liniară pentru curba de calibrare, a fost stabilit un coeficient de determinare $r^2=0,99929$.

Precizia metodei reprezintă gradul de conformitate între rezultatele testelor individuale, prin aplicarea repetată a metodei pe probe multiple ale unei serii omologe.

Repetabilitatea a fost studiată prin calcularea deviației relative standard (RSD) a 12 probe cu concentrație 0,1 mg/ml bromadiolone, realizate în aceeași zi și în aceleași condiții experimentale.

Precizia intermediară include estimarea variabilității analizei atunci când metoda este utilizată între laboratoare diferite, în zile diferite, de către analiști diferiți sau cu echipamente diferite.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1.

Concentrația, precizia și precizia intermediară în metoda HPLC pentru bromadiolone

Parametru	Valoare
Concentrația	0,025 mg/ml
RSD% (aceeași zi)	0.489%
RSD% (între zile)	0.458%

Acuratețea metodei este gradul de apropiere a rezultatelor practic obținute cu

ajutorul metodei comparativ cu valoarea teoretică.

Acuratețea a fost determinată prin analiza a câte 9 probe conținând bromadiolone în concentrație de 80, 100, 120% față de concentrația de lucru propusă (0,02, 0,025, 0,03 mg/ml).

Tabelul 2

Recuperarea bromadiolone din probele analizate prin RP-HPLC

Concentrația teoretică a probei (mg/ml)	% Recuperare ^a	Acuratețe %
0,02	106,666%	
0,025	126,673%	121,594%
0,03	116,516%	

^amedia a 3 replicare

Din analiza datelor prezentate în Tabelul 2 se constată că metoda prezintă acuratețe în intervalul propus, procentul mediu de recuperare fiind de 121,594% pentru compusul de interes, bromadiolona.

Pentru evaluarea rezoluției și reproductibilității sistemului de analiză propus au fost realizate teste de conformitate.

Rezultatele prezentate în Tabelul 3 arată faptul că parametri sunt în limitele de conformitate.

Tabel 3

Rezultatele testului de conformitate a sistemului pentru bromadiolone

Parametru	Minim	Maxim	RSD(%)	Status
Asimetrie	0,91104	0,91993	0,384	passed
Timp de retenție	4,282	4,292	0,105	passed
Aria	2013881	2032493	0,377	passed

Limitele de detecție și de cuantificare au fost calculate, obținându-se următoarele valori:

Tabel 4

Limitele de detecție și de cuantificare pentru bromadiolone

Component	LOD	LOQ
Bromadiolone	0,000384 mg/ ml	0,001280 mg/ ml

Concluzii

1. Rezultatele prezentate în validarea metodei RP-HPLC arată acuratețea, liniaritatea, precizia acestora cât și limitele de detecție și de cuantificare.
2. Metoda poate fi utilizată cu succes pentru cuantificarea bromadiolone ca substanța activă.

3. Metoda propusă are avantajul utilizării unei proceduri analitice comode, care necesită o preparare simplă a probelor. Metoda poate fi utilizată astfel pentru analiza de rutină.

Bibliografie (în ordinea citării)

1. <http://www.ich.org>
2. <http://www.waters.com>
3. <http://www.ncbi.nlm.gov.com>
4. Jin, M.C., Chen, X. H. (2006). Rapid determination of three anticoagulant rodenticides in whole blood by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20(18)**, 2741–2746.
5. <http://www.thermoscientific.com>
6. Jin, M., Ren, Y., Xu, X., Chen, X. (2006). Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*, **171(1)**, 52–56.
7. <http://onlinelibrary.wiley.com>
8. <http://findarticles.com>
9. <http://medind.nic.in>
10. <http://www.inchem.org>