

Aspecte privind profilul impurităților din fipronil metoda HPLC

Some aspects regarding impurities profile in fipronil - HPLC method

Ana Csuma, Cornelia Pîrlog

S.N. Institutul Pasteur S.A.

Rezumat

Utilizarea unei substanțe ca ingredient farmaceutic activ la prepararea produselor medicamentoase, necesită caracterizarea acesteia atât în privința conținutului de substanță activă cât și în privința profilului impurităților prezente. Fipronilul este un produs de sinteză din clasa pesticidelor folosit în practica veterinară la prepararea unor produse de deparazitare administrate spot-on sau sub formă de spray la câini și pisici. Impuritățile pot rezulta fie din procesul de fabricație (reacții secundare) fie în urma unor procese de degradare datorate expunerii la mediu (reducere, oxidare, fotoliză, hidroliză). S-a stabilit o metodă HPLC aptă pentru separarea fipronilului de impuritățile prezente. Separarea s-a făcut pe o coloană cu fază inversă folosind ca fază mobilă metanol-acetonitril-apă. Condițiile alese au permis separarea fipronilului de sulfonă (principala impuritate) cu o rezoluție (R) > 3,0 și un factor de asimetrie (T) < 2,0 pentru picul de fipronil. Impuritățile înrudite au prezentat spectre de absorbție în aceeași bandă de lungimi de undă cu a fipronilului. Compararea ariei picurilor de impurități din soluția de probă cu aria etalonului de fipronil diluat de 100 de ori a permis detecția impurităților la concentrații mai mici de 0,1 %. Separarea pe aceeași coloană cromatografică și detecția la 280 nm a fost validată pentru determinarea conținutului de substanță activă din fipronil.

Cuvinte cheie: *Fipronil, impurități și substanțe înrudite, metoda HPLC.*

Abstract

Using a substance as active pharmaceutical ingredient in veterinary drug formulation requires the characterization of this substance as content in active compound and so in terms of impurities possible present in it, the latter being a mandatory requirement for a drug application. Fipronil is a synthetic product belonging to pesticide class used in veterinary practice to manufacture of some products against fleas, given spot-on or in form of spray, in cats and dogs. The main impurities in fipronil include process related impurities and degradation products as a result of exposure to environmental conditions: reduction, oxidation, photolysis and hydrolysis. A HPLC method suitable for analytical separation of fipronil from its impurities was established. Separation was achieved on a reversed phase column using a mixture of methanol, acetonitrile and water as mobile phase. In the chosen chromatographic conditions the resolution between fipronil and its sulphone (the main impurity) was > 3 and the tailing factor (T) < 2.0. Related impurities have absorbed in the same band of UV wavelength as the main compound fipronil. Comparing the area of impurities obtained for sample solution with the area of the main peak in diluted standard solution allowed the detection of impurities at concentration < 0.1 %. Chromatographic separation on the same analytical column and detection at 280 nm was validated for assay of the content of active substance in fipronil used as ingredient in drug formulations.

Key words: *Fipronil, impurities, related substances, HPLC method.*

Introducere

În medicina veterinară, fipronilul, (\pm)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-trifluoromethylsulphonylpyrazol-3-carbonitrile, un insecticid cu spectru larg de acțiune din clasa fenilpirazolului, este folosit în diferite formulări (spot-on, soluții de pulverizare), singur sau în combinație cu insecticide din altă clasă, pentru controlul ectoparaziților (purici, căpușe, păduchi) la animale de companie.

Fipronilul folosit ca materie primă poate conține diferite impurități care fie rezultă din procesul de fabricație, fie sunt compuși de degradare prin expunere la factori de mediu.

Aceste impurități pot influența eficacitatea și siguranța produsului.

Impuritățile principale rezultate din procesul de fabricație sunt fipronil sulfona și fipronil sulfitul. Supus la condiții de mediu molecula fipronilului poate suferi procese de degradare la desulfonil (fotoliză) și desulfonil amidă (hidroliză).

Desulfonilul și sulfona manifestă neuroactivitate ridicată asupra mamiferelor (de 10 ori mai mare decât fipronilul), îngustând pragul de acțiune dintre paraziți și mamifere. De aceea conținutul acestora în materia primă este limitat: impuritatea A (desulfonil) $\leq 0,5\%$, impuritatea B (sulfonă) $\leq 2,5\%$, alte impurități $\leq 0,2\%$ și impurități totale $\leq 3,0\%$.

Scopul lucrării

A fost stabilită și validată o metodă specifică pentru identificarea și determinarea cantitativă a impurităților menționate pentru caracterizarea fipronilului folosit ca materie

primă și determinarea stabilității în timp a produselor pe bază de fipronil.

În figura 1 se prezintă schema cu impuritățile și produșii de degradare înrudiți ce pot apărea în materia primă și produsele pe bază de fipronil.

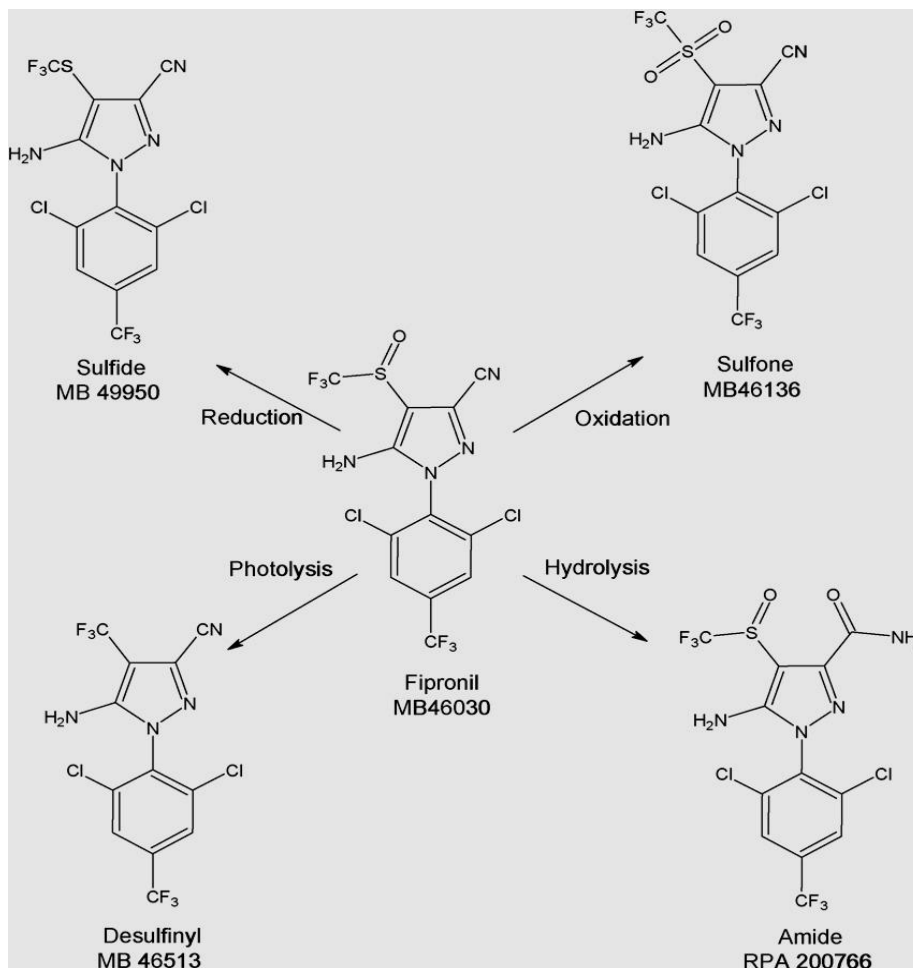


Fig. 1. Impurități și compuși de degradare ai fipronilului

Material și metodă

Reactivi, etaloane și soluții

S-au folosit substanțe de referință Fipronil și Fipronil sulfonă, procurate de la Dr. Ehrenstorfer GmbH, cu puritate certificată.

Metanolul și acetonitrilul HPLC au fost procurate de la J.T. Baker. S-au preparat următoarele soluții etalon:

Soluție de referință (a) prin dizolvarea a 10,0 mg fipronil substanță de referință în acetonitril și diluarea la 10ml cu acetonitril (1 mg/ml).

Soluție de referință (b) prin diluarea a 1,0 ml din soluția de referință (a) la 100 ml cu acetonitril (0,01 mg/ml).

Soluție de referință (c) prin dizolvarea a 5 mg fipronil substanță de referință și 5 mg

fipronil sulfonă substanță de referință și diluarea la 50 ml cu acetonitril.

Soluție de referință (d) prin dizolvarea a circa 1mg de fipronil sulfonă în 1ml acetonitril.

Soluția s-a folosit pentru identificarea picului datorat fipronil sulfonei (impuritate principală).

Probe și soluții de probă

S-a folosit Fipronil, materie primă utilizată la obținerea produsului Pet Spot Forte din care s-a preparat:

Soluție de probă (a) prin dizolvarea a 100 mg produs de analizat în acetonitril și diluarea la 100 ml cu acetonitril.

Aparatura

Analiza s-a efectuat cu un cromatograf de lichide de înaltă performanță Waters 2695 prevăzut cu detector PDA Waters 2998 la 220 nm și 280 nm.

Separarea cromatografică s-a făcut pe o coloană ODS 2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), menținută la 40°C.

Fază mobilă a constat din amestec apă/metanol/acetonitril (40:25:35), volumul de injecție 20 µl. Timpul de analiză de 2 ori timpul de retenție al fipronilului.

Calculul impurităților

Calculul impurităților s-a făcut prin compararea ariei picului de fipronil din cromatograma soluției de referință (b) de concentrație 0,01mg/ml cu aria picurilor impurităților din cromatograma soluției de probă (a) de concentrație 1 mg/ml.

Rezultate și discuții

Adecvarea sistemului cromatografic

S-a reglat compoziția fazei mobile pentru a obține o rezoluție între picurile de sulfonă și fipronil $R \geq 3,0$ și un factor de asimetrie $T \leq 2,0$ pentru picul de fipronil din cromatograma obținută cu soluția de referință (c).

Figura 2 reprezintă cromatograma HPLC obținută pentru soluția de referință de concentrație 0,01 mg/ml (b), iar figura 3 reprezintă cromatograma obținută pentru soluția de probă de concentrație 1 mg/ml (a).

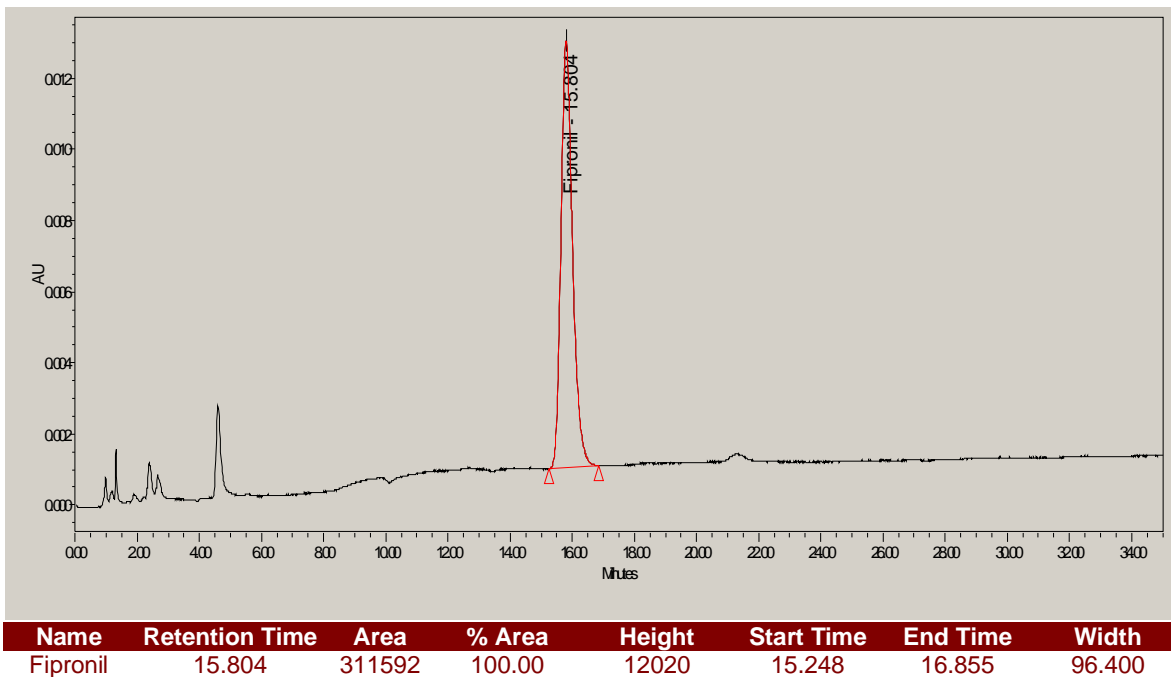


Figura 2. Cromatograma HPLC a soluției de referință la 220 nm (b).

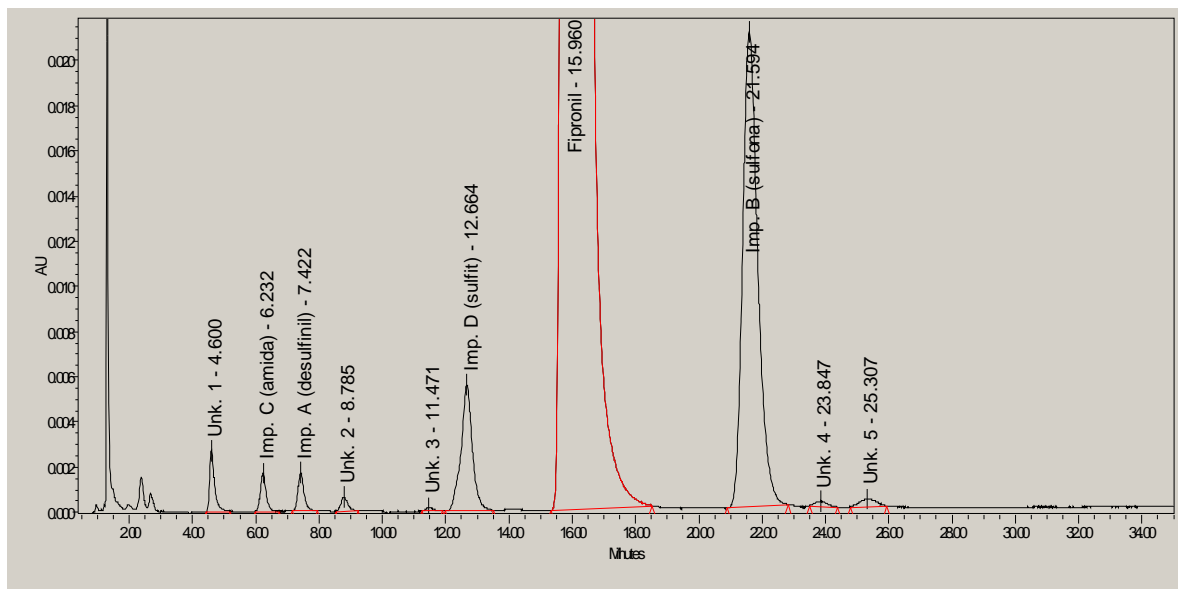


Figura 3. Cromatograma HPLC a soluției de probă (fipronil–materie primă) (a).

No.	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Start Time	End Time	Width
1	Unk. 1	4.600	29461	0.09	2706	4.433	5.202	46.100
2	Imp. C (amida)	6.232	21209	0.07	1708	5.973	6.737	45.800
3	Imp. A (desulfinil)	7.422	22310	0.07	1692	7.160	7.947	47.200
4	Unk. 2	8.785	9602	0.03	626	8.540	9.223	41.000
5	Unk. 3	11.471	2699	0.01	154	11.245	11.893	38.900
6	Imp. D (sulfit)	12.664	138516	0.45	5576	11.982	13.508	91.600
7	Fipronil	15.960	30183461	96.98	1132325	15.323	18.513	191.400
8	Imp. B (sulfona)	21.594	697832	2.24	21039	20.888	22.817	115.700
9	Unk. 4	23.847	6109	0.02	233	23.497	24.380	53.000
10	Unk. 5	25.307	12177	0.04	341	24.787	25.947	69.600

Identificarea impurităților

Identificarea impurităților prezente în fipronil s-a făcut prin analiza spectrului de absorbție în domeniul 210–400nm.

Impuritățile înrudite absorb la 280 nm.

Alte impurități s-au evidențiat la 220 nm.

În condițiile de lucru, timpii de retenție relativi la fipronil ai impurităților evidențiate au fost:

- Imp. 1 $0,29 \pm 0,20$
- Imp. C (amidă) $0,39 \pm 0,20$
- Imp. A (desulfinil) $0,47 \pm 0,20$
- Imp. 2 $0,55 \pm 0,20$
- Imp. 3 $0,72 \pm 0,20$
- Imp. D (sulfit) $0,73 \pm 0,20$
- Fipronil $1,00 \pm 0,20$ (15,96 min)
- Imp. B (sulfonă) $1,35 \pm 0,20$

Calculul conținutului de impurități și substanțe de degradare

Calculat ca suma ariilor tuturor impurităților raportată la aria picului de fipronil din cromatograma probei se obține un conținut de impurități și substanțe de degradare (substanțe înrudite) \leq cu 3,0%.

Limita de detecție a metodei este $<0,1\%$.

Dacă se compară cromatograma obținută pentru probă (figura 3) cu cromatograma obținută cu soluția de referință (b) (figura 2), aria picului impurității A (desulfinil) din cromatograma obținută pentru probă (22310) este mai mică de 0,5 ori aria picului principal din cromatograma obținută cu soluția de referință (b) ($0,5 \times 311592$) ($<0,5\%$), aria picului impurității B (sulfonă) (697832) este mai mică de 2,5 ori aria picului principal din cromatograma obținută cu soluția de referință (b) ($2,5 \times 311592$) ($<2,5\%$), toate celelalte impurități au aria (60048) mai mică de 0,2 ori aria picului principal din cromatograma obținută cu soluția de referință (a) ($0,2 \times 311592$) ($<0,2\%$) și suma ariilor tuturor impurităților (939915) este mai mică de circa 3 ori aria picului principal din cromatograma obținută cu soluția de referință (a) (3×311592) ($<3\%$).

Concluzii

1. Metoda descrisă permite evidențierea și determinarea cantitativă a impurităților înrudite (fipronil sulfonă, fipronil sulfit, desulfinil fipronil și fipronil amidă) și a altor impurități la concentrații mai mici de 0,1 %.
2. Condițiile cromatografice descrise pot fi folosite pentru controlul calității produselor pe bază de fipronil.
3. Metoda poate fi folosită pentru urmărirea stabilității în timp a fipronilului ca materie primă și a produselor pe bază de fipronil.

Bibliografie

- 1 VICH Guide GL 11 (2007). Impurities in new veterinary medicinal products.
- 2 Bieke Dejaegher, Yvan Vander Heyden, Melanie Dumarey (2010). Method Development for Drug Impurity Profiling: Part 1. *LCGC Europe*, Volume 23, Issue 4,
- 3 Rafael Lindenl, Ana Luiza Ziulkoskil; Maina Wingerti; Paula Tonello; André A. Soutoll (2007). Simultaneous determination of omeprazole, hydroxyomeprazole and omeprazole sulphone in human plasma by isocratic HPLC-DAD: application to the phenotyping of CYP2C19 and CYP3A4 in brazilian volunteers, *J. Braz. Chem. Soc.* vol. 18 no. 4 São Paulo.
- 4 Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, et al. (2000). Simultaneous determination of triclofenazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A* Jun 16; 882(1-2) :99-107.
- 5 Guan Jun Chang, Lin Zhang, Run Xiong Lin (2011). Poly(aryl Imino Sulphone)s as Novel High Performance Polymers, *Advanced Materials Research* (Volumes 217-218), 1159-1164,