

## Dezvoltarea și validarea metodei RP–HPLC de determinare cantitativă a fipronil din produsul Parakill

### Development and validation of a RP–HPLC method for the quantitation studies of fipronil in Parakill suspensions

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 fipronil din suspensie PARAKILL. Separarea HPLC a fost realizată prin cromatografie în fază inversă pe o coloana BETASIL C18 (mărimea particulelor 5 μm; 250 x 4,6 mm diametrul intern), termostată la 25°C. Faza mobilă a fost acetonitril/ apa (60/ 40 v/ v), cu debit de 1 ml/ min. și detecție UV la 220 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 farmaceutic activ din suspensie PARAKILL.

**Cuvinte cheie:** fipronil, Parakill, 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 fipronil in suspensions dosage forms of PARAKILL. HPLC separation was carried out by reversed phase chromatography Betasil C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size), held at 25°C. The mobile phase consisted of acetonitrile/ distilled water (60/ 40 v/ v), run at flow rate of 1 mL/ min and with UV detection at 220 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 PARAKILL suspensions.

**Key words:** fipronil, Parakill, 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 fipronil din suspensia PARAKILL, contribuind la controlul de calitate și siguranța acestui tip de preparat farmaceutic.

#### Materiale și metode

##### Reactivi

Fipronil standard de referință a fost furnizat de Sigma (Germania).

Acetonitrilul a fost furnizate de Merck (Germania).

Suspensiile de Parakill au fost furnizate de Romvac Company și au fost utilizate 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 μ.

#### Sistemul și condițiile cromatografice

Metoda HPLC a fost realizată pe un LC Surveyor <sup>(Thermo Electron Corporation, USA)</sup> echipat cu pompă cuaternară, autosampler, buclă de 25μl și detector UV–VIS–diode array <sup>(Thermo Electron Corporation, USA)</sup>

Integrarea picurilor cromatografice a fost realizată cu softul ChromQuest <sup>(Thermo Electron)</sup>.

Analizele au fost realizate prin utilizarea unei coloane Betasil C<sub>18</sub> (mărimea particulelor 5 μm; 250x4,6 mm diametrul intern).

Probele au fost eluate isocratic cu acetonitril și apa (60/40 v/v), cu debit de 1 ml/. Fiecare probă a fost filtrată înainte de injectare prin filtru de PVDF 0,45 μm <sup>(Thermo Electron)</sup>. Volumul de injectare al probelor a fost de 6 μl, iar detecția s-a realizat la 220 nm, la 25°C.

#### Prepararea soluțiilor standard de referință

Soluția standard de lucru fipronil a avut o concentrație finală de 0,1 mg/ml, preparată în amestec acetonitril/ apă 3/2.

Soluțiile standard pentru liniaritate s-au încadrat în domeniul 0,05–0,15 mg/ml pornind de la o soluție stoc de fipronil de 1 mg/ml preparată în amestec acetonitril/apă 3/2. Toate probele au fost realizate în triplicat.

Soluția stoc de fipronil se păstrează la +4°C timp de o săptămână.

#### Prepararea soluțiilor de probe

Într-un balon cotate de 50 ml se cântărește o cantitate corespunzătoare de suspensie pentru obținerea concentrației de 1 mg/ml fipronil, se diluează la volum cu amestec acetonitril/apă 3/2 și se ultrasonează timp de 20 minute (soluția stoc). Soluțiile de lucru se prepară zilnic, prin diluarea soluțiilor stoc cu amestec acetonitril/apă 3/2, pentru obținerea soluțiilor de lucru cu concentrație de fipronil de 0,1 mg/ml. 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: liniaritatea, intervalul de lucru, precizia, acuratețea, limita minimă de detectare, 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 fipronil situate în domeniul 0,05–0,15 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 fipronil în volum de 6 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 PARAKILL, 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 acurateții 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 0,1 mg/ml fipronil, injectate în volum de 6 μl.

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

#### Analiza fipronil din suspensie

Analiza conținutului în fipronil din suspensia Parakill a fost realizată pe baza metodei dezvoltate și propuse pentru validare utilizând standardul de referință.

### Rezultate și discuții

Pentru determinarea cantității de fipronil din suspensia PARAKILL 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 16,518 min.

Asimetria peak-ului a fost bună, egală cu 1,0.

Curbele de calibrare pentru fipronil 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 50–200% față de concentrația de lucru.

Aplicând regresia liniară pentru curba de calibrare, a fost stabilit un coeficient de determinare  $r^2 = 0,995708$ .

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 fipronil, 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.

**Tabel 1**

Concentrația, precizia și precizia intermediară în metoda HPLC pentru fipronil

Parametru	Valoare
Concentrația	0,1 mg/ml
RSD% (aceeași zi)	0.187%
RSD% (între zile)	0.170%

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 fipronil, în concentrație de 80, 100, 120% față de concentrația de lucru propusă (0,08, 0,10, 0,12 mg/ml).

**Tabel 2**

Recuperarea fipronil din probele analizate prin RP-HPLC

Concentrația teoretică a probei (mg/ml)	% Recuperare	Acuratețe %
0,08	112.500%	
0,10	110.318%	119.052%
0,12	127.785%	

<sup>a</sup>media 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 119,052% pentru compusul de interes–fipronil.

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

Rezultatele prezentate în Tabelul 3 relevă faptul că parametrii sunt în limitele de conformitate.

**Tabel 3**

Rezultatele testului de conformitate a sistemului pentru fipronil

Parametru	Minim	Maxim	RSD(%)	Status
Asimetrie	1,02859	1,03278	0,305	passed
Timp de retenție	16.590	16.629	0.185	passed
Aria	1554254	4566563	0.094	passed

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

**Tabel 4**

Limitele de detecție și de cuantificare pentru fipronil

Component	LOD	LOQ
Fipronil	0.003083 mg/ml	0.010275 mg/ml

## Concluzii

1. Rezultatele prezentate în validarea metodei RP–HPLC arată acuratețea, liniaritatea, precizia acesteia cât și limitele de detecție și de cuantificare.
2. Metoda poate fi utilizată cu succes pentru cuantificarea fipronil ca substanța activă în suspensie.
3. Metoda propusă are avantajul utilizării unei proceduri analitice comode, care necesită o preparare simplă a probelor.
4. 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. <http://www.gilson.com>
5. <http://www.thermoscientific.com>
6. **Hadjmohammadi, M. R., Nikou, S. M. Kamel, K. (2006).** Determination of fipronil residue in soil and water in the rice fields in north of Iran by RP–HPLC methods. *Acta Chim. Slov.*, **53**, 517–520.
7. <http://onlinelibrary.wiley.com>
8. <http://findarticles.com>
9. <http://medind.nic.in>
10. <http://www.inchem.org>