

Dezvoltarea și validarea metodei RP–HPLC de determinare cantitativă a ivermectin din soluții

Development and validation of a RP–HPLC method for the quantitation studies of ivermectin in solutions dosage forms

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 ivermectin din soluții. Separarea HPLC a fost realizată prin cromatografie în fază inversă pe o coloana KROMASIL C₁₈ (mărimea particulelor 5 μm; 150 x 4,6 mm diametrul intern), termostată la 25°C. Faza mobilă a fost metanol/ apă (90/ 10 v/ v), cu debit de 1 ml/ min. și detecție UV la 254 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 soluții.

Cuvinte cheie: ivermectin, Romivermectin, 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 ivermectin in solutions dosage forms. HPLC separation was carried out by reversed phase chromatography KROMASIL C₁₈ (150 mm x 4.6 mm i.e.; 5 μm particle size), held at 25°C. The mobile phase consisted of methanol/ water (90/ 10 v/ v), run at flow rate of 1 mL/ min and with UV detection at 254 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 solutions dosage forms.

Key words: ivermectin, Romivermectin, 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 ivermectin din soluții, contribuind la controlul de calitate și siguranța acestor tipuri de preparate farmaceutice.

Materiale și metode

Reactivi

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

Metanolul a fost furnizat de Merck (Germania).

Soluțiile cu ivermectin (Romivermectin 1%, Endectocid) 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^(Thermo Electron Corporation, USA) echipat cu pompă cuaternară, autosampler, buclă de 25 μl 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 KROMASIL C₁₈ (mărimea particulelor 5 μm; 150 x 4,6 mm diametrul intern). Probele au fost eluate isocratic cu metanol și apă (90/ 10 v/ v), cu debit de 1 ml/.

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 5 μl, iar detecția s-a realizat la 254nm, la 25°C.

Prepararea soluțiilor standard de referință

Soluția standard de lucru ivermectin a avut o concentrație finală de 0,1 mg/ ml, preparată în metanol.

Soluțiile standard pentru liniaritate s-au încadrat în domeniul 0,01–0,20 mg/ml pornind de la o soluție stoc de ivermectin de 1 mg/ml preparată în metanol.

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

Prepararea soluțiilor de probe

Într-un balon cotat de 50 ml se măsoară un volum corespunzător de soluție pentru obținerea concentrației de 0,1 mg/ml ivermectin, se diluează la volum cu metanol și se ultrasonează timp de 10 minute. 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 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 6 concentrații diferite de ivermectin situate în domeniul 0,01–0,2 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 ivermectin 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, 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 ivermectin, 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 ivermectin din soluții

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

Rezultate și discuții

Pentru determinarea cantității de ivermectin din soluții 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 pentru ivermectin fiind de 13,118 min. Asimetria peak-ului a fost bună, egală cu 1,0.

Curbele de calibrare pentru ivermectin 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 10–200% față de concentrația de lucru.

Aplicând regresia liniară pentru curba de calibrare, a fost stabilit un coeficient de determinare $r^2 = 0,999619$.

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 ivermectin, 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 ivermectin

Parametru	Valoare
Concentrația	0,1 mg/ml
RSD% (aceeași zi)	0,809%
RSD% (între zile)	1,526%

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

Tabel 2

Recuperarea ivermectin din probele analizate prin RP-HPLC

Concentrația teoretică a probei mg/ml	% Recuperare ^a	Acuratețea %
0,08	91,887%	95,466%
0,10	94,189%	
0,12	98,626%	

^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 95,466% pentru compusul de interes–ivermectin.

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 ivermectin

Parametru	Minim	Maxim	RSD(%)	Status
Asimetrie	1,07908	1,08763	0,291	passed
Timp de retenție	13,055	13,152	0,261	passed
Aria	11133381	11425994	1,079	passed

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

Tabel 4

Limitele de detecție și de cuantificare pentru ivermectin

Component	LOD	LOQ
Ivermectin	0,00002 mg/ml	0,000068 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 ivermectin ca substanță activă în soluții.
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>
4. <http://www.thermoscientific.com>
5. <http://www.inchem.org>
6. <http://www.findarticles.com>
7. **Waldia, A., Gupta, S., Issarani, R., Nagori, B. P. (2008).** Validated liquid chromatographic method for simultaneous estimation of albendazole and ivermectin in tablet dosage form. *Indian Journal of Chemical technology*, **15**, 617–620.
8. **United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2011).** Determination of ivermectin, doramectin, and moxidectin by HPLC. *CLG–AVR.04*, 1–13.
9. **Alvinerie, M., Sutra, J.F., Galtier, P., Toutain, P.L. (1987).** Determination of ivermectin in milk by high performance liquid chromatography. *Ann. Rech. Vet.*, **18**, 269–274.