

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**VÝVOJ HPLC METODY PRO STANOVENÍ**  
**ÚČINNÝCH LÁTEK V PŘÍPRAVKU ARPALIT**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

**Hradec Králové 2009**

**Petra Švestková**

Děkuji Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

## Abstrakt

Byla vyvinuta HPLC metoda pro separaci a stanovení látek fenoxycarbu a permetrinu. Metoda je založena na využití kolony HS F5 (10 x 4 mm, 3 µm částice) a UV detekce při 225 nm. Sloučeniny byly separovány s využitím izokratické eluce mobilní fází acetonitril – voda (65:35) průtokem 1,0 ml/min. Měření probíhalo při 70 °C. Systém umožnil úspěšnou separaci obou složek v čase pod 5 min. Retenční čas fenoxycarbu byl 1,53 min a permetrinu 3,68 min. Rozlišení chromatografických píků fenoxycarbu a permetrinu bylo 11,012. Metoda byla využita pro analýzu účinných látek fenoxycarbu a permetrinu ve veterinárních přípravcích Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač, Arpalit<sup>®</sup> Neo spray a Arpalit<sup>®</sup> Neo pěna. Vyvinutá metoda byla srovnána s metodou dostupnou na Katedře analytické chemie Faf UK HK (HPLC, Chromolith Performance RP-18, 100 x 4,6mm, gradientová eluce mobilní fází acetonitril + voda/acetonitril (60:40), průtok 1,0 ml/min, teplota 30 °C, čas analýzy 11 min).

Klíčová slova: fenoxycarb, permetrin, HPLC

## Abstract

A HPLC method was developed for the separation and determination of the substances fenoxycarb and permethrin. The method is based on using HS F5 column (10 x 4 mm, 3  $\mu$ m particle) and UV detection at 225 nm. The compounds were separated using isocratic elution of the mobile phase acetonitril - water (65:35) at a flow-rate of 1,0 ml/min. There was temperature 70 °C during the measurement. The system enabled successful separation of both compounds in time less than 5 min. The retention time of fenoxycarb was 1,53 min and the retention time of permethrin was 3,68 min. The chromatographic resolution between both compounds was 11,012. The method was applied to analysis of the active substances fenoxycarb and permethrin in veterinary preparations Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanical spray, Arpalit<sup>®</sup> Neo spray a Arpalit<sup>®</sup> Neo foam. Developed method was compared with the method available on Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague (HPLC, Chromolith Performance RP-18, 100 x 4,6 mm, gradient elution of mobil phase acetonitril + water/acetonitril (60:40), flow rate 1,0 ml/min, temperature 30 °C, analysis time 11 min).

Keywords: fenoxycarb, permethrin, HPLC

# Obsah

<b>Obsah .....</b>	<b>6</b>
<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Teoretická část .....</b>	<b>11</b>
3.1  ARPALIT® Neo .....	11
3.1.1  Fenoxycarb .....	12
3.1.2  Permetrin.....	14
3.2  Chromatografie .....	18
3.2.1  Základní principy chromatografických metod.....	18
3.2.2  Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC .....	18
3.2.3  Schéma kapalinového chromatografu.....	19
3.2.4  Chromatografické kolony .....	21
3.2.5  Detektory v HPLC .....	21
3.3  Charakteristiky HPLC.....	22
3.4  Test vhodnosti chromatografického systému .....	23
3.4.1  Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ).....	23
3.4.2  Faktor symetrie chromatografických pík ( $A_s$ ) .....	23
3.4.3  Rozlišení chromatografických pík ( $R_s$ ).....	24
3.5  Validace analytické metody.....	25
3.5.1  Linearita .....	25
3.5.2  Opakovatelnost .....	25
3.5.3  Přesnost.....	26
3.5.4  Správnost .....	26
3.5.5  Robustnost .....	26
3.6  Metody stanovení fenoxycarbu a permetrinu .....	27
<b>4 Experimentální část .....</b>	<b>28</b>
4.1  Materiály a pomůcky .....	28

4.1.1	Standards, vzorky, chemikálie.....	28
4.1.2	Přístroje, podmínky separace .....	28
4.2	Příprava roztoku standardů fenoxycarbu a permetrinu.....	29
4.3	Příprava vzorku.....	29
4.4	Popis práce.....	30
4.5	Optimalizace chromatografických podmínek.....	31
4.5.1	Optimalizace složení mobilní fáze v závislosti na typu kolony.....	31
4.5.2	Optimalizace teploty .....	37
4.5.3	Výběr vhodné kolony.....	40
4.5.4	Souhrn optimálních podmínek HPLC analýzy .....	41
4.6	Test vhodnosti chromatografického systému .....	42
4.6.1	Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ).....	42
4.6.2	Faktor symetrie chromatografických pík ( $A_S$ ) .....	42
4.6.3	Rozlišení chromatografických pík ( $R_S$ ).....	43
4.7	Validace analytické metody.....	44
4.7.1	Linearita .....	44
4.7.2	Opakovatelnost .....	45
4.7.3	Přesnost.....	47
4.7.4	Správnost .....	48
4.7.5	Robustnost .....	49
4.8	Stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu ve vzorcích přípravku Arpalit <sup>®</sup> Neo.....	53
4.8.1	Analýza vzorků přípravku Arpalit <sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač ...	53
4.8.2	Analýza vzorků přípravku Arpalit <sup>®</sup> Neo spray .....	54
4.8.3	Analýza vzorků přípravku Arpalit <sup>®</sup> Neo pěna .....	54
4.8.4	Srovnání původní a nové metody stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu v přípravku Arpalit <sup>®</sup> Neo .....	55
4.8.5	Statistické srovnání výsledků.....	57
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>60</b>

## Seznam zkratek

AChE	acetylcholinesterasa
CE	kapilární elektroforéza
CNS	centrální nervová soustava
DAD	Diode Array detektor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Environmental Protection Agency
Faf UK HK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC <sub>50</sub>	koncentrace látky, která je po podání u daného živočicha v 50 % případů smrtelná
LD <sub>50</sub>	množství látky, které je po podání pro daného živočicha v 50 % případů smrtelné
MAO – A	monoaminoxidasa A
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
RP	reverzní fáze
SPE	extrakce na pevné fázi
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast



# 1 Úvod

Veterinární přípravek ARPALIT<sup>®</sup> Neo patří do skupiny látek účinných proti zevním parazitům a hmyzu. Je určen k lokálnímu použití u nepotravinových zvířat starších dvou měsíců. Obsahuje dvě účinné látky – regulátor růstu hmyzu fenoxycarb a kontaktní pyretroid permetrin působící na dospělá stadia hmyzu.

Ze stručné rešerše vyplývá, že stanovením fenoxycarbu a permetrinu současně se zabývá pouze Katedra analytické chemie Faf UK HK. Žádné jiné články o současném stanovení fenoxycarbu a permetrinu nebyly ve vědeckých databázích nalezeny. Katedra analytické chemie Faf UK HK vyvinula a publikovala metodu stanovení těchto dvou účinných látek v přípravku ARPALIT<sup>®</sup> Neo pomocí sekvenční injekční chromatografie.

Na Katedře analytické chemie Faf UK HK byl vydán také Interní předpis č. 71, který pro stanovení fenoxycarbu a permethrinu využívá metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Metoda HPLC je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčivých přípravků. HPLC je široce využívána v moderních lékopisných monografiích. Dá se použít také ke stanovení fenoxycarbu a permetrinu, a to z důvodů současného kvalitativního i kvantitativního hodnocení obou složek, minimální spotřeby vzorku, možnosti automatizace a rychlosti analýzy.

## 2 Cíl práce

Diplomová práce se zabývá možností analyzovat přípravky ARPALIT<sup>®</sup> Neo vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí za využití různých typů stacionárních fází.

Práce vycházela z metody dostupné na Katedře analytické chemie Faf UK HK. Metoda využívala při separaci fenoxycykarbu a permetrinu obsažených v přípravcích ARPALIT<sup>®</sup> Neo gradientovou eluci v mobilní fázi acetonitril – voda (60:40) na chromatografické koloně Chromolith Performance RP-18, 100 x 4,6 mm se zapojenou 10mm předkolonou. Analýza trvala 11 minut.

Cílem této diplomové práce je upravit stávající metodu a poté validovat podmínky pro stanovení fenoxycykarbu a permetrinu v přípravcích ARPALIT<sup>®</sup> Neo tak, aby mohla být nová metoda používána při rutinní analýze těchto přípravků. Snahou je použít při separaci jinou vhodnou kolonu, zachovat přesnost a spolehlivost analýzy, zkrátit čas potřebný pro analýzu a zjednodušit metodu použitím isokratické eluce namísto původní eluce gradientové.

## 3 Teoretická část

### 3.1 ARPALIT<sup>®</sup> Neo

ARPALIT<sup>®</sup> Neo je netoxický antiparazitární a insekticidní přípravek s dlouhodobým účinkem. Používá se proti ektoparazitům (blechám, klíšťatům, vším, všenkám, roztočům a jejich vývojovým stádiím) a proti jinému hmyzu (mravencům, mouchám, pavoukům) u nepotravinových zvířat (psů, koček, plazů, ptactva a drobných živočichů od 2 měsíců věku). Přípravek chrání zvířata i před onemocněními typu lymfská borelióza a klíšťová encefalitida. Zároveň působí preventivně proti vzniku alergie na bleší kousnutí.

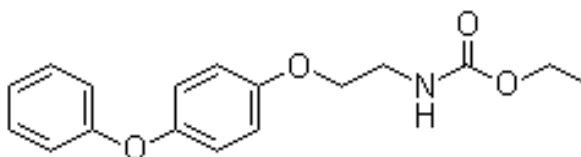
Přípravek se vyskytuje ve trojí aplikační formě:

- **ARPALIT<sup>®</sup> Neo spray 150 ml:** pro svou snadnou aplikaci je vhodný především pro velká zvířata a jejich kotce. Sprej tvoří velmi jemné kapky, které jsou vhodné i pro hubení parazitů malých druhů živočichů (myši, exotického ptactva).
- **ARPALIT<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač 150 ml:** je vhodný zejména pro menší zvířata, pro krátkosrstá zvířata a pro jedince hůře snášející zvuk spreje.
- **ARPALIT<sup>®</sup> Neo pěna 150 ml:** je určena pro všechny typy zvířat, pro jemnou aplikaci v obličejové části a pro jedince s velmi citlivou pokožkou.

Hlavními účinnými látkami jsou **fenoxykarb** a **permetrin** (viz kap. 3.1.1 a 3.1.2). Přípravky ARPALIT<sup>®</sup> Neo jsou obohaceny o D-panthenol a silikonovou složku. D-panthenol dodává pokožce, srsti nebo peří zvířete výživu a vlhkost. Silikonová složka vytváří na povrchu srsti nebo peří ochranný hedvábný lesklý film, který zabraňuje dehydrataci [1].

### 3.1.1 Fenoxycarb

obrázek 1 – strukturní vzorec fenoxycarbu



<b>Sumární vzorec:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> [2]
<b>Chemický název:</b>	Ethyl 2-(4-phenoxyphenoxy)ethylcarbamate
<b>CAS:</b>	79127-80-3
<b>Molekulová hmotnost:</b>	301,34

**Fyzikální a chemické vlastnosti:** bezbarvá krystalická látka  
teplota tání 53 – 54 °C, teplota varu 224 °C  
rozpuštnost ve vodě 5,7 mg/kg při 25 °C  
rozpuštnost v acetonu, chloroformu, diethyleteru  
a methanolu cca 250 g/kg při 25 °C  
stálý v uzavřené nádobě za pokojové teploty  
stabilní k hydrolýze v kyselém prostředí  
lehce rozložitelný [3]

#### **Mechanismus účinku:**

Fenoxycarb patří do skupiny regulátorů růstu hmyzu (IGR = Insect growth regulators). Ty účinkují jako juvenilní hormony. Ovlivňují procesy zahrnující vývoj vajíček, metamorfózu a svlékání larválních stadií hmyzu. Pozitivní účinek léčiva se objeví zprostředkovaně přes vývojová stádia, dospělí jedinci přetrvávají na hostiteli. Proto se používá v kombinaci s permetrinem účinným i na dospělé [4].

#### **Toxicita:**

**Akutní toxicita:** Fenoxycarb je prakticky netoxický pro savce po perorálním podání (LD<sub>50</sub> pro potkana >10000 mg/kg). Totéž platí pro dermální podání (LD<sub>50</sub> pro potkana >2000 mg/kg). Inhalační toxicita je mírná (LC<sub>50</sub> pro potkana >0,480 mg/l).

**Chronická toxicita:** Nebyly prokázány nežádoucí účinky u potkanů krmených 1 rok dávkami fenoxycykarbu  $\leq 10$  mg/kg/den, u psů krmených 1,5 měsíce dávkami  $\leq 15,9$  mg/kg/den, u myší (1,4 mg/kg/den) ani u krys (0,8 mg/kg/den).

**Teratogenní účinky:** Nebyly pozorovány žádné teratogenní účinky v dávkách  $< 300$  mg/kg/den.

**Mutagenní účinky:** Podle EPA není fenoxycykarb mutagenní.

**Kancerogenní účinky, účinky na reprodukci:** Nejsou k dispozici žádná data.

**Orgánová toxicita:** Primárním orgánem ovlivněným fenoxycykarbem při dlouhodobých studiích na zvířatech jsou játra.

#### **Osud v organismu:**

Přes 90 % dávky fenoxycykarbu bylo u potkanů vyloučeno během 96 hodin. Nebyla nalezena rezidua v živočišných orgánech [3].

#### **Symptomy otravy u člověka po podání vyšších dávek fenoxycykarbu:**

Malátnost, svalová slabost, závrať, pocení, bolest hlavy, nadměrné slinění, zvracení, abdominální bolest, průjem, deprese CNS a plicní edém [5].

#### **Účinky na ekosystém:**

Fenoxycykarb je prakticky netoxický pro ptáky a včely, mírně až vysoce toxický pro ryby a vysoce toxický pro vodní bezobratlé rodu *Daphnia*.

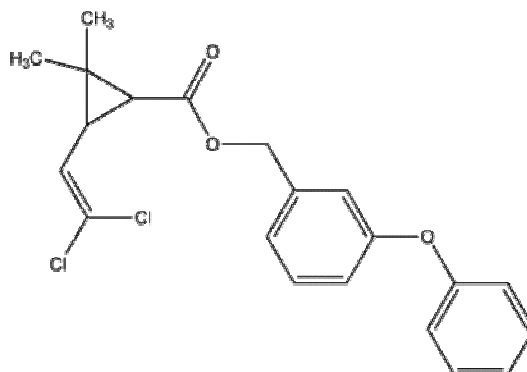
V půdě se rychle rozkládá hydrolýzou či mikroby. Velmi rychle se rozpadá v přítomnosti vody a slunečního světla. Rezidua přetrvávají ve vodě maximálně 2 dny.

#### **Použití:**

Kontrola počtu mravenců, blech, komárů, švábů. V zemědělství jako insekticid na olivách, vinné révě, bavlně a ovoci, případně na skladovaných produktech při ochraně před motýly, moly, brouky a savým hmyzem [3].

### 3.1.2 Permetrin

obrázek 2 – strukturní vzorec permetrinu



<b>Sumární vzorec:</b>	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ [6]
<b>Chemický název:</b>	3-phenoxybenzyl(1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylate [7]
<b>CAS Number:</b>	52645-53-1 (směs cis a trans izomerů) 54774-45-7 (cis – izomery) 51877-74-8 (trans – izomery)
<b>Molekulová hmotnost:</b>	391,29 [8]
<b>Fyzikální a chemické vlastnosti:</b>	bezbarvá krystalická látka či světle hnědá viskózní kapalina bez zápachu teplota tání 34 – 35 °C [7] teplota varu 200 °C [9] rozpustnost ve vodě 0,2 mg/kg při 20 °C rozpustnost ve většině organických rozpouštědel s výjimkou ethylenglykolu [7] 2 stereocentra na cyklopropanovém kruhu – tvoří 4 stereoizomery [9]
<b>Mechanismus účinku:</b>	Permetrin patří do skupiny pyretroidů, syntetických analog přirozených pyretrinů pocházejících z <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> . Mechanismus účinku je

založen na ovlivnění iontových kanálů nervových vláken parazitů (= kontaktní adulticida).

Pyretroidy vykazují silný paralytický účinek na nervovou soustavu dospělých parazitů [10]. Blokují přenos sodných iontů kanály do nervových buněk. Dochází k inhibici ATPasy (následkem je zvýšené uvolňování acetylcholinu), MAO – A a AChE (nedochází k rozkladu acetylcholinu). Permetrin také inhibuje buněčné dýchání a GABA<sub>A</sub> receptor (excitabilita, křeče) [11]. Permetrin má navíc repelentní účinek.

Výhodou pyretroidů oproti klasickým pyretrinem je větší a rychlejší účinek, vyšší stabilita (pyretriny jsou rychle rozkládány působením světla) a lepší reziduální efekt [10].

#### ***Toxicita:***

***Akutní toxicita:*** Permetrin je prakticky netoxický po perorálním podání (LD<sub>50</sub> pro potkana 430 - 4000 mg/kg). Po dermálním podání je mírně toxický (LD<sub>50</sub> pro potkana >4000 mg/kg a pro králíka >2000 mg/kg). Permetrin způsobuje mírné dráždění intaktní i odřené kůže, případně zánět spojivek. Nevykazuje žádnou inhalační toxicitu (LC<sub>50</sub> pro potkana >23,5 mg/l). Toxicita permetrinu je obecně závislá na poměru přítomných izomerů, cis – izomer je více toxický.

***Chronická toxicita:*** Nebyly pozorovány nežádoucí účinky u psů krmených permetrinem dávkami 5 mg/kg/den po 90 dní. U potkanů krmených 150 mg/kg/den po dobu 6 měsíců došlo k mírnému zvýšení hmotnosti jater. Dávky 0,1 ppm permetrinu v potravě kuřat podané ve 3 - 6 týdnech po vylíhnutí potlačily aktivitu imunitního systému.

***Účinky na reprodukci:*** Fertilita samic potkanů byla ovlivněna po užívání dávky 250 mg/kg/den permetrinu během 6. - 15. dne gravidity. U člověka jsou tyto účinky nepravděpodobné.

***Teratogenní účinky:*** Nebyly pozorovány žádné teratogenní účinky [7].

***Mutagenní účinky:*** Permetrin byl mutagenní ve 3 testech na kulturách s lidskými leukocyty (zvýšený počet chromozomových aberací, fragmentů a DNA lézí), v testu s buněčnými kulturami vaječníku křečka (vznik chromozomových

aberrací) a v testu s larvami octomilky (zvýšení četnosti pohlavně vázaných letálních mutací) [11].

**Kancerogenní účinky:** Podle EPA je považován za potenciální lidský kancerogen. Zařazení do této skupiny předcházely nálezy tumorů plic a jater u myší krmených permetrinem [12]. Mechanismus kancerogenní aktivity spočívá jednak v hromadění kancerogenních metabolitů aminokyseliny tryptofanu po inhibici jeho rozkladných enzymů, a jednak v inhibici mezibuněčné komunikace prostřednictvím gap junctions [11]. Zdroj [7] považuje tyto důkazy za neprůkazné.

**Orgánová toxicita:** Látka je podezřelá z poškození nervů a zvětšení jater.

#### ***Osud v organismu:***

Permetrin je efektivně metabolizován v játrech. Metabolity jsou rychle vylučovány z těla. Stolicí je vyloučeno 3 – 6 % látky v nezměněné podobě. Permetrin může přetrvávat v mozku a tělním tuku s poločasem 4 – 5 dní [7].

#### ***Symptomy otravy pyretroidy u člověka:***

Dráždění kůže a očí, bolest hlavy, závrať, nevolnost, zvracení, průjem, nadměrné slinění, únava. Ve vážných případech tekutina na plicích, záškuby svalů – mnohem častější u toxičtějších kyanopyreteroidů [8].

#### ***Účinky na ekosystém:***

Permetrin je prakticky netoxický pro ptáky. Vodní ekosystémy jsou však zvláště citlivé na dopad permetrinu (toxický pro koryše, měkkýše, zooplankton, ryby (LD<sub>50</sub> pro většinu testovaných ryb <1 ppm, LD<sub>50</sub> u některých druhů <1 ppb)). Je také toxický pro divokou zvěř a extrémně toxický pro včely (LD<sub>50</sub> = 0,008 µg/včela) [11].

Permetrin částečně přetrvává v půdě (poločas 30 – 38 dní), většina se však rychle degraduje. Velkou roli při degradaci hrají půdní mikroorganismy. Protože je permetrin téměř nerozpustný ve vodě, neočekává se kontaminace podzemních vod.

Permetrin není, pokud je použit cíleně, toxický pro rostliny [7].



**Použití:**

V zemědělství je používán jako ochrana proti škůdcům na úrodu bavlny, pšenice, kukuřice, zeleniny, ovoce, vojtěšky, a také k hubení parazitů drůbeže.

V tropických oblastech se využívá v prevenci onemocnění přenosných komárem (horečka Dengue, malárie).

Látka je podstatou metody redukce populace jeleních klíšťat *Ixodes scapularis* [9].

Dalšími indikacemi jsou zblešení a zaklíštění u psa. Kontraindikováno je však jeho podání těžce nemocným zvířatům (s jiným infekčním onemocněním s těžkým průběhem) a zvířatům v rekonvalescenci, potravinovým zvířatům, podání mláďatům do 2 měsíců věku a březím fenám. V místě lokálního podání léčiva na kůži může dojít k přechodnému podráždění. Často se používá v kombinaci s imidaklopridem nebo fenoxycarbem [10].

Permetrin nachází upotřebení ve zdravotnictví k eradikaci roztočů zodpovědných za svraby, v průmyslu a domácnostech ke kontrole mravenců a termitů [9].

## **3.2 Chromatografie**

### **3.2.1 Základní principy chromatografických metod**

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení složek směsi. Zároveň se používají ke kvalitativnímu i kvantitativnímu hodnocení separovaných složek.

Při chromatografických metodách dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá, stacionární fáze, má schopnost zadržovat součásti analyzované směsi, druhá pohyblivá, mobilní fáze, vymývá (eluuje) tyto součásti z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k oddělení složek směsi. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tzn. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.

Chromatografické metody můžeme rozdělit z hlediska:

- » podstaty separačního děje (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, na molekulových sítích)
  - » uspořádání stacionární fáze (chromatografie kolonová, plošná (papírová, tenkovrstvá))
  - » způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza)
  - » podle charakteru mobilní fáze (chromatografie plynová (GC), kapalinová (LC))
- [13], [14], [15].

### **3.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC**

Separací účinnost kapalinové kolonové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší a stejnoměrnější jsou částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však nutné protlačit ji kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem. K dělení látek lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu), a proto je možné nalézt

selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech [13].

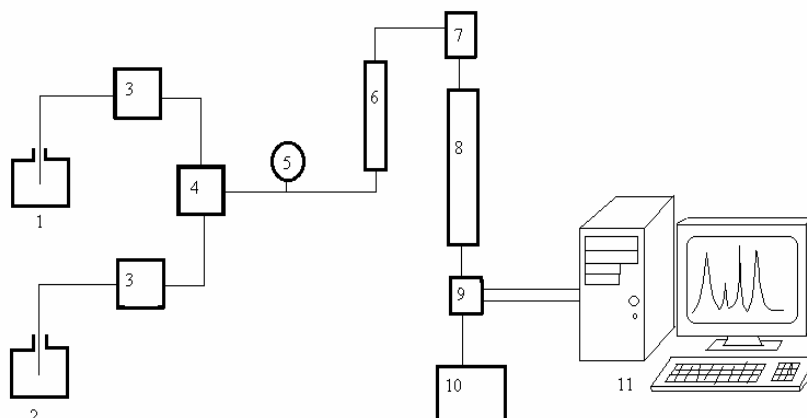
Hlavní přednosti HPLC:

- a) Separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.
- b) Rychlost analýzy, citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru).
- c) Spotřeba minimálního množství vzorku.
- d) Možnost automatizace [14].
- e) Vhodná pro separaci tepelně nestálých i netěkavých sloučenin (je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn na rozdíl od plynové chromatografie) [15].

HPLC využití v praxi je velmi široké, zejména pro hodnocení steroidů, cukrů, vitaminů, pesticidů, barviv [13]. HPLC se využívá také v analýze léčivých přípravků – při identifikaci léčiv, stanovení obsahu a čistoty látek, při řešení problematiky stability léčiv, při analýze přírodních léčiv v rostlinných materiálech a při monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách [14].

### 3.2.3 Schéma kapalinového chromatografu

**obrázek 3 – schéma kapalinového chromatografu** – 1, 2 zásobníky mobilní fáze; 3 čerpadla; 4 směšovací zařízení; 5 manometr; 6 dávkovací zařízení; 7 předkolona; 8 kolona; 9 detektor; 10 sběrač frakcí; 11 počítač



Při chromatografii je mobilní fáze z 1 – 3 zásobníků čerpána vysokotlakým pístovým nebo membránovým čerpadlem konstantním bezpulzním tokem o malé rychlosti (0,1 – 10 ml/min) za tlaku až 40 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru.

Čerpadlo je spojeno s naprogramovaným směšovací zařízením, pomocí kterého se nastavuje složení mobilní fáze. Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, lze HPLC analýzu realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. izokratická eluce. V opačném případě se využívá gradientová eluce, při které je programově měněno složení mobilní fáze.

Vzorek se dávkuje buď injekční mikrostříkačkou nebo dávkovacím kohoutem. V případě injekční mikrostříkačky lze pomocí ručního i automatického ovládání dávkovat různé objemy. Existují ale nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a vnášení stop materiálu, a proto musí být zařízení zhotovena z inertních materiálů – nerezová ocel, titan, některé polymery. Byly vyvinuty techniky označované jako dávkování při zastavení toku (*stop-flow injection*), které odstraňují některé nedostatky. Dávkovacím kohoutem lze dávkovat pevně daný objem roztoku (dávkovací smyčka s obsahem 10 nebo 20  $\mu$ l), avšak mnohem přesněji. Menší vzorky řádu zlomků  $\mu$ l jsou aplikovány na kolonách malých vnitřních průměrů (*micro-bore columns*) pomocí speciálních mikroinjektorů. Dnes jsou však již výhradně používány moderní autosamplery pro několik desítek až stovek vzorků.

K rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru, dojde na chromatografické koloně (viz kap. 3.2.4). Jako ochrana hlavních kolon jsou hojně používány předkolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření píků a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály.

Detektor (viz kap. 3.2.5) indikuje průtok separované složky detekční celou, přenáší upravený signál do počítače, který ho zpracuje, umožní výstup na tiskárnu a zároveň řídí chod celého chromatografu.

Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě. Některé se významně zlepšují zvýšením teploty při termostatování. Programová změna teploty se během HPLC analýzy nevyužívá [13], [14], [15].

### 3.2.4 Chromatografické kolony

Kolony pro HPLC jsou ocelové nebo skleněné trubice dlouhé 5 – 30 cm o vnitřním průměru 2 – 8 mm naplněné homogenní stacionární fází. Spojení mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm), nejčastěji z nerez oceli.

Běžný průtok eluentu je 1 – 2 ml/min. Pro rychlé separace, stačí-li účinnost do 4000 teoretických pater, jsou vhodné krátké analytické kolony délky 3 cm. Jsou levnější a spotřebují malé množství mobilní fáze.

Pro účinné dělení látek hraje rozhodující roli náplň kolony, tj. kvalita sorbentu, velikost a stejnoměrnost částic, tvar, porozita, struktura. Je třeba použít dostatečně malá zrníčka sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku.

Pro HPLC se používají nemodifikované, anebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikosti 3, 5 nebo 10  $\mu\text{m}$ ) nebo oxidu hlinitého. Podle vázané skupiny mají chemicky modifikované fáze různou polaritu od nepolárních používaných pro obrácený systém fází (reversed phase RP), obsahujících na hydroxylových skupinách na povrchu silikagelových zrněk řetězce s 18 (případně 8) uhlíkovými atomy, přes středně polární fáze (tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CN}$  aj.) až po polární fáze (tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami  $-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ ). V současné době jsou běžně komerčně dostupné různé typy chirálních stacionárních fází, umožňující chromatografickou analýzu léčiv [13], [14], [15].

### 3.2.5 Detektory v HPLC

Na detektory pro HPLC jsou kladeny požadavky vysoké citlivosti (detekce látek v roztoku v koncentracích ng až  $\mu\text{g/ml}$ ), reprodukovatelnosti a linearity odezvy, nezávislosti odezvy na změnu složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnosti (detekce všech oddělených složek vzorku).

Používají se detektory spektrofotometrické (UV, UV/VIS, DAD), fluorimetrické, refraktometrické a elektrochemické. Velkého významu nabývá spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií [13], [14].

### **3.3 Charakteristiky HPLC**

**Chromatogram** představuje záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace, v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků rozdělených na základní linii.

Základní kvalitativní charakteristikou HPLC je retenční (eluční) čas  $t_R$  přímo definovaný polohou vrcholu píku na chromatogramu. Jde o vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané látky. Z retenčního času může být vypočítán retenční objem ( $V_R$ ), což je celkový proteklý objem mobilní fáze od nástřiku látky až po vrchol píku podle vzorce:

$$V_R = t_r \cdot v \quad , \text{ kde:}$$

$t_R$  – retenční čas;

$v$  – průtoková rychlost mobilní fáze [16].

Pro identifikaci je nejvhodnější porovnání retenčních dat látky a standardu, porovnání kompletních UV/VIS spekter získaných DAD, nebo využití techniky on-line analýzy píku hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS).

Kvantitativní charakteristikou HPLC je plocha pod křivkou, resp. výška píku. Pro kvantitativní vyhodnocování na základě kalibrační závislosti nebo metody standardního přídatku je výhodnější použít plochu pod píkem, pouze u symetrických píků lze využít k vyhodnocení výšku píku. Za použití dávkovacího ventilu s objemem smyčky 50 – 200  $\mu\text{l}$  umožňuje HPLC metoda stanovení s relativní přesností 0,2 %; izokratická eluce poskytuje reprodukovatelnější výsledky než gradientová [17].

### 3.4 Test vhodnosti chromatografického systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému.

#### 3.4.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ )

Účinnost kolony (zdánlivá) může být vypočtena jako zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ) podle vzorce, v němž musí být vyjádřeny hodnoty  $t_R$  a  $w_h$  ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti):

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2, \text{ kde:}$$

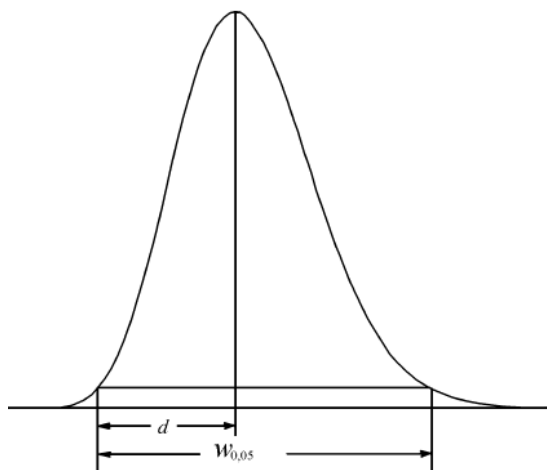
$t_R$  – retenční čas (nebo objem);

$w_h$  – šířka píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem. Větší počet teoretických pater  $N$  znamená vyšší účinnost kolony [16].

#### 3.4.2 Faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ )

obrázek 4 – parametry pro určení faktoru symetrie chromatografických píků



Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) (faktor chvostování píku) se vypočítá ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}, \text{ kde:}$$

$w_{0,05}$  – šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku;

$d$  – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5 % jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku. Hodnoty faktoru symetrie větší než 1,0 znamenají „tailing“ (chvostování), hodnoty menší než 1,0 znamenají „fronting“ (frontování) píku. Zvyšováním asymetrie píku roste možnost chyby při výpočtu plochy píku [16].

### 3.4.3 Rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ )

Rozlišení ( $R_s$ ) mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, se vypočítá ze vzorce:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}, \text{ kde:}$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  – retenční časy látek;

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  – šířky píků v poloviční výšce.

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii [16].



## 3.5 Validace analytické metody

Validaci můžeme definovat jako proceduru, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měření jejich hodnot. Validace je zjednodušeně řečeno ověření platnosti zvoleného analytického postupu [17].

### 3.5.1 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. analytickým signálem a koncentrací analytu.

Pro provedení testu linearit je doporučeno proměřit minimálně 5 – 6 různých koncentrací modelového vzorku. Linearita vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných se charakterizuje metodou lineární regrese (korelační koeficient, směrnice kalibrační křivky – regresní koeficient). Čím více se hodnoty korelačního koeficientu blíží jedné, tím je závislost obou proměnných lineárnější [17], [18].

### 3.5.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody výsledků získaných za podmínek použití téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem, za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí [17].

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky ( $RSD_{\%}$ ) pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}, \text{ kde:}$$

$y_i$  – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;

$\bar{y}$  – průměr jednotlivých hodnot;

$n$  – počet jednotlivých hodnot [16].

### 3.5.3 Přesnost

Přesnost metody je definována jako těsnost shody mezi výsledky metody prováděné opakovaně s homogenním vzorkem. Obvykle je určena jako rozdíl, standardní odchylka či relativní směrodatná odchylka při sérii měření.

Přesnost může být hodnocena pomocí opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. *Opakovatelnost* vyjadřuje přesnost za zcela stejných operačních podmínek v krátkém časovém intervalu. *Reprodukovatelnost* vyjadřuje přesnost mezilaboratorní (srovnání výsledků metody z více laboratoří), využívá se ke standardizaci metody [17], [18].

### 3.5.4 Správnost

Správnost vyjadřuje těsnost shody výsledků měření a skutečné hodnoty měřené veličiny. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou dané veličiny. Zjistí se jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena, analýzou modelového vzorku (placeba s přidaným standardem), či analýzou vzorku s přidaným standardem, pokud není k dispozici placebo. Hodnocením správnosti metody se určuje přítomnost či nepřítomnost náhodné chyby, nejčastěji otestováním odchylky výsledků od správné hodnoty.

Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot, nebo jako výtěžnost (recovery), která udává poměr koncentrace analytu získaného danou analytickou metodou a přijaté referenční hodnoty (v %):

$$R_i = 100 \cdot \frac{c_i}{c_0} \quad , \text{ kde:}$$

$c_0$  – vložená koncentrace;

$c_i$  – koncentrace stanovená pomocí HPLC [18].

### 3.5.5 Robustnost

Robustnost analytické metody je míra její kapacity zůstat nedotčený při malé, ale záměrné změně parametrů analytické metody, k nimž dochází při provádění metody stejným postupem v jiné laboratoři. Poskytuje náznak spolehlivosti analýzy během jejího používání za normálních podmínek. Typickými změnami parametrů kapalinové chromatografie jsou změna pH, změna kolony, změna složení a rychlosti průtoku mobilní fáze, změna teploty [18].

### 3.6 Metody stanovení fenoxycarbu a permetrinu

V odborné literatuře byla nalezena pouze jedna metoda zabývající se stanovením fenoxycarbu a permetrinu současně. Jde o metodu sekvenční injekční chromatografie s využitím systému pro sekvenční injekční analýzu FIALab<sup>®</sup> 3000, kolony Chromolith<sup>™</sup> RP-18e (10 x 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril/voda (60:40) a UV/VIS detektoru při 225 nm. Za optimálních podmínek trvala analýza méně než 6,5 min [19].

V ostatních případech byly fenoxycarb a permetrin, resp. jejich rezidua, stanovovány samostatně nebo ve směsích s dalšími látkami. Analýzy probíhaly metodami HPLC s UV detekcí, HPLC s fluorescenční detekcí, spojení HPLC-MS (iontová past), GC (detektor elektronového záchyty), spojení GC-MS (kvadrupolový analyzátor, iontová past), CE, MEKC a ELISA.

tabulka 1 – metody stanovení fenoxycarbu a permetrinu

Účinná látka	Metoda stanovení	Citace
<b>Fenoxycarb, jeho rezidua, příp. směs látek</b>	HPLC s UV detekcí	[20]
	spojení GC-MS	[21], [22], [23]
	CE	[20]
	ELISA	[24], [25]
<b>Permetrin, jeho rezidua, příp. směs látek</b>	HPLC s UV detekcí	[26], [27], [28], [29]
	HPLC s fluorescenční detekcí	[30], [31], [32]
	spojení HPLC-MS	[33]
	GC s detektorem elektronového záchyty	[34]
	spojení GC-MS	[35], [36], [37]
	MEKC	[38]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiály a pomůcky

#### 4.1.1 Standardy, vzorky, chemikálie

Fenoxycarb, dodavatel Aveflor, a.s., pracovní standard

Permethrin, dodavatel Aveflor, a.s., pracovní standard

Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač, konečný produkt, č. šarží:

A = V05-04\*07/2007

B = V05-06\*09/2007

C = V05-03\*06/2007

Arpalit<sup>®</sup> Neo spray, konečný produkt, č. šarží:

D = V06-04\*07/2007

E = V06-05\*07/2007

F = V06-03\*06/2007

Arpalit<sup>®</sup> Neo pěna, konečný produkt, č. šarží:

PA = V07-03\*07/2007

PB = V07-04\*09/2007

Acetonitril for liquid chromatography, LiChrosolv, Merck

Ethanol 99,9% A.C.S. spectrophotometric grade, Aldrich Chemical Co.

Methanol 99,9% A.C.S. spectrophotometric grade, Aldrich Chemical Co.

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Berford)

#### 4.1.2 Přístroje, podmínky separace

##### Chromatografický systém:

*Chromatograf:* Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph

*Detektor:* Shimadzu M 20A Prominence Diode Array Detector

*Kolony:* Gemini C-18, 50 x 2 mm, 3 $\mu$ m částice (Phenomenex)

Synergi Fusion – RP, 20 x 2 mm, 2 $\mu$ m částice (Phenomenex)

HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice (Sigma Aldrich)

Zorbax SB-CN, 100 x 4 mm, 5 $\mu$ m částice (Agilent)

Zorbax SB-Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5 $\mu$ m částice (Agilent)

Synergi Polar – RP, 75 x 3 mm, 4 $\mu$ m částice (Phenomenex)

	Zorbax TMS, 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m částice (Agilent)
	HS PEG, 100 x 4mm, 3 $\mu$ m částice (Sigma Aldrich)
<i>Dávkování:</i>	2 $\mu$ l
<i>Detekce:</i>	UV, 225 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	Acetonitril – Voda Acetonitril – Metanol
<i>Průtok:</i>	1,0 ml/min
<i>Vyhodnocení:</i>	Chromatografický software LC Solution

**Filtrační zařízení na mobilní fáze:** Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m

**Ultrazvuková lázeň:** Bandelin SONOREX RK52, Berlín, SRN

**Analytické váhy:** Sartorius 2004 MP, SRN

## **4.2 Příprava roztoku standardů fenoxycarbu a permetrinu**

Bylo naváženo přibližně přesně 0,15 g fenoxycarbu a 0,60 g permetrinu, navážka byla rozpuštěna v etanolu a doplněna etanolem na 100 ml v odměrné baňce. 1,00 ml tohoto roztoku byl zředěn ve 25ml odměrné baňce etanolem (c<sub>s</sub>). Tento roztok byl dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

## **4.3 Příprava vzorku**

Postup pro Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač a spray

Po protřepání přípravku Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač, resp. spray, bylo vystříkáno dostatečné množství obsahu nádoby do 50ml kádinky. Kádinka byla dána na 1 min do ultrazvuku, aby unikl hnací plyn. Byl odpipetován 1 ml do 25ml odměrné baňky, odečtena hmotnost navážky a doplněno po značku etanolem. Tento pracovní roztok byl dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

#### Postup pro Arpalit<sup>®</sup> Neo pěna

Do 50ml kádinky obsahující cca 25 ml etanolu bylo po částech vystříkáno takové množství pěny, které odpovídá navážce asi 2 g konečného produktu. Po každém vystříkání byl ponechán čas, aby unikl hnací plyn. Hmotnost navážky byla zjištěna z diferencí hmotností aerosilové nádoby před a po posledním vystříkání pěny. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn etanolem po značku. Tento pracovní roztok byl dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

#### **4.4 Popis práce**

Byla optimalizována metoda pro stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu v přípravku Arpalit<sup>®</sup> Neo. Podstatou optimalizace je volba vhodných podmínek pro analýzu tak, aby separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii. Při měření byly používány pracovní standardy fenoxycarbu a permetrinu.

Po získání optimálních podmínek chromatografie byla metoda validována a byly proměřeny vzorky přípravku Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač, Arpalit<sup>®</sup> Neo spray a Arpalit<sup>®</sup> Neo pěna.

## **4.5 Optimalizace chromatografických podmínek**

### **4.5.1 Optimalizace složení mobilní fáze v závislosti na typu kolony**

Na vybraných kolonách byly měřeny retenční časy fenoxycarbu a permetrinu v závislosti na změnách složení mobilní fáze při 30 °C.

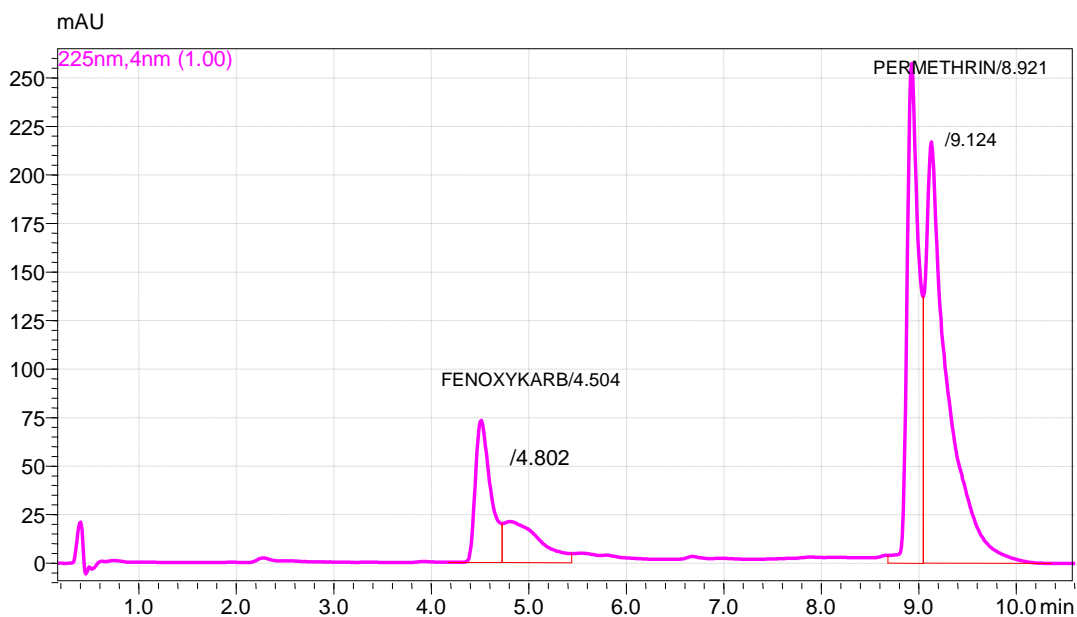
Při měření se vycházelo z původního interního předpisu č. 71 Katedry analytické chemie Faf UK HK [39], podle kterého se používala k separaci směs acetonitril – voda jako mobilní fáze (gradientová eluce) a kolona s C-18 reverzní fází o délce 125 mm. U některých kolon byla testována také směs metanol – voda.

Cílem testování bylo umožnit dělení píků na základní linii při zachování vhodných podmínek pro použitou kolonu a při zachování ucházejícího času jedné analýzy. Níže zmíněné podmínky a vyobrazené chromatogramy jsou výběrem nejlepších dosažených separací na vybraných kolonách.

#### ***Kolona Gemini, 50 x 2 mm, 3 $\mu$ m částice:***

Jako nejvýhodnější se jevila analýza gradientovou elucí (gradient od 2. do 8. minuty z 50 % na 90 % acetonitrilu) za podmínek složení mobilní fáze acetonitril – voda (50:50). Látky však mají dlouhé retenční časy, proto nebyla kolona použita k další analýze.

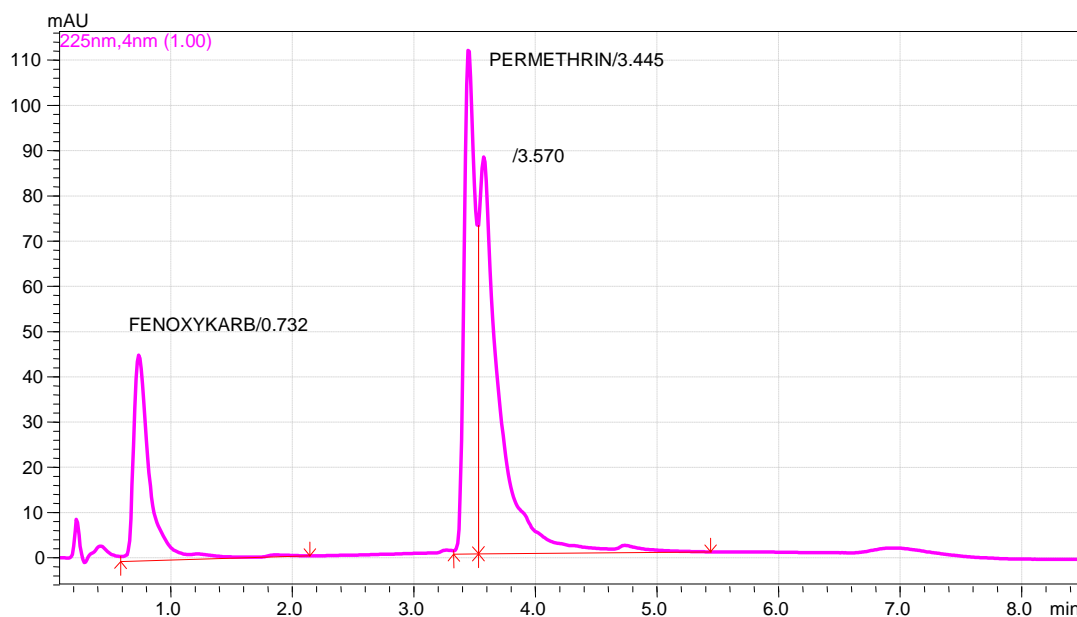
obrázek 5 – chromatogram za použití kolony Gemini, 50 x 2 mm, 3µm částice



***Kolona Synergi Fusion – RP, 20 x 2 mm, 2µm částice:***

Protože analýza izokratickou elucí trvala příliš dlouho a píky fenoxycarbu a permetrinu byly široké, byla zkoušena gradientová eluce – složení mobilní fáze acetonitril – voda (50:50), gradient od 1. do 4. minuty z 50 % na 80 % acetonitrilu.

obrázek 6 – chromatogram za použití kolony Synergi Fusion – RP, 20 x 2 mm, 2µm částice

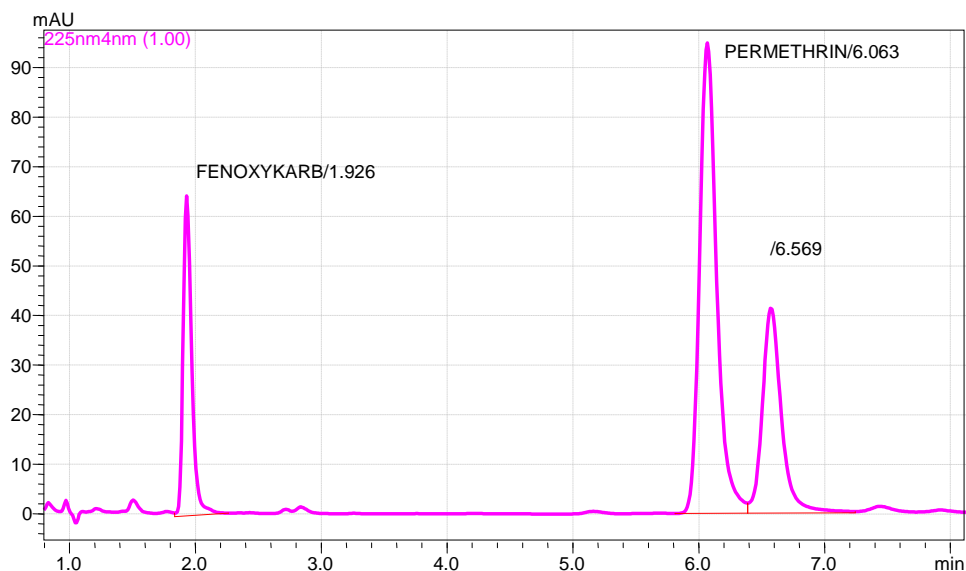




**Kolona HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice:**

Nejlépe probíhala separace fenoxycarbu a permetrinu za podmínek složení mobilní fáze acetonitril – voda (65:35) při izokratické eluci. Za těchto podmínek došlo dokonce i k separaci cis a trans permetrinu.

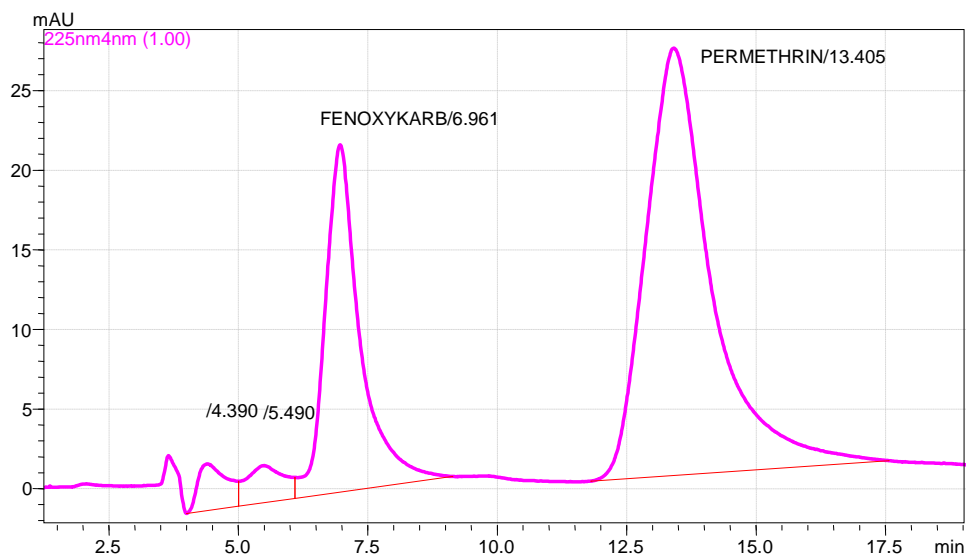
**obrázek 7– chromatogram za použití kolony HS F5, 100 x 4mm, 3 $\mu$ m částice**



**Kolona Zorbax SB–CN, 100 x 4 mm, 5 $\mu$ m částice**

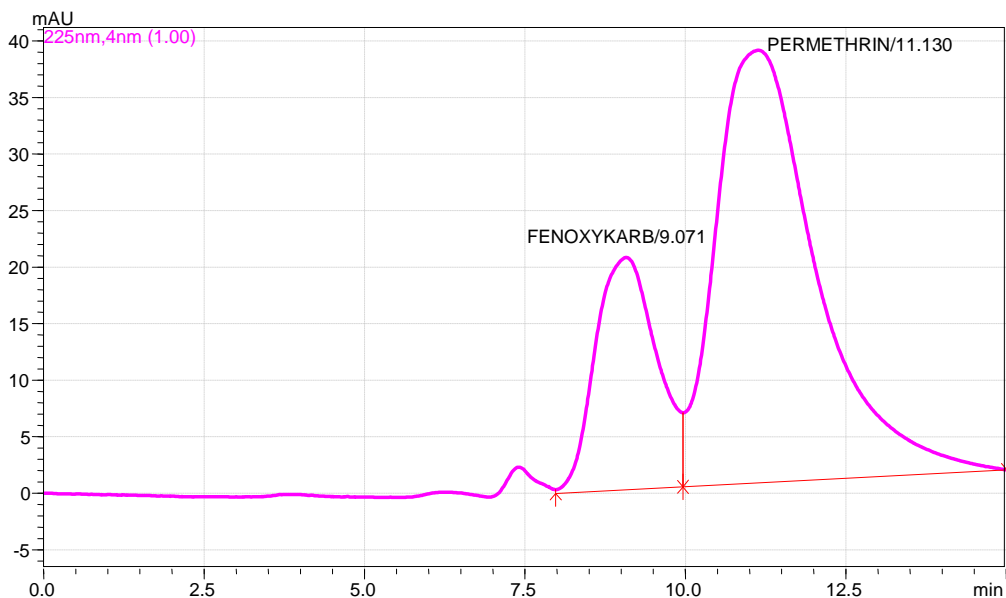
Za podmínek analýzy složení mobilní fáze acetonitril – voda (40:60) izokraticky byly retenční časy obou složek dlouhé a píky chvostovaly,

**obrázek 8 – chromatogram za použití kolony Zorbax SB–CN, 100 x 4 mm, 5 $\mu$ m částice**



a proto byla zkoušena mobilní fáze o složení metanol – voda (60:40), která se také neukázala být vhodnou pro další měření.

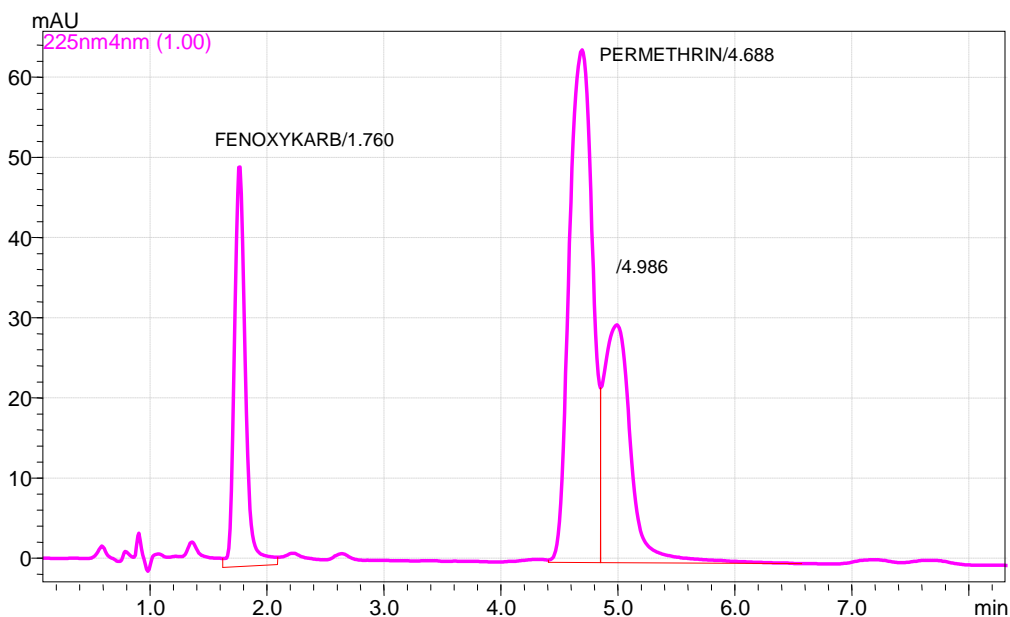
**obrázek 9 – chromatogram za použití kolony Zorbax SB–CN, 100 x 4 mm, 5µm částice**



**Kolona Zorbax SB–Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5µm částice:**

Nejoptimálněji došlo k separaci obou složek za podmínek složení mobilní fáze acetonitril – voda (65:35) izokraticky.

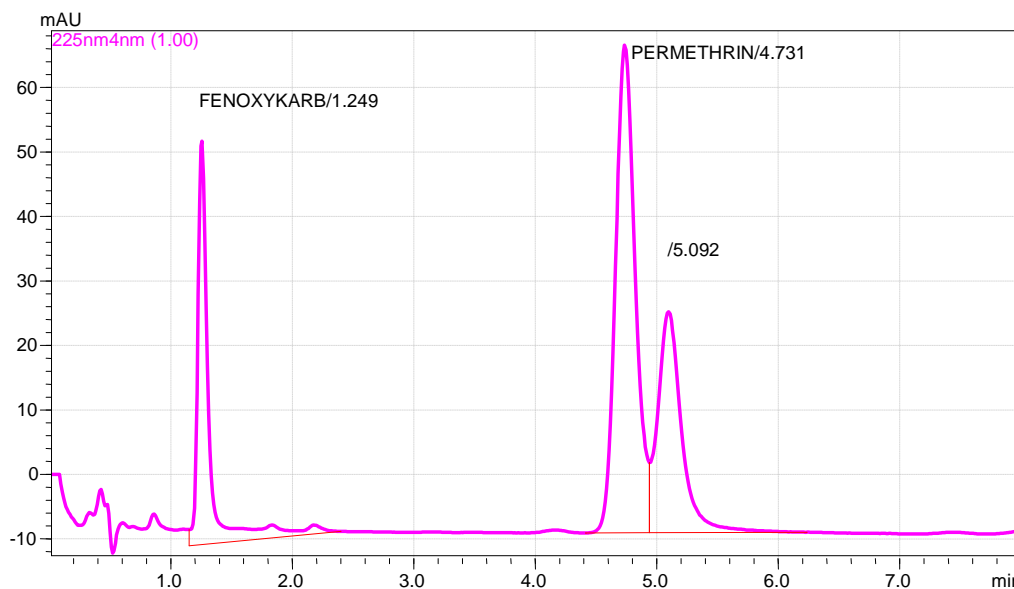
**obrázek 10 – chromatogram za použití kolony Zorbax SB–Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5µm částice**



**Kolona Synergi Polar – RP, 75 x 3 mm, 4 $\mu$ m částice:**

Separace fenoxycarbu a permetrinu byla testována za izokratických podmínek složení mobilní fáze acetonitril – voda (60:40).

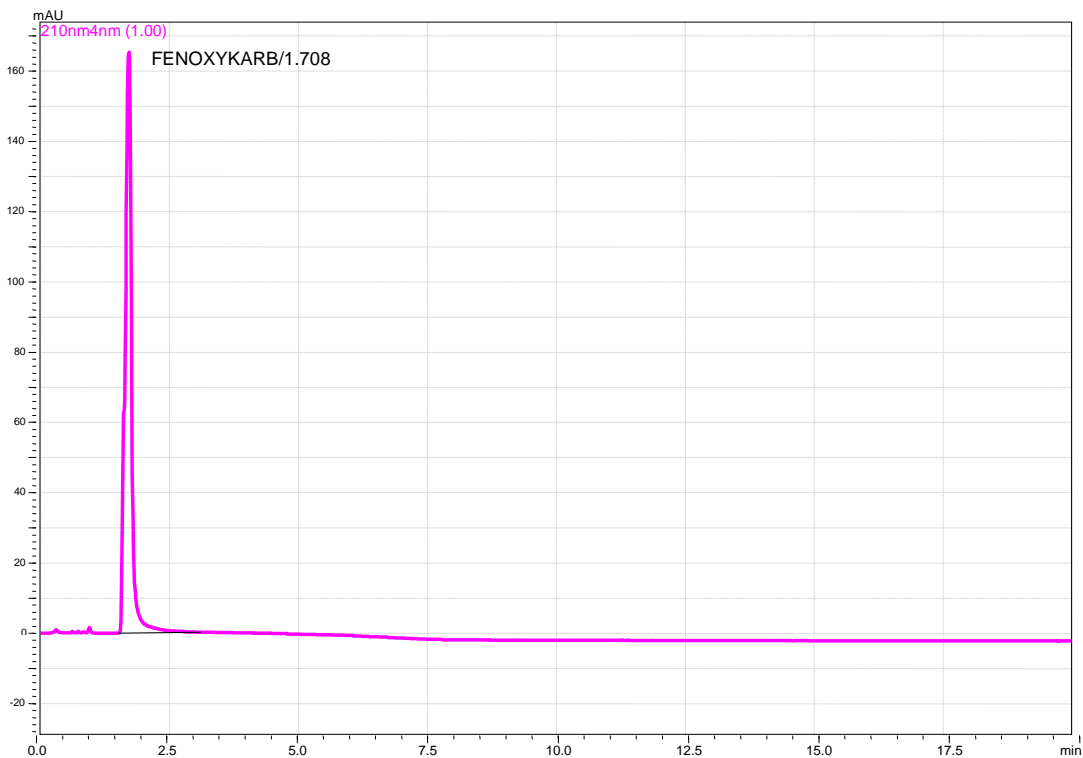
**obrázek 11– chromatogram za použití kolony Synergi Polar – RP, 75 x 3 mm, 4 $\mu$ m částice**



**Kolona Zorbax TMS, 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m částice:**

Při složení mobilní fáze acetonitril – voda (50:50) za izokratických podmínek nedosáhl permetrin do 20 minut analýzy odezvy v detektoru. Další úprava ve složení mobilní fáze nebyla možná, protože retenční čas fenoxycarbu byl krátký (1,70 min) a úpravou složení ve prospěch organické složky by došlo ke koeluci píku fenoxycarbu s mrtvým objemem kolony. Kolona tedy není vhodná pro tuto analýzu.

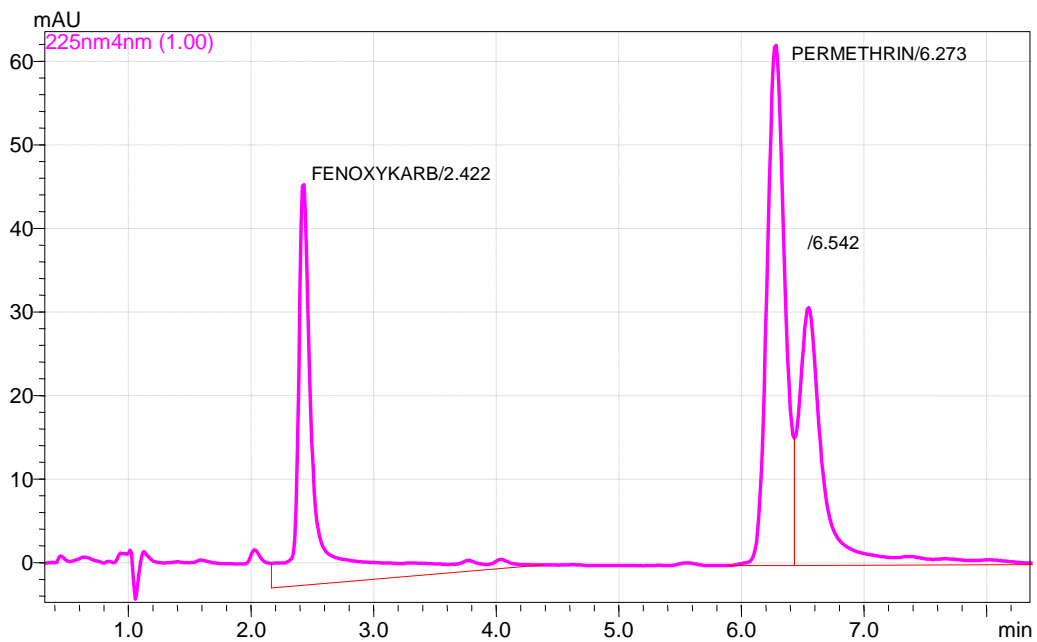
obrázek 12 – chromatogram za použití kolony Zorbax TMS, 250 x 4,6 mm, 5µm částice



**Kolona HS PEG, 100 x 4 mm, 3µm částice:**

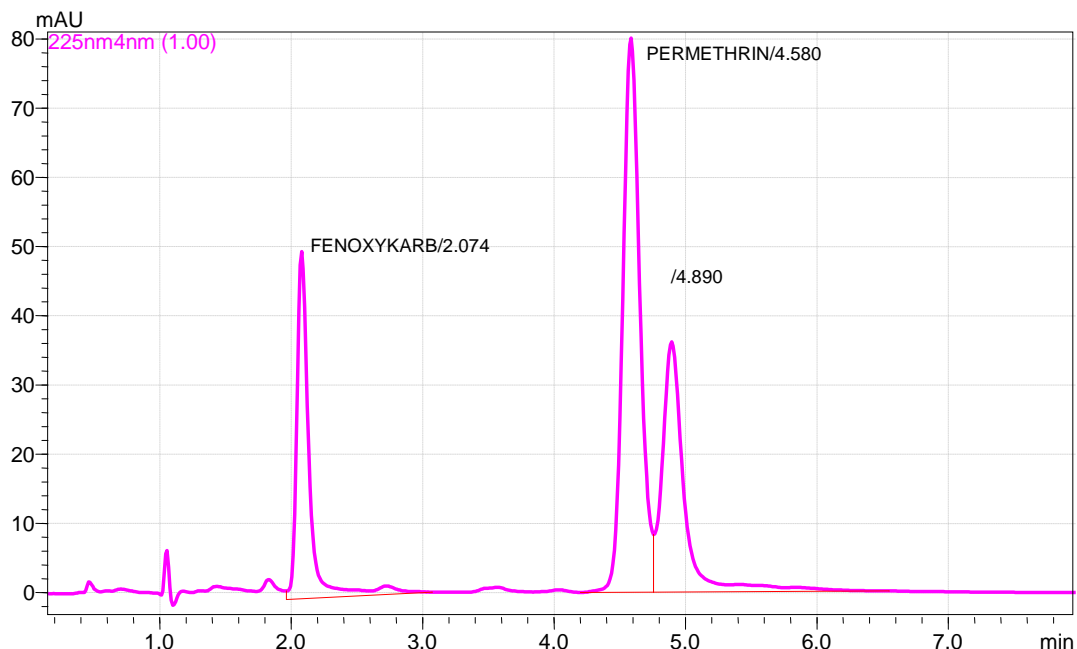
Neoptimálněji se jeví složení mobilní fáze acetonitril – voda (40:60) izokraticky

obrázek 13 – chromatogram za použití kolony HS PEG, 100 x 4 mm, 3µm částice



a metanol – voda (60:40) také izokraticky.

obrázek 14 – chromatogram za použití kolony HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice



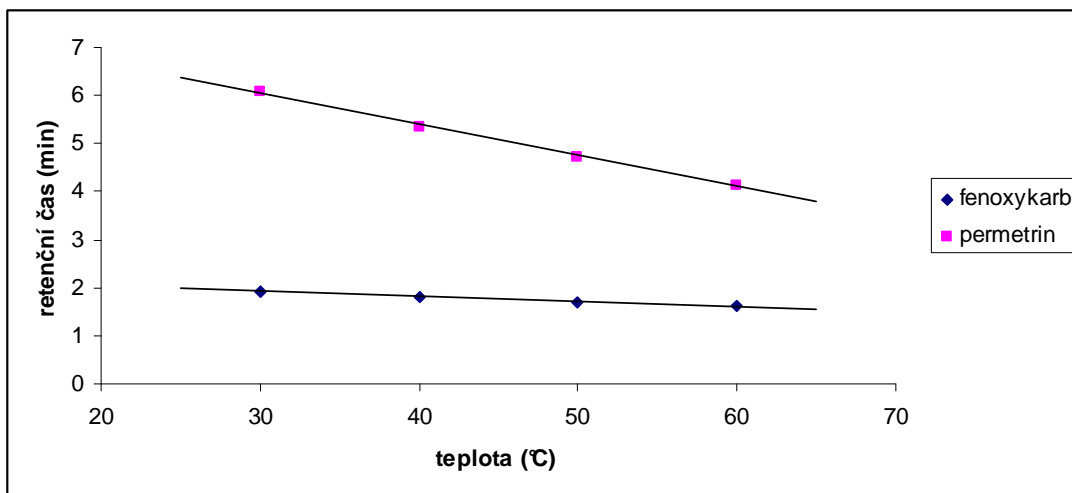
#### 4.5.2 Optimalizace teploty

Z naměřených výsledků při optimalizaci složení mobilní fáze pro různé kolony byly vybrány k další optimalizaci separačního procesu pouze tři kolony (HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice; Zorbax SB–Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5 $\mu$ m částice; HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice) a čtyři složení mobilní fáze, u kterých byl testován vliv teploty na retenční časy fenoxycarbu a permetrinu. Tato studie měla zhodnotit možnost dosáhnout zkrácení času analýzy na vybraných kolonách bez použití gradientové eluce.

tabulka 2 – vliv teploty na retenční časy fenoxycarbu a permetrinu u kolony HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice při složení mobilní fáze acetonitril – voda (65:35) izokraticky

Teplota (°C)	Retenční čas fenoxycarbu (min)	Retenční čas permetrinu (min)
30	1,93	6,07
40	1,82	5,35
50	1,71	4,72
60	1,62	4,13

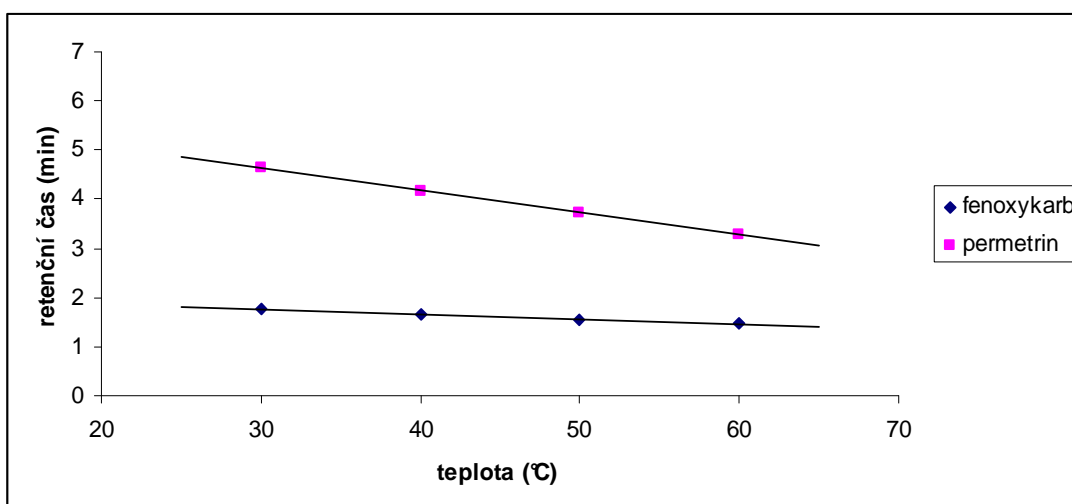
obrázek 15 – závislost retenčního času na teplotě pro kolonu HS F5, 100 x 4 mm, 3µm částice



tabulka 3 – vliv teploty na retenční časy fenoxycarbu a permetrinu u kolony Zorbax SB-Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5µm částice při složení mobilní fáze acetonitril – voda (65:35) izokraticky

Teplota (°C)	Retenční čas fenoxycarbu (min)	Retenční čas permetrinu (min)
<b>30</b>	1,76	4,66
<b>40</b>	1,65	4,15
<b>50</b>	1,56	3,73
<b>60</b>	1,47	3,29

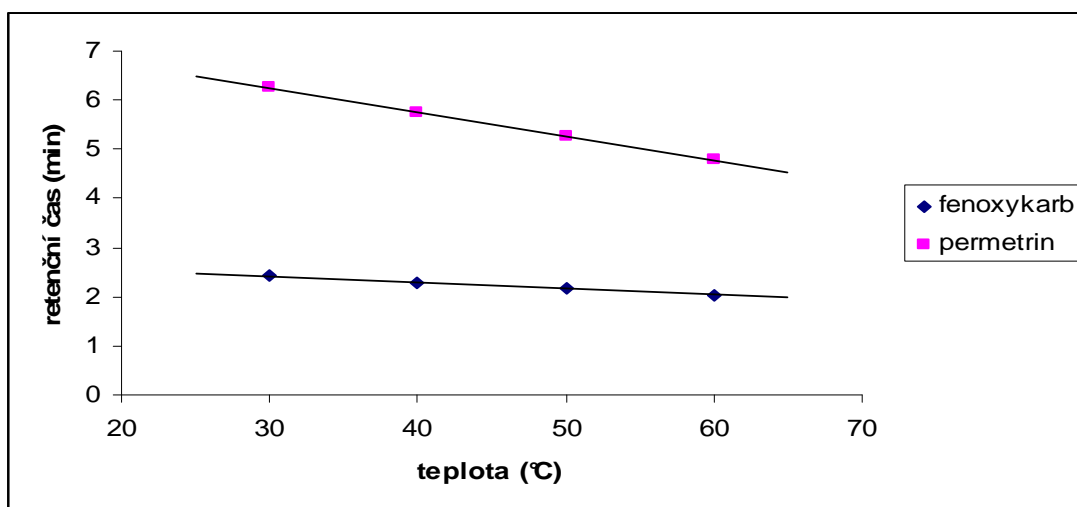
obrázek 16 – závislost retenčního času na teplotě pro kolonu Zorbax SB-Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5µm částice



tabulka 4 – vliv teploty na retenční časy fenoxycarbu a permetrinu u kolony HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice při složení mobilní fáze acetonitril – voda (40:60) izokraticky

Teplota (°C)	Retenční čas fenoxycarbu (min)	Retenční čas permetrinu (min)
30	2,42	6,26
40	2,28	5,75
50	2,16	5,26
60	2,04	4,78

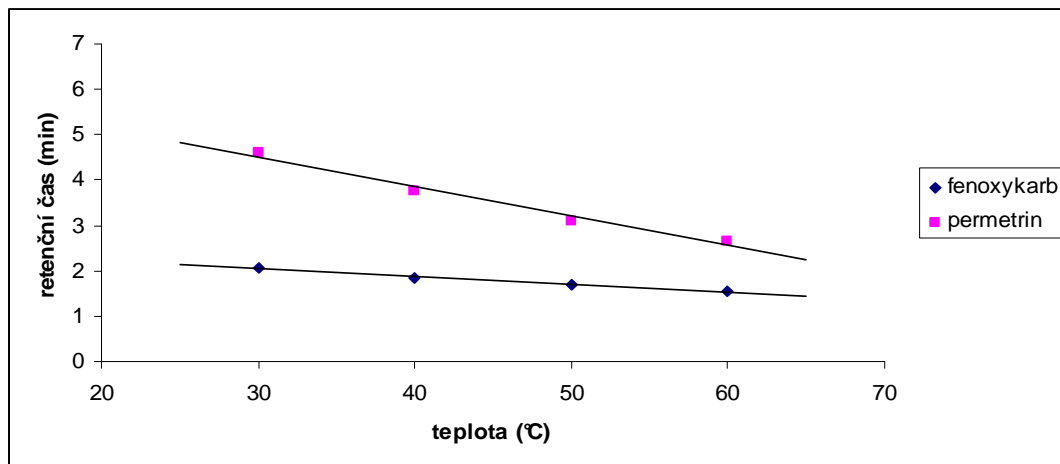
obrázek 17 – závislost retenčního času na teplotě pro kolonu HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice, mobilní fáze acetonitril – voda (40:60)



tabulka 5 – vliv teploty na retenční časy fenoxycarbu a permetrinu u kolony HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice při složení mobilní fáze metanol – voda (60:40) izokraticky

Teplota (°C)	Retenční čas fenoxycarbu (min)	Retenční čas permetrinu (min)
30	2,07	4,59
40	1,85	3,75
50	1,68	3,11
60	1,55	2,66

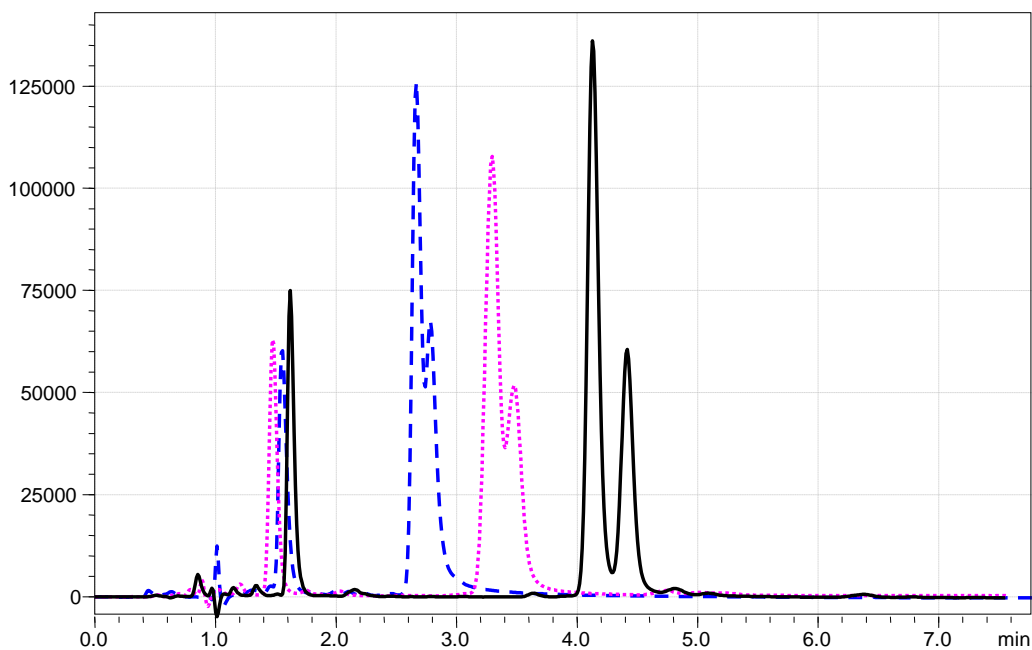
obrázek 18 – závislost retenčního času na teplotě pro kolonu HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice, mobilní fáze metanol – voda (60:40)



Z výše dosažených výsledků vyplývá, že výhodnější je separace fenoxycarbu a permethrinu při vyšších teplotách, jelikož je dosaženo kratších retenčních časů látek se zachováním dostatečného rozlišení se současnou úsporou mobilní fáze. Termostatování probíhá rychle a je stabilní, měření při vyšších teplotách nevyžaduje žádné zvláštní požadavky. Navíc je díky nižší tvorbě organických odpadů ekologicky šetrnější.

### 4.5.3 Výběr vhodné kolony

obrázek 19 – srovnání chromatogramů kolon **HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice; Zorbax SB-Phe, 75 x 4.6 mm, 3.5 $\mu$ m částice; HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice** – vše při 60 °C





Na koloně HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice mají fenoxycarb a permetrin delší retenční časy.

Píky separovaných látek na koloně HS PEG, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m chvostují. Zvyšováním asymetrie píku roste možnost chyby při výpočtu plochy píku.

Jako nejvhodnější z hlediska separace se jeví kolona Zorbax SB–Phe, 75 x 4,6 mm, 3,5 $\mu$ m částice, avšak k měření je nutný vysoký tlak v chromatografu (19 – 20 MPa).

Proto byla nakonec k dalšímu měření vybrána kolona HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice. Čas analýzy je sice o něco delší, ale nedochází k takovému zatěžování systému jako při použití kolony Zorbax SB–Phe. Navíc píky obou látek vykazují na koloně HS F5 nejlepší symetrii a díky rozdělení cis a trans permetrinu je možné podle potřeby hodnotit i obsah jednotlivých izomerů.

Pro vybranou kolonu byly změřeny ještě retenční časy fenoxycarbu a permetrinu při 70 °C za použití stejné mobilní fáze. Retenční čas fenoxycarbu při 70 °C je 1,52 min a retenční čas permetrinu při 70 °C je 3,60 min. Čas analýzy bylo tedy možné ještě výrazně zkrátit.

#### **4.5.4 Souhrn optimálních podmínek HPLC analýzy**

<i>Chromatograf:</i>	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
<i>Detektor:</i>	Shimadzu M 20A Prominence Diode Array Detector
<i>Kolona:</i>	HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice
<i>Dávkování:</i>	2 $\mu$ l
<i>Detekce:</i>	UV, 225 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	Acetonitril – Voda (65:35)
<i>Typ eluce:</i>	Izokratická
<i>Průtok:</i>	1,0 ml/min
<i>Teplota:</i>	70 °C
<i>Čas analýzy:</i>	5 min
<i>Vyhodnocení:</i>	Chromatografický software LC Solution

## 4.6 Test vhodnosti chromatografického systému

### 4.6.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ )

Účinnost kolony byla ověřena proměřením roztoku standardů v testu na opakovatelnost a výpočet byl proveden z průměrů tří měření podle vzorce:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2, \text{ kde}$$

$t_R$  – retenční čas (min);

$w_h$  – šířka píku v polovině výšky (min)

tabulka 6 - účinnost chromatografického systému

Analyzovaná látka	$t_R$ (min)	$w_h$	$N$
Fenoxycarb	1,525	0,089	1640
Permetrin	3,610	0,134	4006

Požadavek –  $N > 1500$  je splněn pro obě látky.

### 4.6.2 Faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ )

Hodnoty pro ověření asymetrie chromatografických píků byly získány z analýz roztoků standardů pro opakovatelnost. Výpočet byl proveden z průměrů tří měření podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}, \text{ kde}$$

$w_{0,05}$  – šířka píku ve vzdálenosti 5% výšky píku;

$d$  – menší část úsečky  $w_{0,05}$ , která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku.

tabulka 7 - asymetrie chromatografických píků

Sloučenina	$w_{0,05}$	$d$	$A_s$
Fenoxycarb	0,164	0,058	1,404
Permetrin	0,473	0,107	2,201

Faktor symetrie píku má být v rozmezí mezi 0,8 a 1,5. Požadavek byl splněn u fenoxycarbu. Permetrin byl vyhodnocen jako dvojpík, proto je hodnota asymetrie píků  $A_S$  vyšší.

### 4.6.3 Rozlišení chromatografických píků ( $R_S$ )

Rozlišení bylo vypočítáno z průměru tří hodnot získaných proměřením roztoků standardů při zkoušce opakovatelnosti pomocí tohoto vzorce:

$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde}$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  – retenční časy látek;

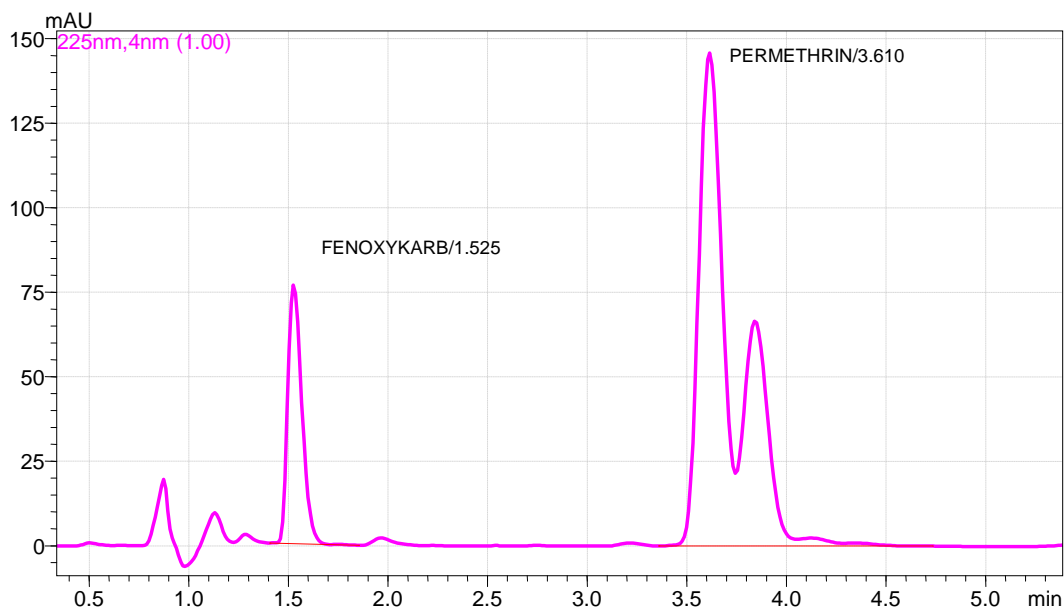
$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  – šířky píků v poloviční výšce.

tabulka 8 - rozlišení chromatografických píků

Hodnocené látky	$R_S$
Fenoxycarb - Permetrin	11,012

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Požadavek rozlišení  $R_S > 1,5$  byl splněn u hodnocených chromatografických píků.

Obrázek 20 - rozlišení píků standardů fenoxycarbu a permetrinu



## 4.7 Validace analytické metody

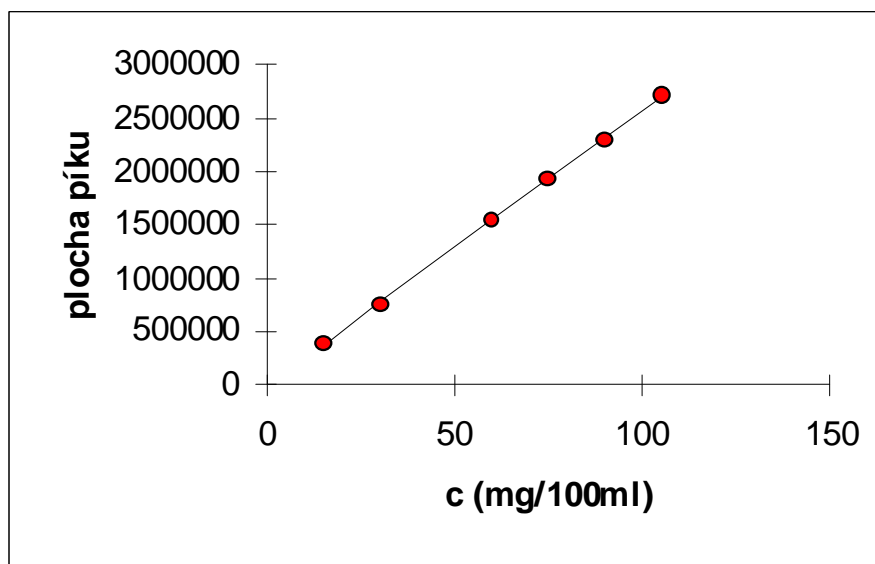
### 4.7.1 Linearita

Byla použita metoda absolutní kalibrace. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pracovních standardů fenoxycarbu a permetrinu (koncentrace pro každou látku jsou uvedeny dále). Závislost absorbancí kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

Obrázek 21 - testování linearity - fenoxycarb

#### FENOXYKARB

c (mg/100 ml)	plocha píku
1,499	377648
2,999	759117
5,999	1536348
7,499	1933096
8,999	2307592
10,499	2704559



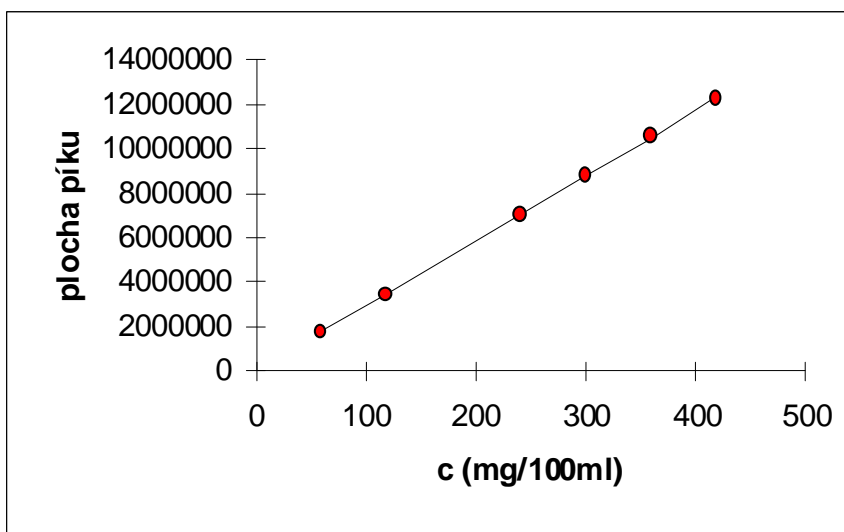
Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 6	Odhad chyby
Směrnice	k = 25859,41 ± 70,75905	
Absolutní člen	q = -13045,5 ± 4959,116	
Korelační koeficient	r = 0,999985	
Reziduální odchylka	$s_{rez} = 5497,707$	

Požadavek na linearitu – korelační koeficient  $r > 0,9990$  byl splněn.

Obrázek 22 - testování linearity - permetrin

**PERMETRIN**

c (mg/100 ml)	plocha píku
5,999	1763891
11,998	3500516
23,997	7027524
29,996	8846227
35,995	10587094
41,994	12306803



Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	6	Odhad chyby
Směrnice	k =	29388,67 ±	90,57362
Absolutní člen	q =	-7511,005 ±	25389,55
Korelační koeficient	r =	0,999981	
Reziduální odchylka	s =	28147,02	

Požadavek na linearitu – korelační koeficient  $r > 0,9990$  byl splněn.

#### 4.7.2 Opakovatelnost

Byl opakovaně dávkován roztok analyzovaných látek v mobilní fázi o koncentraci fenoxycarbu 10,499 mg/100 ml a koncentraci permetrinu 41,994 mg/100 ml.

tabulka 9 – opakovatelnost analýzy pro fenoxycarb

<b>FENOXYKARB</b>		
<b>Číslo pokusu</b>	<b>Plocha píku (A)</b>	<b>Retenční čas (<math>t_R</math>) (min)</b>
<b>1</b>	2700720	1,527
<b>2</b>	2705242	1,528
<b>3</b>	2707715	1,527
<b>4</b>	2715335	1,528
<b>5</b>	2709051	1,523
<b>6</b>	2713528	1,524
<b>N</b>	6	6
$\bar{x}$	2704559	1,526
<b>S</b>	5366,611	0,0021
<b>RSD (%)</b>	0,20	0,14

Požadavek – relativní směrodatná odchylka *RSD* <1 % byla vyhovující.

tabulka 10 – opakovatelnost analýzy pro permetrin

<b>PERMETRIN</b>		
<b>Číslo pokusu</b>	<b>Plocha píku (A)</b>	<b>Retenční čas (<math>t_R</math>) (min)</b>
<b>1</b>	12311109	3,614
<b>2</b>	12304987	3,615
<b>3</b>	12304313	3,616
<b>4</b>	12312509	3,616
<b>5</b>	12319991	3,612
<b>6</b>	12321288	3,612
<b>N</b>	6	6
$\bar{x}$	12306803	3,614
<b>S</b>	7192,269	0,0018
<b>RSD (%)</b>	0,06	0,05

Požadavek – relativní směrodatná odchylka *RSD* <1 % byla vyhovující.

### 4.7.3 Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku Arpalit® Neo spray (číslo šarže: V06-06\*09/2007), které byly připraveny postupem uvedeným v kap. 4.3.

Obsah fenoxycarbu, resp. permetrinu ( $c_v$ ; %) byl vypočten z naměřených hodnot podle vzorce:

$$c_v = \frac{A_v \cdot c_s \cdot K}{A_s \cdot n \cdot 50}, \text{ kde}$$

$c_v$  – obsah účinné látky v %;

$A_v$  – plocha píku vzorku;

$A_s$  – plocha píku standardu (fenoxycarb:  $A_s = 1537041$ ; permetrin:  $A_s = 7029539$ );

$c_s$  – koncentrace standardu

(fenoxycarb:  $c_s = 0,06$  mg/ml; permetrin:  $c_s = 0,24$  mg/ml);

$n$  – navážka vzorku v g;

$K$  – korekce na čistotu suroviny (obsah účinné látky v surovině –

fenoxycarb:  $K = 96,75$  %; permetrin:  $K = 97,45$  %).

tabulka 11 – přesnost metody

Vzorek	Navážka (g)	$A_v$ (fenoxycarb)	$A_v$ (permetrin)	$c$ (fenoxycarb)	$c$ (permetrin)
1	0,8189	1465517	7358919	0,135	0,598
2	0,7971	1431982	7166403	0,136	0,598
3	0,7958	1434264	7188335	0,136	0,601
4	0,7997	1451720	7310920	0,137	0,608
5	0,7900	1417652	7138772	0,136	0,601
6	0,7812	1406646	7079830	0,136	0,603
<b>n</b>				6	6
$\bar{x}$				0,1360	0,6015
<b>s</b>				0,0006	0,0037
<b>RSD (%)</b>				0,46	0,62

Požadavek – relativní směrodatná odchylka  $RSD < 5$  % byl splněn.

#### 4.7.4 Správnost

Byly změřeny roztoky dvou vzorků různé šarže připravených postupem uvedeným v kap. 4.3 a z naměřených výsledků byly vypočítány jejich koncentrace: fenoxycarb:  $c = 0,136$  g/100 ml; permetrin:  $c = 0,602$  g/100 ml.

Dále byly analyzovány vzorky (fenoxycarb + permetrin) s přídavkem 1 ml roztoku standardu o koncentraci  $c_0$  (fenoxycarb:  $c_0 = 0,14999$  g/100ml; permetrin:  $c_0 = 0,59992$  g/100ml).

Obsah standardu byl vypočten podle vzorce:

$$f \text{ (resp. } p) = c_{\text{vzorek+standard}} - c_{\text{vzorek}}$$

Výtěžnost  $F$  (resp.  $P$ ) byla vypočtena podle vzorce:

$$F \text{ (resp. } P) = 100 \cdot \frac{f \text{ (resp. } p)}{c_0}, \text{ kde}$$

$f$  (resp.  $p$ ) – koncentrace standardu stanovená pomocí HPLC;

$c_0$  – koncentrace vloženého standardu.

tabulka 12 – správnost metody

	Vzorek	Vzorek + standard				Standard			
	navážka (g)	$A_v$ (fenoxycarb)	$A_v$ (permetrin)	$c$ (fenoxycarb)	$c$ (permetrin)	$f$	$p$	$F$ (%)	$P$ (%)
1	0,7893	2983323	14012765	0,285	1,181	0,149	0,580	99,34	96,60
2	0,784	2955768	13887539	0,285	1,179	0,149	0,578	99,34	96,26

Požadavek – výtěžnost  $F$  (resp.  $P$ ) v intervalu  $100 \pm 5$  % vyhovuje.



#### 4.7.5 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo provedeno u roztoku o složení:

- a) fenoxycarb ( $c = 5,999 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ )
- b) permetrin ( $c = 23,997 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ )

**Vliv složení mobilní fáze** byl testován při změnách poměru dvou složek zastoupených v mobilní fázi – acetonitrilu a vody, a to v poměrech **60:40**, **65:35**, **70:30**. Každá mobilní fáze byla proměřena dvakrát.

a) *Vliv na plochu chromatografických píků*

$$A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{65:35}}, \text{ kde}$$

$A_i$  – plocha píku za testovaných podmínek;

$A_{65:35}$  – plocha píku za standardních podmínek.

Byly získány výsledky uvedené v tabulkách 13 a 14. Relativní plocha píku vztážená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 99,75 % až 100,70 % u fenoxycarbu a 98,13 % až 99,96 % u permetrinu. V uvedeném rozmezí neovlivňují změny v poměru složek mobilní fáze stanovení fenoxycarbu ani permetrinu.

**tabulka 13 - vliv složení mobilní fáze na plochu píku (fenoxycarb)**

Acetonitril - Voda	Fenoxycarb	
	$A_i$	$A_R$ (%)
<b>60:40</b>	1536876	100,70
<b>65:35</b>	1526246	100,00
<b>70:30</b>	1522367	99,75

tabulka 14 - vliv složení mobilní fáze na plochu píku (permetrin)

Acetonitril - Voda	Permetrin	
	$A_i$	$A_R$ (%)
60:40	6880835	98,13
65:35	7011877	100,00
70:30	7008911	99,96

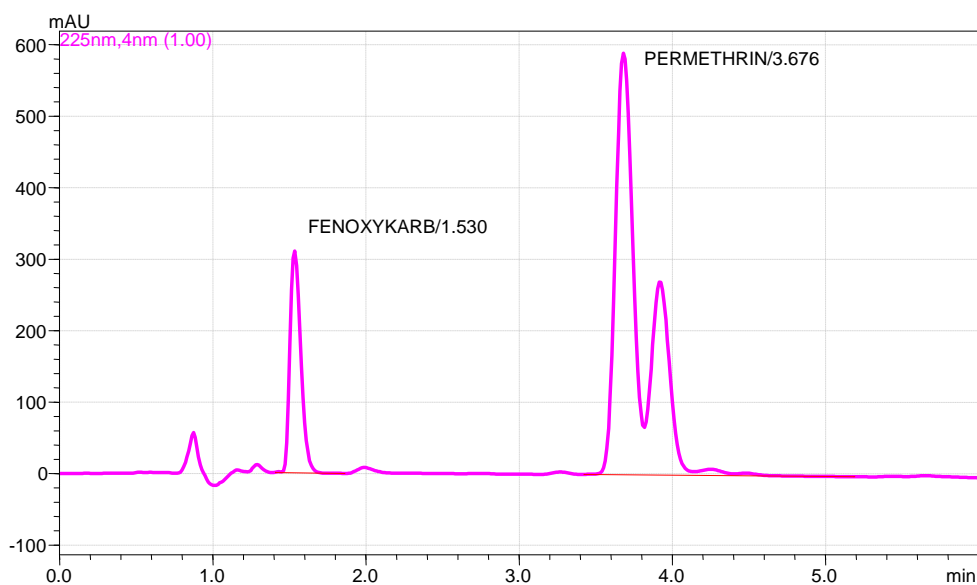
b) *Vliv na retenční čas*

V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, ale složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití mobilní fáze acetonitril – voda (65:35).

tabulka 15 - vliv složení mobilní fáze na retenční čas (fenoxykarb, permetrin)

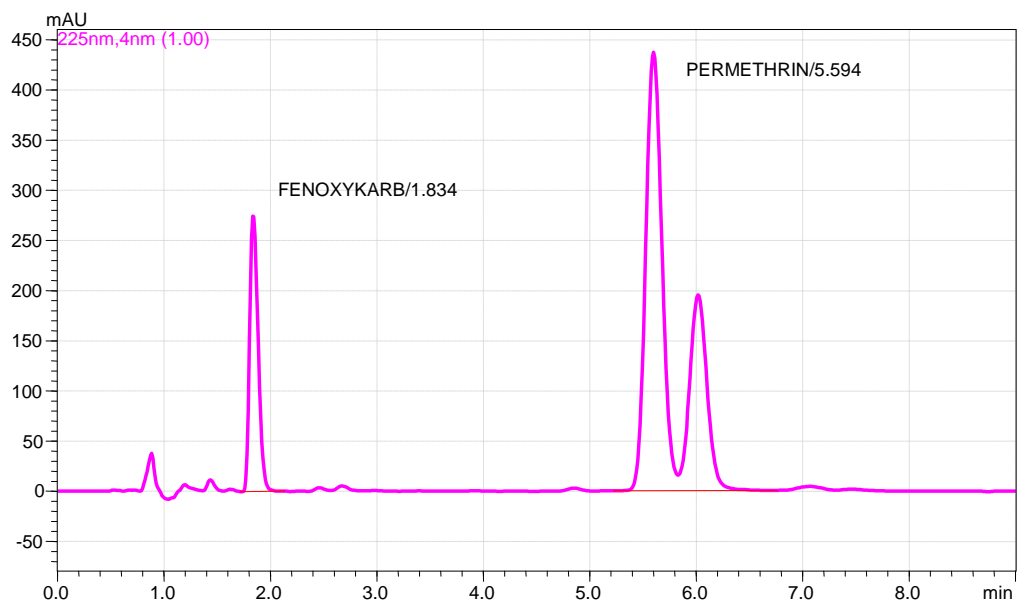
Acetonitril - Voda	$t_R$ (min)	
	Fenoxykarb	Permetrin
60:40	1,83	5,59
65:35	1,53	3,68
70:30	1,35	2,61

Obrázek 23 - chromatogram separace za podmínek: acetonitril – voda (65:35)



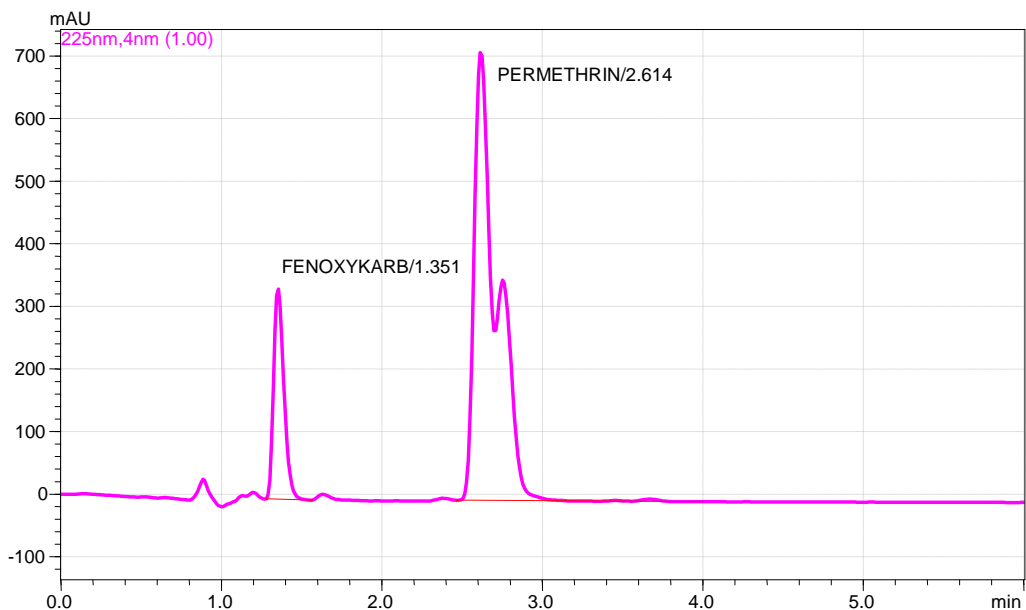
Na obrázku 24 je znázorněn chromatogram za podmínek acetonitril – voda (60:40) (hranice testovacího rozmezí), a jak je zřejmé, separace fenoxycarbu a permetrinu je až k základní linii, pouze dochází k prodloužení doby analýzy.

**Obrázek 24 - chromatogram separace za podmínek: acetonitril – voda (60:40)**



Na obrázku 25 je znázorněn chromatogram za podmínek acetonitril – voda (70:30) (hranice testovacího rozmezí). Separace fenoxycarbu a permetrinu je až k základní linii, pouze dochází ke zkrácení doby analýzy.

**Obrázek 25 - chromatogram separace za podmínek: acetonitril – voda (70:30)**



**Vliv teploty** byl testován při 30 °C pro srovnání s původní teplotou 70 °C. Každá teplota byla proměřena dvakrát za podmínek složení mobilní fáze acetonitril – voda v poměru 65:35.

**tabulka 16 – vliv teploty na retenční čas**

Teplota (°C)	$t_R$ (min)	
	Fenoxykarb	Permetrin
30	1,96	6,19
70	1,53	3,68

Bylo zjištěno, že se významně prodlužuje pouze retenční čas permetrinu. Změny v plochách obou píků nebyly větší než  $\pm 5\%$  v porovnání s analýzou při 70 °C.

## **4.8 Stanovení obsahu fenoxycykarbu a permetrinu ve vzorcích přípravku Arpalit® Neo**

Podle postupů uvedených v kap. 4.2 a 4.3 byly připraveny směsný roztok standardů fenoxycykarbu a permetrinu a dva vzorky z každé šarže mechanického rozprašovače, spraye a pěny. U každého roztoku byly provedeny dvě analýzy. Z naměřených hodnot byl vypočítán obsah fenoxycykarbu, resp. permetrinu podle následujících vzorců:

Mechanický rozprašovač, spray:

$$c_v = \frac{A_v \cdot c_s \cdot K}{A_s \cdot n \cdot 50}$$

Pěna:

$$c_v = \frac{A_v \cdot c_s \cdot K \cdot 2}{A_s \cdot n \cdot 50 \cdot 0,79}, \text{ kde}$$

$c_v$  – obsah fenoxycykarbu, resp. permetrinu v %;

$A_v$  – plocha píku vzorku;

$A_s$  – plocha píku standardu (fenoxycykarb:  $A_s = 1537041$ ; permetrin:  $A_s = 7029539$ );

$c_s$  – koncentrace standardu

(fenoxycykarb:  $c_s = 0,06$  mg/ml; permetrin:  $c_s = 0,24$  mg/ml);

$n$  – navážka vzorku v g;

$K$  – korekce na čistotu suroviny (obsah účinné látky v surovině –

fenoxycykarb:  $K = 96,75$  %; permetrin:  $K = 97,45$  %).

Získané výsledky byly srovnány s původní metodou danou interním předpisem č. 71 Katedry analytické chemie Faf UK HK [39].

### **4.8.1 Analýza vzorků přípravku Arpalit® Neo mechanický rozprašovač**

Byl k dispozici přípravek Arpalit® Neo mechanický rozprašovač vyrobený ve třech šaržích: A = V05-04\*07/2007; B = V05-06\*09/2007; C = V05-03\*06/2007.

tabulka 17 - analýza vzorků přípravku Arpalit® Neo mechanický rozprašovač

Vzorek	Navážka (g)	A <sub>v</sub> (fenoxykarb)	A <sub>v</sub> (permetrin)	c (fenoxykarb)	c (permetrin)
A1	0,8204	1739535	7777284	0,161	0,629
A2	0,8140	1744153	7799101	0,163	0,636
B1	0,8038	1541206	7710472	0,146	0,637
B2	0,7089	1360828	6829744	0,146	0,640
C1	0,8011	1578039	7275845	0,150	0,603
C2	0,8070	1593863	7344088	0,150	0,604

#### 4.8.2 Analýza vzorků přípravku Arpalit® Neo spray

Byl k dispozici přípravek Arpalit® Neo spray vyrobený ve třech šaržích:

D = V06-04\*07/2007; E = V06-05\*07/2007; F = V06-03\*06/2007.

tabulka 18 - analýza vzorků přípravku Arpalit® Neo spray

Vzorek	Navážka (g)	A <sub>v</sub> (fenoxykarb)	A <sub>v</sub> (permetrin)	c (fenoxykarb)	c (permetrin)
D1	0,8024	1616080	7372470	0,153	0,610
D2	0,8030	1629649	7449287	0,154	0,616
E1	0,7988	1524189	6743697	0,145	0,561
E2	0,7940	1520974	6747449	0,145	0,564
F1	0,7952	1524511	7053021	0,146	0,589
F2	0,7990	1537267	7097405	0,146	0,590

#### 4.8.3 Analýza vzorků přípravku Arpalit® Neo pěna

Byl k dispozici přípravek Arpalit® Neo pěna vyrobený ve dvou šaržích:

PA = V07-03\*07/2007; PB = V07-04\*09/2007.

tabulka 19 – analýza vzorků přípravku Arpalit® Neo pěna

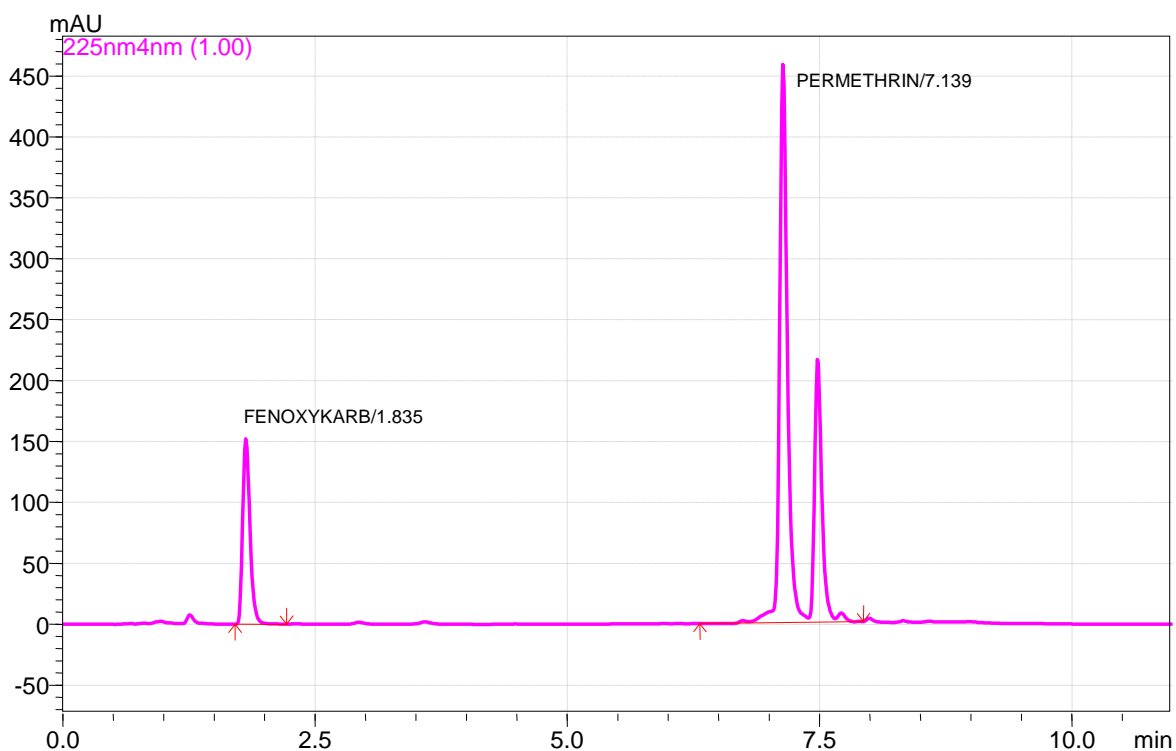
Vzorek	Navážka (g)	A <sub>v</sub> (fenoxykarb)	A <sub>v</sub> (permetrin)	c (fenoxykarb)	c (permetrin)
PA1	2,7552	1640406	8885248	0,114	0,542
PA2	1,6030	948819	5233379	0,114	0,549
PB1	3,0578	1927673	10093309	0,122	0,554
PB2	1,8039	1134944	6034008	0,122	0,562

#### 4.8.4 Srovnání původní a nové metody stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu v přípravku Arpalit® Neo

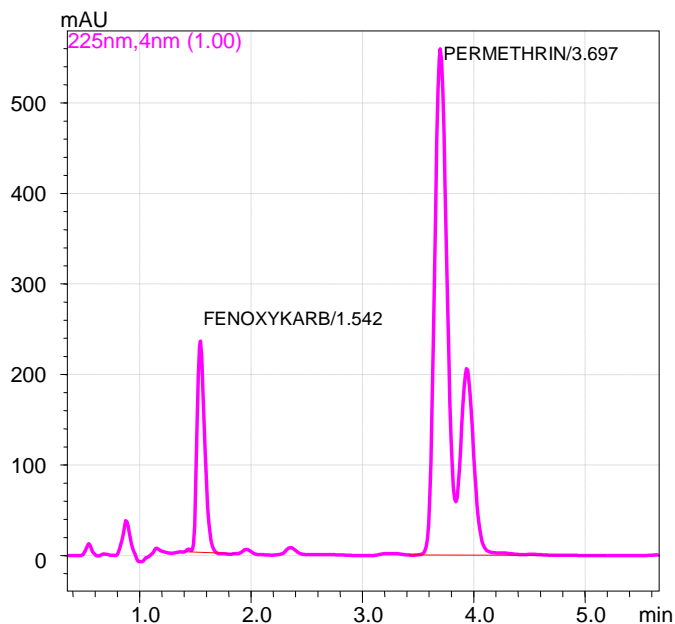
tabulka 20 - podmínky separace – srovnání metod

	Původní metoda	Nová metoda
<b>kolona</b>	Chromolith Performance RP-18, 100 x 4,6 mm, s předkolonou 10mm	HS F5, 100 x 4 mm, 3µm částice
<b>dávkování</b>	10 µl	2 µl
<b>mobilní fáze</b>	A = acetonitril - voda (60:40), B = acetonitril	acetonitril - voda (65:35)
<b>typ eluce</b>	gradient (od 3. do 8. minuty z 0% na 90% B)	izokratická
<b>průtok</b>	2,0 ml/min	1,0 ml/min
<b>teplota</b>	30 °C	70 °C
<b>čas analýzy</b>	11 min	5 min

Obrázek 26 - chromatogram separace fenoxycarbu a permetrinu původní metodou



Obrázek 27 - chromatogram separace fenoxycarbu a permetrinu novou metodou



tabulka 21 - srovnání výsledků naměřených původní a novou metodou

Forma	Vzorek	Šarže	Původní metoda		Nová metoda	
			průměrná koncentrace v g/100g		průměrná koncentrace v g/100g	
			fenoxycarb	permetrin	fenoxycarb	permetrin
mechanický rozprašovač	A	V05-04*07/2007	0,154	0,584	0,162	0,633
	B	V05-06*09/2007	0,143	0,616	0,146	0,639
	C	V05-03*06/2007	0,160	0,619	0,150	0,604
spray	D	V06-04*07/2007	0,153	0,577	0,154	0,613
	E	V06-05*07/2007	0,146	0,538	0,145	0,563
	F	V06-03*06/2007	0,150	0,574	0,145	0,590
pěna	PA	V07-03*07/2007	0,130	0,531	0,114	0,546
	PB	V07-04*09/2007	0,130	0,561	0,122	0,558

Požadavky dané interním předpisem jsou pro fenoxycarb 0,14 – 0,16 % a pro permetrin 0,57 – 0,63 %. Šedě jsou v tabulce znázorněny výsledky stanovení odpovídající předepsanému rozmezí koncentrací.



## 4.8.5 Statistické srovnání výsledků

Statistické srovnání výsledků obou metod bylo provedeno pomocí programu QC Expert. Z tabulek je zřejmé, že hodnoty výsledků měřených vzorků získané oběma metodami nejsou statisticky rozdílné, tudíž metody poskytují shodné výsledky.

tabulka 22, 23 – výsledky statistického srovnání hodnot

Porovnání dvou výběrů			Porovnání dvou výběrů		
FENOXYKARB			PERMETRIN		
Název úlohy :			Název úlohy :		
Hladina významnosti :	0.05		Hladina významnosti :	0.05	
Porovnávané sloupce :	<b>Fenoxykarb 1</b>	<b>Fenoxykarb 2</b>	Porovnávané sloupce :	<b>Permetrin 1</b>	<b>Permetrin 2</b>
Počet dat :	8	8	Počet dat :	8	8
Průměr :	145.75	142.25	Průměr :	575	593.25
Směr. odchylka :	10.99025542	16.14886108	Směr. odchylka :	32.0802565	35.00918247
Rozptyl :	120.7857143	260.7857143	Rozptyl :	1029.142857	1225.642857
Korel. koef. R(x,y) :	0.905131616	Významná korelace!	Korel. koef. R(x,y) :	0.819285857	Významná korelace!
Test shody rozptylů			Test shody rozptylů		
Poměr rozptylů :	2.159077469		Poměr rozptylů :	1.190935591	
Počet stupňů volnosti :	7	7	Počet stupňů volnosti :	7	7
Kritická hodnota :	3.787043538		Kritická hodnota :	3.787043538	
Závěr :	<b>Rozptyly jsou SHODNÉ</b>		Závěr :	<b>Rozptyly jsou SHODNÉ</b>	
Pravděpodobnost :	0.1657016		Pravděpodobnost :	0.411791699	
Robustní test shody rozptylů			Robustní test shody rozptylů		
Poměr rozptylů :	2.159077469		Poměr rozptylů :	1.190935591	
Redukované stupně volnosti:	3	3	Redukované stupně volnosti :	6	6
Kritická hodnota :	9.276628153		Kritická hodnota :	4.283865714	
Závěr :	<b>Rozptyly jsou SHODNÉ</b>		Závěr :	<b>Rozptyly jsou SHODNÉ</b>	
Pravděpodobnost :	0.271773724		Pravděpodobnost :	0.418711503	
Test shody průměrů			Test shody průměrů		
pro SHODNÉ rozptyly			pro SHODNÉ rozptyly		
t-statistika :	0.506786589		t-statistika :	1.087064279	
Počet stupňů volnosti :	14		Počet stupňů volnosti :	14	
Kritická hodnota :	2.144786688		Kritická hodnota :	2.144786688	
Závěr :	<b>Průměry jsou SHODNÉ</b>		Závěr :	<b>Průměry jsou SHODNÉ</b>	
Pravděpodobnost :	0.620192345		Pravděpodobnost :	0.295370453	
Test shody průměrů			Test shody průměrů		
pro ROZDÍLNÉ rozptyly			pro ROZDÍLNÉ rozptyly		
t-statistika :	0.506786589		t-statistika :	1.087064279	
Redukované stupně volnosti:	12		Redukované stupně volnosti :	14	
Kritická hodnota :	2.17881283		Kritická hodnota :	2.144786688	
Závěr :	<b>Průměry jsou SHODNÉ</b>		Závěr :	<b>Průměry jsou SHODNÉ</b>	
Pravděpodobnost :	0.621487672		Pravděpodobnost :	0.295370453	
Test dobré shody rozdělení			Test dobré shody rozdělení		
dvouvýběrový K-S test			dvouvýběrový K-S test		
Diference DF :	0.25		Diference DF :	0.375	
Kritická hodnota :	0.679050758		Kritická hodnota :	0.679050758	
Závěr :	<b>Rozdělení jsou SHODNÁ</b>		Závěr :	<b>Rozdělení jsou SHODNÁ</b>	

## 5 Závěr

Byla optimalizována a validována HPLC metoda určená pro stanovení fenoxycarbu a permetrinu v přípravku Arpalit<sup>®</sup> Neo mechanický rozprašovač, Arpalit<sup>®</sup> Neo spray a Arpalit<sup>®</sup> Neo pěna.

Byly nalezeny tyto optimální chromatografické podmínky HPLC metody s UV detekcí pro stanovení fenoxycarbu a permetrinu:

<i>Kolona:</i>	HS F5, 100 x 4 mm, 3 $\mu$ m částice
<i>Dávkování:</i>	2 $\mu$ l
<i>Detekce:</i>	UV, 225 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	Acetonitril – Voda (65:35)
<i>Typ eluce:</i>	Izokratická
<i>Průtok mobilní fáze:</i>	1,0 ml/min
<i>Teplota:</i>	70 °C
<i>Čas analýzy:</i>	5 min
<i>Vyhodnocení:</i>	Chromatografický software LC Solution

Byla testována vhodnost chromatografického systému. Účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater  $N$  byla splněna pro obě analyzované látky ( $N = 1640$  pro fenoxycarb,  $N = 4006$  pro permetrin). Asymetrie chromatografických píků vyjádřena faktorem  $A_S$  byla u fenoxycarbu 1,404 a u permetrinu 2,201 (protože byl vyhodnocen jako dvojpík). Rozlišení chromatografických píků fenoxycarbu a permetrinu  $R_S$  bylo 11,012. Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka  $RSD$  byla u fenoxycarbu 0,20 % a u permetrinu 0,06 %.

U testování parametru linearity bylo vyhověno požadavku na hodnotu korelačního koeficientu  $r > 0,9990$  pro fenoxycarb ( $r = 0,999985$ ) i pro permetrin ( $r = 0,999981$ ).

Byla hodnocena přesnost metody a požadavek na relativní směrodatnou odchylku  $RSD < 5$  % byl splněn (byla zjištěna  $RSD$  pro fenoxycarb 0,46 % a  $RSD$  pro permetrin 0,62 %).

Správnost stanovení je vyjádřena veličinou výtěžnost ( $F$ , resp.  $P$ ). Požadavek, aby se hodnota výtěžnosti  $F$  (resp.  $P$ ) pohybovala v rozmezí  $100 \pm 5$  % byl splněn pro obě látky. Její hodnoty se pohybovaly v intervalu od 99,34 % do 99,34 % pro fenoxycarb a od 96,26 % do 96,60 % pro permetrin.

Testování robustnosti prokázalo vhodnost teploty a mobilní fáze, složené z acetonitrilu a vody (65:35). V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, složení mobilní fáze a výše teploty pouze ovlivňují dobu trvání analýzy.

Všechny sledované parametry validace metody vyhovují požadavkům na ně kladeným. Tato metoda může být používána při rutinní kontrole a hodnocení kvality přípravku Arpalit<sup>®</sup> Neo. Metoda nevykazuje statisticky významné rozdíly ve výsledcích v porovnání s původní metodou.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] [http://www.aveflor.cz/arpalit\\_neo.php](http://www.aveflor.cz/arpalit_neo.php) (leden 2009)
- [2] <http://www.chemblink.com/products/72490-01-8.htm> (prosinec 2008)
- [3] <http://extoxnet.orst.edu/pips/fenoxycarb.htm> (leden 2009)
- [4] Lamka J., Ducháček L.: Veterinární vademecum pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2007
- [5] [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC33190](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33190)  
(prosinec 2008)
- [6] [http://www.eurochem.cz/index/toxi/369\\_2405.htm](http://www.eurochem.cz/index/toxi/369_2405.htm) (leden 2009)
- [7] <http://extoxnet.orst.edu/pips/permethr.htm> (leden 2009)
- [8] [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC35397](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35397)  
(prosinec 2008)
- [9] <http://en.wikipedia.org/wiki/Permethrin> (prosinec 2008)
- [10] Lamka J., Ducháček L.: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 2006
- [11] Insecticide factsheet: Permethrin, Journal of pesticide reform, Vol. 18, No. 2, Summer 1998
- [12] [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/permethrin\\_fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/permethrin_fs.htm)  
(leden 2009)
- [13] Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- [14] Klimeš J., Sochor J., Mokřý M.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- [15] Klouda P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda, Ostrava, 2003
- [16] Český lékopis 2005, Grada Publishing a.s., Praha 2005
- [17] <http://www.sweb.cz/HPLC/> (prosinec 2008)
- [18] International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on validation of analytical procedures, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995
- [19] Chocholouš P., Šatínský D., Sladkovský R., et al.: Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column, Talanta 77 (2) (2008) 566–570

- [20] Liu M., Yang H., Liu Hx., et al.: Development of high-performance liquid chromatography and non-aqueous capillary electrophoresis methods for the determination of fenoxycarb residues in wheat samples, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (1) (2008) 62-67
- [21] Maloschik E., Ernst A., Hegedűs G., et al.: Monitoring water-polluting pesticides in Hungary, *Microchemical Journal* 85 (1) (2007) 88–97
- [22] Natangelo M., Tavazzi S., Fanelli R., et al.: Analysis of some pesticides in water samples using solid-phase microextraction–gas chromatography with different mass spectrometric techniques, *Journal of Chromatography A* 859 (2) (1999) 193–201
- [23] Reyzer M.L., Brodbelt J.S.: Analysis of fire ant pesticides in water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry or high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 436 (1) (2001) 11–20
- [24] Le H.T.M., Szurdoki F., Szekacs A.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the insect growth regulator fenoxycarb in environmental and biological samples, *Pest Management Science* 59 (4) (2003) 410-416
- [25] Giraudi G., Giovannoli C., Baggiani C., et al.: Enzyme immunoassay for the determination of the insecticide fenoxycarb, *Analytical Communications* 35 (6) (1998) 183-185
- [26] García E., García A., Barbas C.: Validated HPLC method for quantifying permethrin in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 (5-6) (2001) 999–1004
- [27] Abu-Qare A.W., Abou-Donia M.B.: Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2) (2001) 291–299
- [28] Leon-Gonzales M.E., Plaza-Arroyo M., Perez-Arribas L.V., et al.: Rapid analysis of pyrethroids in whole urine by high-performance liquid chromatography using a monolithic column and off-line preconcentration in

- a restricted access material cartridge, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2) (2005) 527-531
- [29] Yang Gs., Vázquez P.P., Frenich A.G., et al.: Separation and simultaneous determination of enantiomers of tau-fluvalinate and permethrin in drinking water, *Chromatographia* 60 (9-10) (2004) 523-526
- [30] Galera M.M., García M.D.G., Valverde R.S.: Determination of nine pyrethroid insecticides by high-performance liquid chromatography with post-column photoderivatization and detection based on acetonitrile chemiluminescence, *Journal of Chromatography A* 1113 (1-2) (2006) 191-197
- [31] Vázquez P.P., Mughari A.R., Galera M.M.: Application of solid-phase microextraction for determination of pyrethroids in groundwater using liquid chromatography with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* 1188 (2) (2008) 61-68
- [32] Vázquez P.P., Mughari A.R., Galera M.M.: Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta* 607 (1) (2008) 74-82
- [33] Chen Tw., Chen Gn.: Identification and quantitation of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (12) (2007) 1848-1854
- [34] Akre Ch.J., MacNeil J.D.: Determination of eight synthetic pyrethroids in bovine fat by gas chromatography with electron capture detection, *Journal of AOAC International* 89 (5) (2006) 1425-1431
- [35] Angerer J., Ritter A.: Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 695 (2) (1997) 217-226

- [36] Kristenson E.M., Shahmiri S., Slooten C.J., et al.: Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC-MS analysis, *Chromatographia* 59 (5-6) (2004) 315-320
- [37] Leng G., Kühn K., Idel H.: Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: Applications and limitations, *Science of the Total Environment* 199 (1-2) (1997) 173-181
- [38] Ševčík J., Lemr K., Stránský Z., et al.: Possible uses of micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography for the chiral discrimination of some pyrethroids, *Chirality* 9 (2) (1997) 162-166
- [39] Interní předpis č. 71: Stanovení obsahu fenoxycarbu a permethrinu v konečném produktu ARPALIT<sup>®</sup> Neo spray, MR a pěna metodou HPLC, Katedra analytické chemie, Kontrolní laboratoř 541, Faf UK HK