

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

**HPLC STANOVENÍ VYBRANÝCH INSEKTICIDŮ
V KOSMETICKÉM PŘÍPRAVKU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Hradec Králové 2012

Daniela Kameníčková

Děkuji doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za cenné rady, připomínky a pomoc při vypracování této práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne:

Daniela Kameníčková

Abstrakt

Byly stanovovány účinné složky fenoxycarb a permetrin v kosmetickém přípravku Arpalit® Neo šampon proti parazitům s bambusovým extraktem. Analýza byla provedena metodou HPLC za využití kolony RP-Amide o rozměrech 100 x 3 mm s velikostí částic 2,7 μm a detekce pomocí UV při vlnové délce 225 nm. Separace probíhala za izokratické eluce s mobilní fází acetonitril – voda v poměru 55:45 průtokovou rychlostí 1,0 ml/min. Teplota při průběhu měření byla 60 °C. Pro vyhodnocení byla použita metoda vnitřního standardu, kdy jako vnitřní standard bylo použito barvivo sudan II. Pro separaci byl potřeba časový interval 6 min. Retenční čas fenoxycarbu byl 1,01, sudanu II 2,87 a permetrinu 4,42 min. Rozlišení chromatografických píků fenoxycarbu a sudanu II bylo 10,612 a sudanu II a permetrinu 6,524.

Klíčová slova: fenoxycarb, permetrin, HPLC.

Abstract

Active ingredients fenoxycarb and permethrin were determined in cosmetic anti-parasitic product Arpalit[®] Neo shampoo against parasites with bamboo extract. Analysis was performed by HPLC using RP-Amide column 100 x 3 mm with a particle size of 2.7 micron and detection by UV at a wavelength of 225 nm. Separation proceeded by isocratic elution with mobile phase of acetonitrile - water (55:45) at a flow rate 1.0 ml/min. Temperature during measurement was 60 °C. For evaluation method was used an internal standard method, as the internal standard was used dye sudan II. For separation was needed time interval of 6 min. The retention time of fenoxycarb was 1.01, sudan II 2.87 and permethrin 4.42 min. Resolution of chromatographic peaks fenoxycarb and sudan II was 10.612 and sudan II and permethrin 6.524.

Keywords: fenoxycarb, permethrin, HPLC.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Arpalit[®] Neo šampon proti parazitům s bambusovým extraktem	10
3.1.1	Fenoxykarb	10
3.1.2	Permetrin	11
3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC	13
3.2.1	Schéma kapalinového chromatografu	13
3.3	Kolony používané v HPLC	17
3.3.1	Fused-Core technologie	18
3.3.2	HS F5 kolony a jejich využití	19
3.3.3	RP-Amide kolona	20
3.4	Metoda vnitřního standardu	22
3.4.1	Sudan II	23
3.5	Analytické stanovení fenoxykarbu a permetrinu	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Materiály a pomůcky	25
4.1.1	Standardy, vzorky a chemikálie	25
4.1.2	Přístroje, podmínky separace	25
4.2	Příprava roztoku vnitřního standardu	26
4.3	Příprava roztoku standardů fenoxykarbu a permetrinu	26
4.4	Příprava vzorku šamponu Arpalit Neo	27
4.5	Popis práce	27

4.6	Optimalizace chromatografických podmínek	28
4.6.1	Optimalizace složení mobilní fáze v závislosti na typu kolony	28
4.6.2	Hledání vnitřního standardu	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1	Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu	33
5.2	Test vhodnosti chromatografického systému	33
5.2.1	Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater (N)	33
5.2.2	Faktor symetrie chromatografických píků (A_s)	34
5.2.3	Rozlišení chromatografických píků (R_s)	35
5.3	Validace analytické metody	36
5.3.1	Linearita	36
5.3.2	Opakovatelnost	38
5.3.3	Přesnost	41
5.3.4	Správnost	43
5.3.5	Robustnost	45
5.4	Stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu ve vzorku přípravku Arpalit[®] Neo šampon	50
6	ZÁVĚR	51
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

1 Úvod

Kosmetický přípravek Arpalit[®] Neo šampon proti parazitům s bambusovým extraktem je určen pro kožešinová zvířata. Je lokálně využíván proti ektoparazitům a obsahuje dvě účinné látky – insekticid fenoxycarb a pyretroid permetrin.

Tato práce se zabývá stanovením těchto dvou účinných látek ve výše zmíněném přípravku.

2 Cíl a zadání diplomové práce

Tato diplomová práce se zabývá stanovením účinných látek fenoxycykarbu a permetrinu v kosmetickém přípravku za použití metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro zpřesnění výsledků byla použita metoda vnitřního standardu, kdy bylo jako vnitřního standardu použito složky barviva sudanové červeně.

Cílem práce bylo najít vhodné podmínky pro separaci, zvolit správný typ kolony, složení mobilní fáze a vhodnou teplotu, přitom bylo třeba zachovat přesnost a spolehlivost metody za použití vhodného času pro analýzu. Poté, co byly zvoleny vhodné podmínky separace, byla metoda validována a stanoven obsah účinných látek v daném kosmetickém přípravku.

3 Teoretická část

3.1 Arpalit[®] Neo šampon proti parazitům s bambusovým extraktem

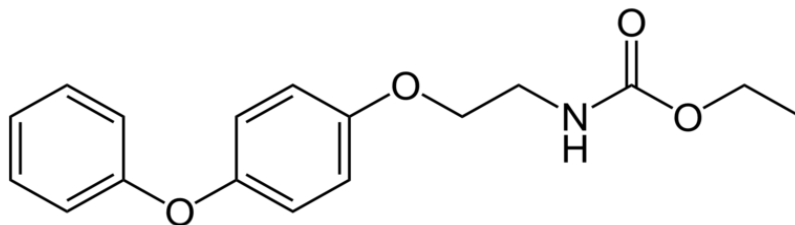
Arpalit[®] Neo šampon je určen pro mytí srsti kožešinových zvířat s ovicidním a larvicidním účinkem proti ektoparazitům, jako jsou blechy, klíšťata, vši a všenky. Je vhodný pro dospělá zvířata i pro mláďata od 2 měsíců věku. Pro prodloužení jeho antiparazitického účinku je možno jej kombinovat s dalšími přípravky, jako např. Arpalit[®] Neo spray, Arpalit[®] Neo pěna, nebo Arpalit[®] Neo spray s mechanickým rozprašovačem [1].

Hlavními účinnými látkami jsou fenoxycarb a permetrin (viz. kap. 3.1.1-2). Kombinace těchto látek je výhodná, protože zatímco fenoxycarb inhibuje vývoj vajíček a larev a nepůsobí na dospělé, permetrin naopak působí kontaktně adulticidně [2].

Kromě těchto látek šampon obsahuje také výtažek z bambusu, který posiluje strukturu kůže a srsti. Aby nedocházelo k dehydrataci a dráždění kůže, je v šamponu obsažen také olivový olej a elastin. Dále je šampon obohacen o vitaminy B₃ a B₅, které zlepšují kvalitu kůže i srsti [1].

3.1.1 Fenoxycarb

Obrázek č. 1 - strukturní vzorec fenoxycarbu



Sumární vzorec:

C₁₇H₁₉NO₄

Chemický název:

Ethyl N-[2-[4-(phenoxy)phenoxy]ethyl]carbamate

CAS:

72490-01-8

Molekulová hmotnost: 301,34

Fyzikální a chemické vlastnosti: bezbarvá až bílá krystalická látka s nepatrným charakteristickým zápachem

teplota tání 53-54 °C

teplota varu 224 °C [3]

rozpuštnost ve vodě 6 mg/l při 20 °C

rozpuštnost v acetonu, chloroformu, diethyletheru a methanolu cca 250 g/kg při 25 °C [4]

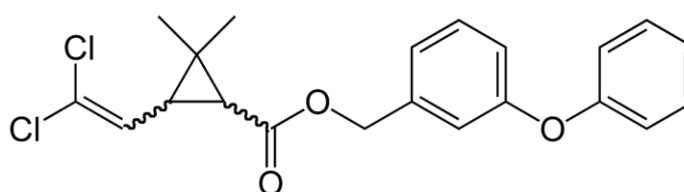
Mechanismus účinku:

Fenoxykarb je polycyklický non-neurotoxický agonista juvenilních hormonů. Patří mezi insekticidy skupiny karbamátů, ale na rozdíl od N-methylovaných a N-ethylovaných karbamátů nepůsobí jako inhibitor acetylcholinesterasy. Jeho mechanismus účinku je založen na regulaci růstu hmyzu. Způsobují zánik vajíček a mají vliv na metamorfózu larvy, což narušuje biologický cyklus hmyzu [2].

Toxicita, osud v organismu, a další informace byly již podrobně komentovány v diplomové práci Petry Švestkové [5].

3.1.2 Permetrin

Obrázek č. 2 - strukturní vzorec permetrinu



Sumární vzorec: C₂₁H₂₀Cl₂O₃

Chemický název: (3-phenoxyphenyl)methyl-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate

CAS:	52645-53-1
Molekulová hmotnost:	391,29 [6]
Fyzikální a chemické vlastnosti:	bezbarvé krystaly až nažloutlá viskózní tekutina
	teplota tání 34 °C
	teplota varu 200 °C
	hustota 1,19 – 1,27 g/cm ³
	vyskytuje se jako směs 63 - 65% cis-isomerů a 45 - 47% trans-isomerů [7]
	rozpustný ve všech organických rozpouštědlech kromě etylenglykolu [8]

Mechanismus účinku:

Permetrin je syntetický pyretroid, který se vyznačuje nízkou toxicitou vůči savcům a vyšší insekticidní účinností oproti přirozeným pyretrinům [7]. Ovlivňují iontové kanály nervových vláken parazitů, takže působí silně paralyticky na jejich nervovou soustavu. Permetrin se také vyznačuje repelentní aktivitou [2].

Toxicita, osud v organismu, a další informace byly již podrobně komentovány v diplomové práci Petry Švestkové [5].

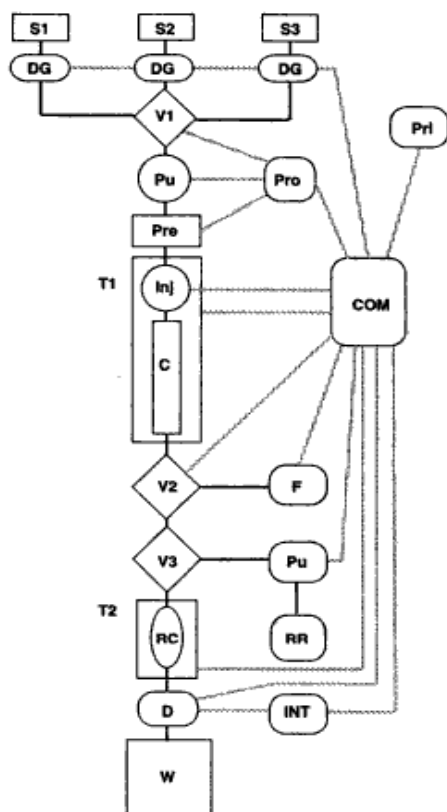
3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC

HPLC patří mezi nejčastější separační metody analýzy ve farmacii. Je založena na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. První z nich je mobilní (pohyblivá) fáze, která jako kapalina prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. Druhá je fáze stacionární, nepohyblivá. Dělení analytu je založeno na rozdílné afinitě jeho složek vůči těmto fázím. HPLC je založena zejména na principu adsorpce, rozdělování, výměny iontů, vylučování nebo stereochemických interakcí [9].

3.2.1 Schéma kapalinového chromatografu

Na obrázku č. 3 je znázorněno schéma plně digitalizovaného systému. Součásti všech chromatografických systémů jsou v podstatě stejné, avšak liší se technickými parametry a velikostí. Základní pojmy každé ze součástí jsou vysvětleny v následujících odstavcích.

Obrázek č. 3 - schéma kapalinového chromatografu



S₁, S₂ a S₃ – zásobníky rozpouštědla, DG – odplyňovací systém, V₁, V₂ a V₃ – ventily, Pu – čerpadlo, Pre – měřič tlaku, Inj – dávkovač, C – kolona, F – sběrač frakcí, RC – reakční lázeň, RR – reagující reagent, D – detektor, W – odpad, T₁ a T₂ – termostat, COM – počítač, Pro – program rozpouštědel, Pri – tiskárna, INT – integrátor nebo nahrávací zařízení

Čerpací systémy

Mobilní fáze je do chromatografického systému přiváděna čerpadlem z jednoho nebo více zásobníků a protéká obvykle konstantní rychlostí kolonou a poté detektorem. [9] Čerpadlo musí splňovat několik požadavků. Musí zajišťovat konstantní bezpulsní průtok mobilní fáze, který musí být reprodukovatelný za použití tlaku až 50 MPa. Samotný objem čerpadla musí být velmi malý, aby umožnil rychlou eluci a vytvořil přesný gradient. Materiál musí být kompatibilní se všemi typy rozpouštědel, včetně organických rozpouštědel a roztoků silných kyselin a zásad.

Pro zkrácení doby separace je používáno několika metod. Nejlepším způsobem je zvolení vhodné kolony za použití izokratické eluce (tzn., že složení mobilní fáze se v průběhu separace nemění).

Někdy je třeba použít metody zbavující eluáty plynu a to z toho důvodu, že mohou být přesyceni vzduchem, který se posléze uvolňuje ve formě bublinek v kontrolním ventilu čerpadla nebo v průtokové cele detektoru. Lze použít metodu probublání heliového plynu v eluátu nebo metodu on-line vakua. Mechanismy obou způsobů jsou jednoduché, ale častěji je používána druhá zmíněná metoda, především proto, že nevyžaduje helium, které je poměrně drahé. K tomuto mechanismu lze ovšem použít také ultrazvukovou lázeň. Delší odplynění může ovšem způsobit ztrátu těkavějších složek eluátu.

Dávkovací ventil, autosampler

Dávkovací ventil je zařízení, které ke vstřikování využívá buď dávkovací smyčku, nebo vnitřní prostor ventilu. Maximum vstřikovaného objemu závisí na objemu vzorku ve smyčce nebo ve vstřikovacím ventilu. Pro kvantitativní analýzu je základním požadavkem kompletní naplnění prostoru smyčky nebo ventilu vzorkem. Dávkovací ventily mohou být ovládané pneumaticky nebo elektronicky.

Modernizací dávkování byl vznik autosamplerů, které zajišťují největší přesnost a nejvyšší reprodukovatelnost vstřikování. Autosamplery jsou spojeny se zásobníkem vzorku, do kterého jsou umístěny vialky (mikronádobky uzavřené mikropřezovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu). Při separaci dochází k plnění jehly autosampleru a následnému dávkování vzorku na kolonu. Nejmenší možný injekční objem je 1 μ l [10].

Kolona

Viz kapitola (3.3).

Zařízení kontrolující teplotu

Pro zajištění dobré reprodukovatelnosti retenčních časů, je třeba udržovat konstantní teplotu kolony. Běžnými systémy jsou vodní lázeň nebo horkovzdušný termostat. Při použití kolony vyrobené z oceli lze efektivně použít termo-pásku.

Detektor

Jedním z pokroků modernizace HPLC byla automatizace pomocí on-line detektoru. Řada analytických přístrojů byla zapojena jako detektory. Původně byly standardní přístroje uzpůsobeny k monitorování tekutého odpadu z vysoko-účinných kolon. V biomedicínských výzkumech je požadována co nejvyšší možná citlivost a selektivita, což vedlo k zaměření se na specializované přístroje s vysokou kvalitou výkonu. Základní mechanismus je stejný jako u původních přístrojů, ale jsou technicky a elektronicky vylepšeny. Máme několik druhů detektorů.

U spektroskopického detektoru je využíván mechanismus absorpce energie světelného paprsku molekulami chromoforu. Úbytek energie je závislý na koncentraci, konstantě molekulární absorpce molekul analytu a vlnové délce. Nejoblíbenějším druhem tohoto detektoru je ultrafialový absorpční detektor, využívající jako zdroj světla deuteriovou lampu. Mezi další často užívané patří detektor absorbující ve viditelné oblasti, využívající jako zdroj světla lampu s wolframovou žárovkou a častá je také kombinace těchto dvou detektorů. Do této skupiny lze zahrnout taktéž fluorescenční, infračervené a další.

Elektrochemické detektory jsou založeny na principu elektrochemické oxidace či redukce analytu a mohou být použity na analýzu určitých sloučenin, jako např. fenolů. Adsorpce reagujících molekul ovšem může snižovat vodivost, proto se provádí za proměnlivého napětí, které čistí povrch elektrod mezi jednotlivými měření. Pro detekci ionizovaných látek se využívá vodivostní detekce zahrnující měření změn vodivosti vodných roztoků mezi dvěma elektrodami.

Mezi vysoce citlivé a selektivní detektory patří hmotnostní spektrometry. Fungují na principu dělení dle poměru hmotnosti a fragmentu náboje. Vyžadují vysokou

kapacitu turbo vakuových čerpadel a je také důležitá eliminace mobilní fáze, protože expandující eluent by zničil vakuum detektoru.

Jako další detektory lze zmínit plamenově-ionizační detektor a detektor elektronového záchytu, které jsou využity v plynové chromatografii. V analýze radioaktivních látek se využívá radioizotopního detektoru.

Pro měření citlivosti detektoru se u UV a VIS detektorů proměřuje absorbance standardního roztoku sloučeniny, o známé molární absorpční konstantě, umístěného do průtokové cely. Tato absorbance je pak porovnávána s hodnotou naměřenou standardním spektrofotometrem.

U zkoumání citlivosti fluorescenčního detektoru se proměřuje intenzita fluorescence standardního roztoku sulfátu chininu umístěného v průtokové cele. Tento standardní roztok je také použit pro udržení vlnové délky a polohy průtokové cely. Pro tento účel lze použít také Ramanovo spektrum vody.

Nahrávací zařízení

Nahrávací zařízení provádí vizualizaci signálu detektoru, což vede ke znázornění podmínek separace. Původně byly používány pero-rekordéry, ale nyní jsou častější počítačová zařízení efektivně znázorňující jak retenční čas, tak i plochu a výšku píku [11].

3.3 Kolony používané v HPLC

Kolony jsou často nazývány srdcem separačního procesu HPLC a jsou naplněny vhodnými sorbenty, které slouží jako stacionární fáze. Dostupnost stálých stacionárních fází a kolon s vysokou separační účinností je významná pro rozvíjení reprodukovatelných a robustních metod. Je komerčně dostupné obrovské množství kolon, které se liší počtem teoretických pater, retenčními charakteristikami a rozlišením, čímž lze ovlivnit průběh požadované HPLC metody [12].

Většina HPLC kolon je vyrobena z nerezavějící oceli, skládající se ze slitiny chromu, bronzu a molybdenu. Tyto kolony jsou odolné vůči obvyklému tlaku HPLC a relativně inertní chemickým korozím (důležitými výjimkami jsou ionty chloridu a lithia). Vnitřní strana kolony by neměla mít drsnou, rýhovanou a mikroporézní strukturu, takže ocelové válce by měly být buď precizně vyvrtány, nebo po klasické výrobě uhlazeny.

Další možností jsou skleněné válce, které jsou hladké, chemicky inertní a nekorodují. V HPLC se využívají ocelové válce lemované sklem, které jsou odolné vůči tlaku.

Tantal se pro výrobu kolon užívá vzácněji. Je sice méně náchylný ke korozi a jeho povrch je hladký, ale je méně odolný tlaku, takže musí být upevněn lepením, což je velmi nákladné.

Dále se může pro výrobu kolony použít Peek, což je termoplast na bázi organického polymeru (**polyetheretherketone**). Má výborné mechanické vlastnosti a je chemicky odolný i při vysokých teplotách. Využívá se v náročných inženýrských aplikacích, např. pro výrobu kapilár.

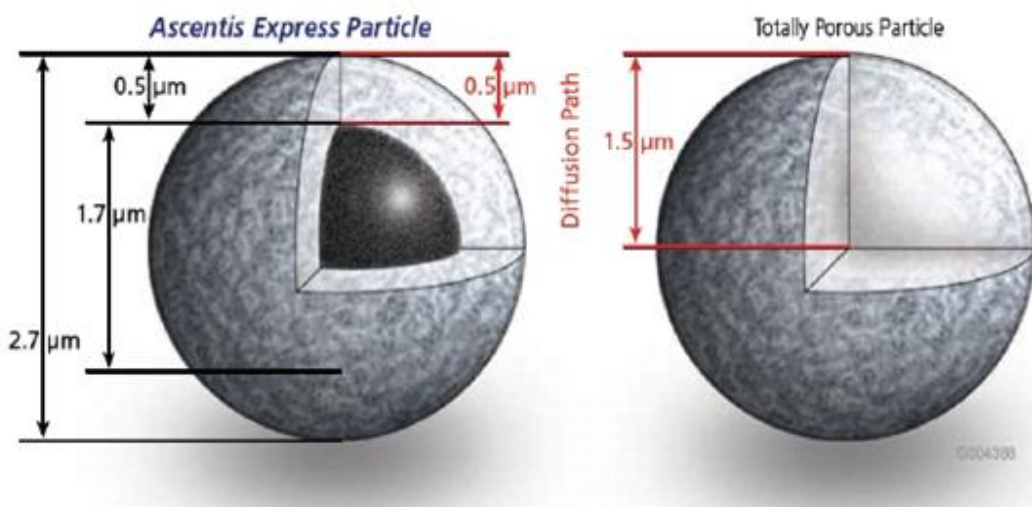
Kolony sloužící k analytickým účelům mají obvykle vnitřní průměr 2-5 mm. Kolony o větším vnitřním průměru bývají obvykle využity k přípravám vzorků pro další zpracování. Kolony dlouhé 5, 10, 15 nebo 25 cm jsou běžné pro stacionární fáze s mikročásticemi 10 μm a méně. Pro zvýšení výkonu je výhodnější pracovat s menšími částicemi, než prodloužovat kolonu. Prodloužení kolony vede ke zvýšení retenčního objemu, tím ke snížení píku analyzované látky a zhoršení detekčního limitu [13].

Vnitřek kolony je vyplněn stacionární fází, na které dochází k separaci analyzované látky. Většina stacionárních fází mají jako základ oxid křemičitý ve formě silikagelu, který je známý svou spolehlivou silou, pevností, relativní inertností a schopností být chemicky modifikován. Vědci vynaložili značné úsilí k rozvoji a vylepšení jeho morfologických a fyzikálně – chemických vlastností [12].

3.3.1 Fused-Core technologie

Jednou z novinek vylepšování této stacionární fáze je technologie pevného jádra (Fused-Core), poskytující tak minimálně dvakrát větší rychlost a účinnost klasických kolon při polovičním zpětném tlaku. Toto zvýšení výkonu lze aplikovat na všechny HPLC. Částice Fused-Core se od tradičních porézních částic liší třemi charakteristickými znaky, které vylepšují výkonnost kolon. Jde o užší rozdělení částic, větší hustotu rozložených vrstev a kratší cestu difuze.

Obrázek č. 4 - Fused-Core částice a klasická porézní částice



Inovativní výroba Fused-Core částic má za následek užší rozdělení částic kolony. Při tom je bráno v úvahu použití vysoce porézních frit, čímž je zvýšena odolnost proti ucpání, k němuž u více členitých kolon dochází. Tato výroba z tradičních porézních částic není možná.

Užší rozdělení částic vytváří větší hustotu rozložených vrstev, pevnou optickou délku a zmenšuje prostup analytu skrze celou kolonu.

Kratší cesta difuze při použití Fused-Core částic vede k ostřejším píkům, než při použití tradičních porézních kolon. Kromě toho také dovoluje použití vyšších průtokových rychlostí, aniž by docházelo k rozšíření píků.

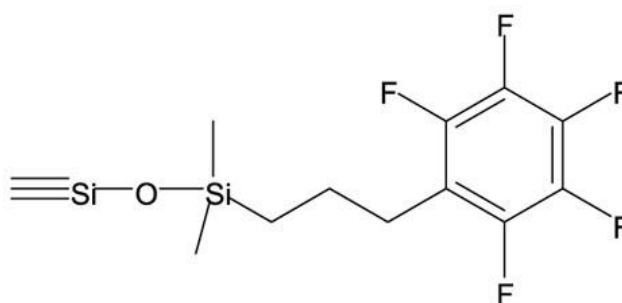
Tyto znaky mají za následek více než dvojnásobné zrychlení metody, zvýšení rozlišení metody, větší členitost kolony ve srovnání s kolonou s náplní částic o velikosti menší než 2 μm , ostřejší píky a větší citlivost. Navíc tyto kolony mají stejně dlouhou životnost [14],[15].

Jsou dostupné pevné jádra o velikosti 1,7 μm ; 2,6 nebo 2,7 μm a porézní obaly odpovídající velikosti 0,23; 0,35 a 0,5 μm [16].

3.3.2 HS F5 kolony a jejich využití

Další možností vylepšení systému bylo navázání pentafluorofenylpropylové (F5) skupiny na silikagel. Kolony s F5 skupinou (HS F5) poskytují jedinečnou selektivitu, ostré tvary píků, stabilní separaci a reprodukovatelný výkon kolony. Separace probíhá na základě polárních interakcí, hydrofobních interakcí, interakcí dipól-dipól a π - π [17].

Obrázek č. 5 - strukturní vzorec F5 skupiny



Kromě systému RP se dají použít i v systému NP. Škála separace je od 3 do 10 μm a poskytují několik typů interakcí. Používají se zejména v analýze ve vodě rozpustných sloučenin a peptidů, s doporučeným pH 2-8.

Přestože obsahuje fenylovou skupinu ve své struktuře, nepodobá se fenylovým fázím retencí, ani selektivitou. Díky pěti fluoridovým skupinám, které patří mezi elektronové akceptory, je F5 skupina silnou Lewisovou kyselinou, takže F5 kruh je elektronově deficitní, zatímco fenylový kruh je elektronově bohatý.

Kolony s pentafluorofenylpropylovou skupinou (HS F5) byly porovnány s klasickými kolonami s navázaným řetězcem o délce 18 uhlíků (C18). Problémem klasických alkylovaných kolon je jednak slabá retence polárních látek a příliš malá, popř. příliš vysoká selektivita [18].

Všeobecně platí, že báze jsou zadržovány déle na HS F5 než na C18. Zvýšení organické složky separace s C18 poskytovalo podobnou retenci jako HS F5. Výsledky s ostatními látkami byly různé. Obecně ovšem platí, že rozpouštědla s hodnotami rozdělovacího koeficientu oktanol/voda ($\log P_{O/W}$) byly na HS F5 zadržovány déle než na C18. Stupeň odlišnosti je pak vysoce závislý na rozpouštědle.

Při využití systému RP navíc HS F5 prokázaly větší šanci odhalení stop nečistot oproti C18 [19].

Důležitým faktorem pro rozvoj robustní analytické metody je reprodukovatelnost kolony. Selektivita kolony by měla zůstat stejná a eluované vzorky proteinů a peptidů musí být reprodukovatelné. Chemická soudržnost silikagelu a připojených fází zajišťuje výjimečnou reprodukovatelnost HS F5.

Použití jednotlivých HS F5 je závislé na velikosti částic. Zatímco kolony delších rozměrů, obsahující částice o velikosti 10 μm jsou ideální pro separaci a čištění větších množství látek (mg až g) pro další charakteristiku, kolony kratších rozměrů s částicemi o velikosti 3 μm jsou vhodné pro rychlou analýzu [18].

Praktické využití je např. při analýze fenetylaminových alkaloidů v citrusových produktech [20], při analýze pentacyklických triterpenoidů [21], nebo ciprofloxacinu v plasmě [22].

3.3.3 RP-Amide kolona

Další metodou zvyšování účinnosti kolony ve smyslu obměny připojené polární fáze na silikagel, je zasazení amidové skupiny do řetězce C18. Jedná se o kolony RP-Amide, které ukazují značné výhody v retenci polárních sloučenin, která je v systému RP poměrně obtížná. Využívají se při separaci malých, ve vodě rozpustných molekul a peptidů, donorů vodíkových vazeb, kyselin, fenolů, bází a polárních sloučenin.

RP-Amide kolony lze tedy použít ke stejným separacím jako klasické C18 kolony s vyhnutím se nevýhodám C18 kolon, jako je nízká smáčivost při použití více vodných mobilních fází. Navíc tyto molekuly mohou reagovat s amidovou skupinou jak hydrofobními interakcemi, tak vodíkovými vazbami. Oproti klasickým alkylovým kolonám se dále vyznačují větší retencí a citlivostí pro fenoly, organické kyseliny a další polární rozpouštědla díky silné vodíkové vazbě mezi amidem karbonylu (akceptor vodíku) a donory vodíku, což jsou právě zmíněné fenoly a kyseliny. Oproti ostatním vloženým fázím, jako jsou karbamáty, močoviny, sulfonamidy a ethery, poskytují kolony s vloženými amidy separace srovnatelné s alkylovými kolonami bez nutnosti změny podmínek mobilní fáze.

Všeobecně platí, že kyseliny jsou na této koloně zadržovány více a báze méně než na alkylových kolonách. Při volbě mobilní fáze je metanol srovnatelně silný s acetonitrilem [23].

Kolona RP-Amide dokáže při vhodně zvolených chromatografických podmínkách znázornit rozdělování na základě systému oktanol/voda. Díky této vlastnosti nachází kolony RP-Amide široké uplatnění v chromatografickém stanovení lipofility [24].

3.4 Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu vyrovnává analytické chyby díky úbytku vzorku a volitelnému injekčnímu objemu. Výsledky referenčního standardu jsou srovnávány s výsledky měřeného vzorku. Metoda je založena na přidání sloučeniny nazývané vnitřní standard (IS) o známé koncentraci k roztokům standardu a vzorku po předcházející úpravě. Pro výpočty a kalibraci je využíván spíše poměr ploch nebo výšek píku analytu a IS než absolutní hodnoty. Pokud je příprava nebo vstřikování spojena s hlavními zdroji chyb měření, tato metoda zajistí precizní výsledky. Tyto chyby totiž ovlivňují pík vnitřního standardu i analytu stejnou měrou, takže poměr ploch nebo výšek těchto píků zůstane neovlivněný. Pro tuto metodu je ovšem důležitá volba správného IS. Podmínky pro výběr IS jsou:

- IS by měl při přípravě vzorků být odebrán ve stejném rozsahu jako analyzovaná látka
- IS by měl být separován odděleně od ostatních látek obsažených ve vzorku
- IS by měl na detektoru vykazovat podobný signál jako analyt
- IS by měl být v koncentraci, kdy poskytuje podobnou výšku nebo plochu píku jako analyt.

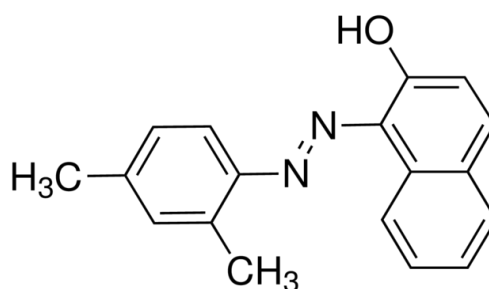
Z toho plyne, že IS by měl být velmi podobné fyzikálně – chemické vlastnosti, ale ne podobné natolik, aby nemohl být přesně určen. Nejideálnější IS při použití hmotnostní spektrometrie je isotopicky značená verze analytu. Takto značené IS jsou ale drahé, takže jsou většinou jako IS používané spíše analoga sloučenin.

Tato metoda IS má klíčové využití v bioanalýze příležitostně také při kontrole kvality farmaceuticky aktivních látek.

Při metodě IS je v běžné matrici připravena řada standardních roztoků o známé koncentraci referenčních standardů. Pro stanovení drog v plasmě jsou standardní roztoky připraveny v plasmě, která drogy neobsahuje a totéž pravidlo platí i pro stanovení drog v moči. Koncentrace by měla být přibližná koncentracím vzorků. Poté je stejné množství IS přidáno k roztokům standardu i vzorku. Se všemi roztoky je postupováno stejným způsobem a všechny jsou následně dávkovány na kolonu [25].

3.4.1 Sudan II

Obrázek č. 6 - strukturní vzorec sudanu II



Sumární vzorec:	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O
Chemický název:	1-[(2,4-Dimethylphenyl)hydrazinylidene]naphthalen-2-one
CAS:	3118-97-6
Molekulová hmotnost:	276,36
Fyzikální a chemické vlastnosti:	lososově růžový prášek teplota tání 156-158 °C hustota 1,14 g/cm ³ nerozpustný ve vodě v etanolu, acetonu a benzenu vytváří koloidní roztoky rozpustný v etheru [26] se silnými oxidačními činidly, kovovými solemi, peroxidy a sulfidy může působit explozivně

Obecná charakteristika

Sudan II je jednou ze čtyř složek červeného azobarviva Sudan. Vzniká kopulací diazoniového m-xylidenu s 2-naftolem [27].

Použití

Využívá se jako barvivo olejů, vosků a uhlovodíkových rozpouštědel pro leštidla, svíčky a polystyrenové pryskyřice. V Japonsku je také používán k barvení petrolejových produktů, plastů, leštidel na boty, kosmetiky a některých léčiv.

Toxicita

Přestože byl Sudan II testován na kancerogenitu u myši a krysa perorální cestou, International Agency for Research on Cancer (IARC) považuje výsledky těchto studií za bezvýznamné, vzhledem k neadekvátnosti čísel v pokusech u obou užitých zvířat, délce experimentu a stupně hlášení případů. Při testování na myších bylo zjištěno, že Sudan II zvyšuje výskyt karcinomů močového měchýře.

Většina organických azobarviv jsou potenciálními senzitizerý kůže, z nichž nejznámějším je para-fenylendiamin a jeho analoga. Větší pravděpodobnost dráždění kůže je u ve vodě rozpustných azobarviv. Byly provedeny studie, kdy bylo zjištěno, že Sudan II se jako složka komerčního barviva podílí na vzniku pigmentové kontaktní dermatitidy [28]. Kromě kontaktních dermatitid roztoky těchto barviv způsobují také kožní onemocnění lichen planus [29].

3.5 Analytické stanovení fenoxycarbu a permetrinu

V minulosti se současným chromatografickým HPLC stanovením permetrinu a fenoxycarbu zabývala ve své diplomové práci Petra Švestková [5] a pracovníci katedry analytické chemie pomocí metody sekvenční injekční chromatografie (SIC) [30]. Žádné další práce zabývající se společným stanovením těchto dvou látek nebyly v dostupné literatuře nalezeny.

4 Experimentální část

4.1 Materiály a pomůcky

4.1.1 Standardy, vzorky a chemikálie

Fenoxycarb, dodavatel Aveflor, a.s., pracovní standard (99,60%)

Permethrin, dodavatel Aveflor, a.s., pracovní standard (98,00%)

Arpalit[®] Neo šampon proti parazitům s bambusovým extraktem, konečný produkt,
č.šarže: V20-02*05/2010

Sudan II, Sigma Aldrich (90,00%)

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: Ascentis[®] Express F5, 100 x 3 mm, 2,7 μm částice, (Sigma Aldrich)

Ascentis[®] Express RP-Amide, 100 x 3 mm, 2,7 μm částice,
(Sigma Aldrich)

Ascentis[®] Express F5, 30 x 4,6 mm, 2,7 μm částice, (Sigma Aldrich)

<i>Dávkování:</i>	2 µl
<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 µm

Ultrazvuková lázeň:

Bandelin SONOREX RK52, Berlín, SRN

Analytické váhy:

Sartorius 2004 MP, SRN

4.2 Příprava roztoku vnitřního standardu

Bylo naváženo přibližně přesně 0,06 g sudanu II (IS) do odměrné baňky 100 ml a doplněno etanolem po značku.

4.3 Příprava roztoku standardů fenoxycarbu a permetrinu

Standardní roztok byl připraven navážením přibližně přesně 0,15 g fenoxycarbu a 0,60 g permetrinu, rozpuštěním této navážky v etanolu a doplněním etanolem v odměrné baňce na objem 100 ml. Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml, k němuž bylo odpipetováno 1 ml roztoku IS a ředěno etanolem do 25 ml. Tento roztok byl dávkován autosamplerem na kolonu.

4.4 Příprava vzorku šamponu Arpalit Neo

Do 25 ml odměrné baňky bylo odpipetováno takové množství šamponu, které odpovídá navážce přibližně 0,8 g. K tomu byl odpipetován 1 ml roztoku IS a baňka byla doplněna po značku etanolem. Odměrné baňky byly umístěny na 5 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k dostatečné homogenizaci vzorku a extrakci analyzovaných látek.

4.5 Popis práce

Byla optimalizována metoda pro stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu v testovaném kosmetické přípravku Arpalit[®] Neo šampon. Podstatou optimalizace je volba vhodných podmínek pro analýzu tak, aby ve výsledném chromatogramu oddělené složky poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii. Při optimalizaci byly používány pracovní roztoky fenoxycarbu, permetrinu a IS, uvedené v kapitole (4.2 a 4.3).

Po získání optimálních podmínek byla metoda validována a následně byly proměřeny vzorky kosmetického přípravku Arpalit[®] Neo šampon.

4.6 Optimalizace chromatografických podmínek

4.6.1 Optimalizace složení mobilní fáze v závislosti na typu kolony

Pro optimalizaci byly měřeny retenční časy fenoxycarbu a permetrinu na vybraných kolonách s „fused core technologií – Ascentis Express“ v závislosti na změnách složení mobilní fáze při teplotě 60 °C.

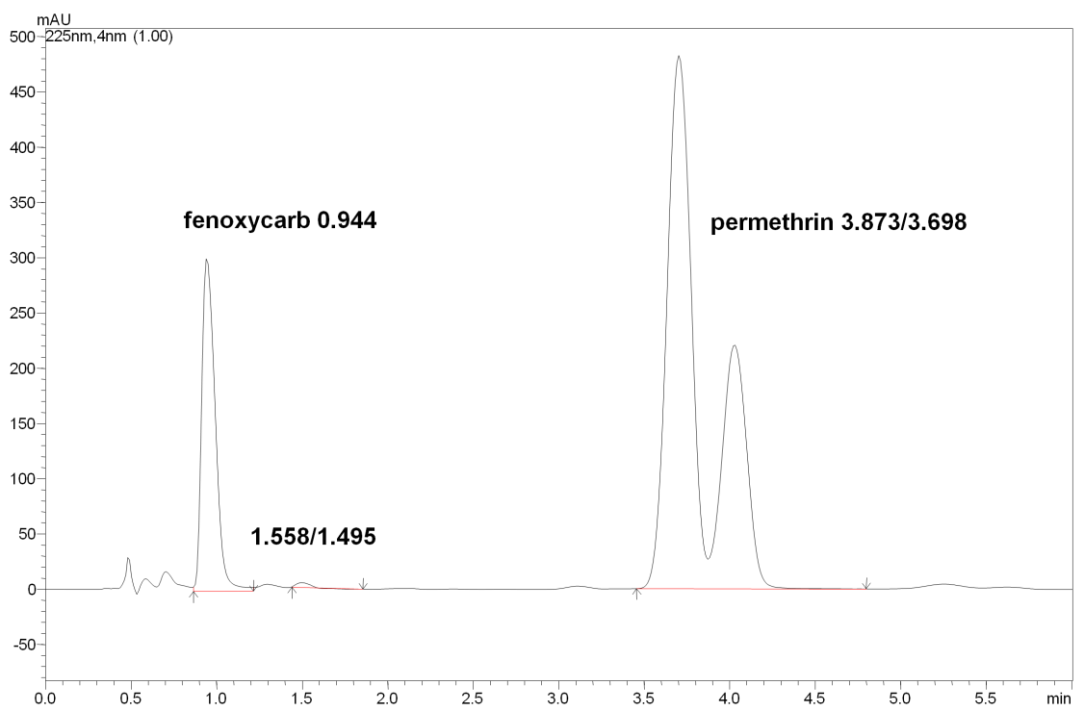
Jako mobilní fáze byly analyzovány směsi acetonitril – voda a metanol – voda. Při složení mobilní fáze metanol – voda ale docházelo k šumu na základní linii a píky chvostovaly, proto toto složení mobilní fáze bylo nakonec zavrhnuto. Měření probíhalo při izokratické eluci.

Cílem bylo rozdělení píků na základní linii, zároveň zachování vhodných podmínek pro použitou kolonu a vhodné doby trvání jedné analýzy. Podmínky separace a chromatogramy uvedené dále jsou výběrem nejlepších dosažených separací na vybraných kolonách.

4.6.1. Kolona Ascentis® Express F5, 100 x 3 mm, 2,7 µm částice:

Separace probíhala nejvhodněji při složení mobilní fáze acetonitril – voda (55:45). Píky byly rozděleny až k základní linii a analýza netrvala příliš dlouho.

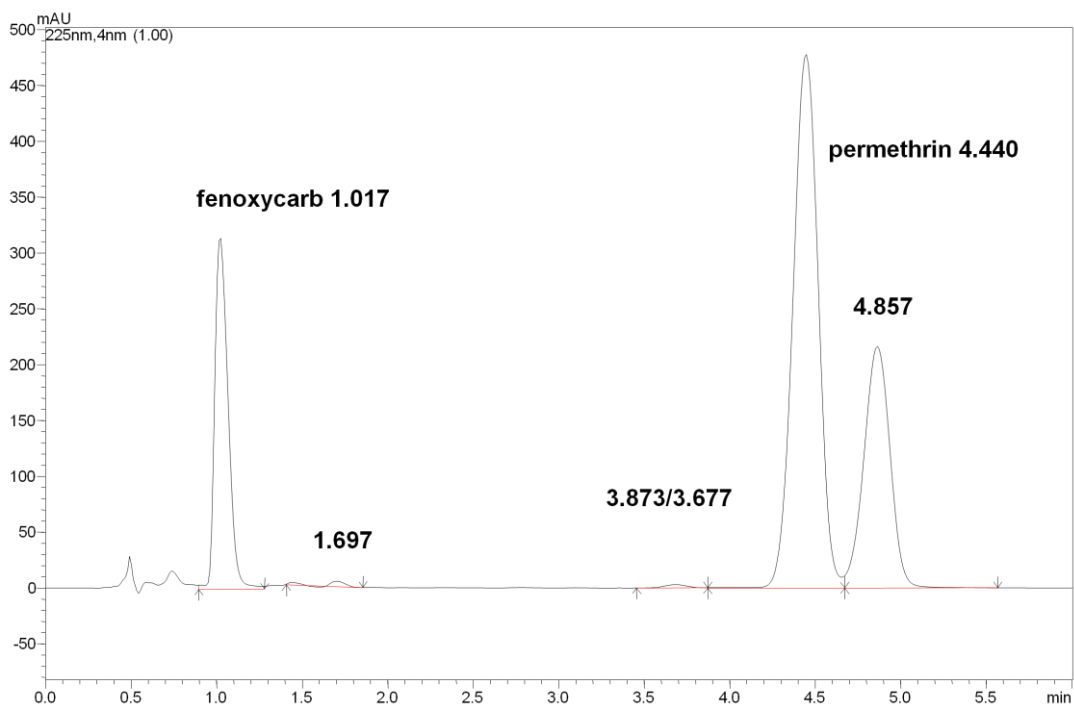
Obrázek č. 7 - chromatogram za použití kolony F5, 100 x 3 mm, 2,7 µm částice



4.6.1. *Ascentis® Express RP-Amide, 100 x 3 mm, 2,7 µm částice:*

U této kolony bylo nevhodnější složení mobilní fáze acetonitril – voda (55:45). Docházelo k rozdělení píků až na základní linii a retenční časy látek byly dostatečně oddělené a poskytovaly delší rozmezí retenčního času vhodné pro nalezení IS než u předchozí kolony. U permethrinu dokonce došlo k oddělení cis- a trans-izomerů. Tyto podmínky se jeví jako nevhodnější a byly použity pro analýzu.

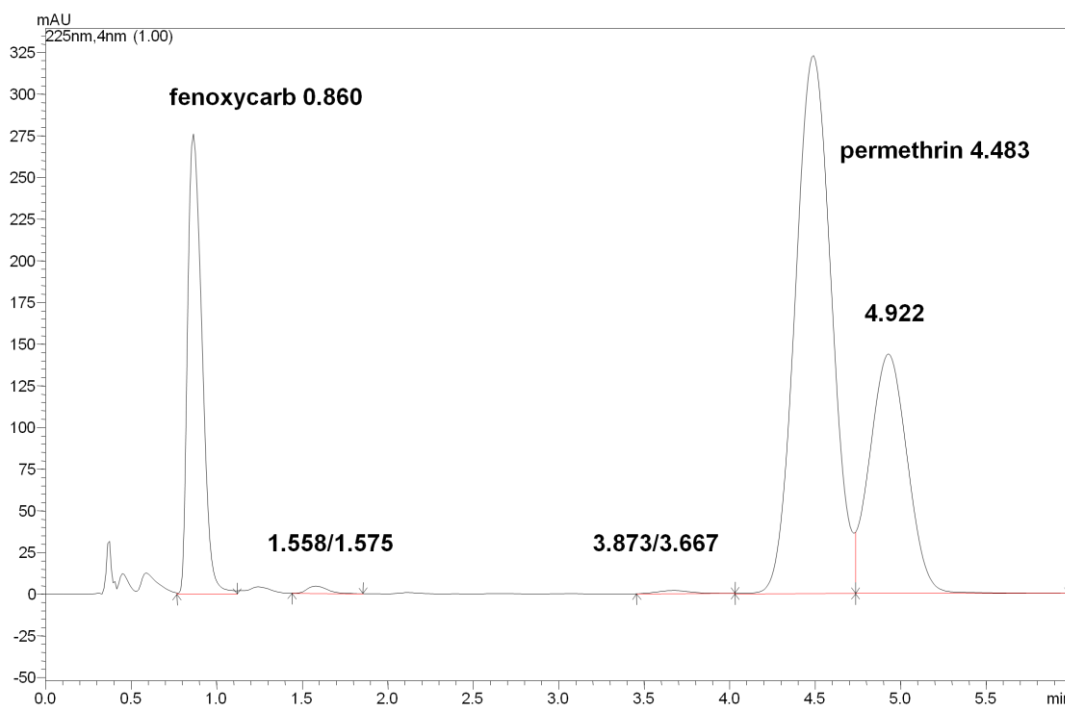
Obrázek č. 8 - chromatogram za použití kolony RP-Amide, 100 x 3 mm, 2,7 µm částice



4.6.1. *Ascentis® Express F5, 30 x 4,6 mm, 2,7 µm částice:*

Analýza stačila proběhnout ve vyměřeném čase. Byla provedena za složení mobilní fáze acetonitril – voda (50:50). Došlo k oddělení obou látek, ale před píkem fenoxycarbu byl na základní linii v blízkosti píku šum z matrice rozpouštědla.

Obrázek č. 9 - chromatogram za použití kolony F5, 30 x 4,6 mm, 2,7 µm částice



4.6.2 Hledání vnitřního standardu

Pro nalezení vnitřního standardu byly proměřovány látky strukturně blízké fenoxycarbu a permetrinu. Retenční čas vnitřního standardu byl hledán v rozmezí mezi jednotlivými retenčními časy jednotlivých látek, tj. v intervalu 1 až 4,5 min tak, aby byl pík vnitřního standardu znatelně samostatně eluován.

Tabulka č. 1 - retenční časy jednotlivých látek při hledání IS

Zkoumaná látka	t_R (min)	Poznámka
Butylparaben	0,753	příliš krátký t_R
3,5-dichlorfenol	0,849	příliš krátký t_R
Diclofenacum natriicum	0,814	příliš krátký t_R
2,5-dinitrofenol	0,655	příliš krátký t_R
Etylparaben	0,623	příliš krátký t_R
Hexachlorofen	1,312	pík v blízkosti fenoxycarbu
Ibuprofen	0,883	příliš krátký t_R
Metylparaben	0,580	příliš krátký t_R
Propylparaben	0,680	příliš krátký t_R
Propylfenazon	0,686	příliš krátký t_R
Tetracyklin	-	t_R byl delší než doba měření
Rolitetracyklin	-	t_R byl delší než doba měření
Klopamid	0,601	příliš krátký t_R
Bopindolol hydrogenmalát	-	t_R byl delší než doba měření
2,3,5-trimetylfenol	0,797	příliš krátký t_R
1-nitroso-2-naftol	0,731	příliš krátký t_R
Sudan I	1,812	vyhovuje
Sudan II	2,867	vyhovuje nejlépe
Sudan III	4,003	pík v blízkosti permetrinu
Sudan IV	7,004	příliš dlouhý t_R

Pro požadavky IS vyhovoval nejlépe sudan II a tento byl také pro tuto metodu použit.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu

<i>Chromatograf:</i>	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
<i>Detektor:</i>	Shimadzu M 20A Prominence Diode Array Detector
<i>Kolona:</i>	Ascentis Express RP-Amide, 100 x 3 mm, 2,7 μm částice
<i>Dávkování:</i>	2 μl
<i>Detekce:</i>	UV, 225 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	Acetonitril – Voda (55:45)
<i>Typ eluce:</i>	Izokratická
<i>Průtok:</i>	1,0 ml/min
<i>Teplota:</i>	60 °C
<i>Čas analýzy:</i>	6 min
<i>Vyhodnocení:</i>	Chromatografický software LC Solution

5.2 Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater (N)

K ověření účinnosti kolony byly použity hodnoty z analýz roztoku standardů pro opakovatelnost. Podle následujícího vzorce byl proveden výpočet z průměru tří měření:

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

t – retenční čas (min);

w – šířka píku v polovině jeho výšky (min).

Tabulka č. 2 - účinnost chromatografického systému

Hodnocená látka	t_R (min)	w_h	N
Fenoxykarb	1,007	0,087	657
IS	2,936	0,114	3228
Permetrin	4,430	0,156	4434

5.2.2 Faktor symetrie chromatografických píků (A_s)

Pro zjištění symetrie chromatografických píků byly použity hodnoty roztoků standardu při měření opakovatelnosti. Podle následujícího vzorce byl proveden výpočet z průměru tří měření:

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

$w_{0,05}$ – šířka píku v 5% jeho výšky;

d – vzdálenost, která vznikne protnutím kolmice spuštěné z vrcholu píku a úsečky $w_{0,05}$.

Tabulka č. 3 - asymetrie chromatografických píků

Analyzovaná látka	$w_{0,05}$	d	A_s
Fenoxykarb	0,162	0,057	1,422
IS	0,236	0,103	1,151
Permetrin	0,311	0,153	1,017

5.2.3 Rozlišení chromatografických píků (R_s)

Podle následujícího vzorce byl proveden výpočet z průměru hodnot tří měření roztoků standardů při měření opakovatelnosti:

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

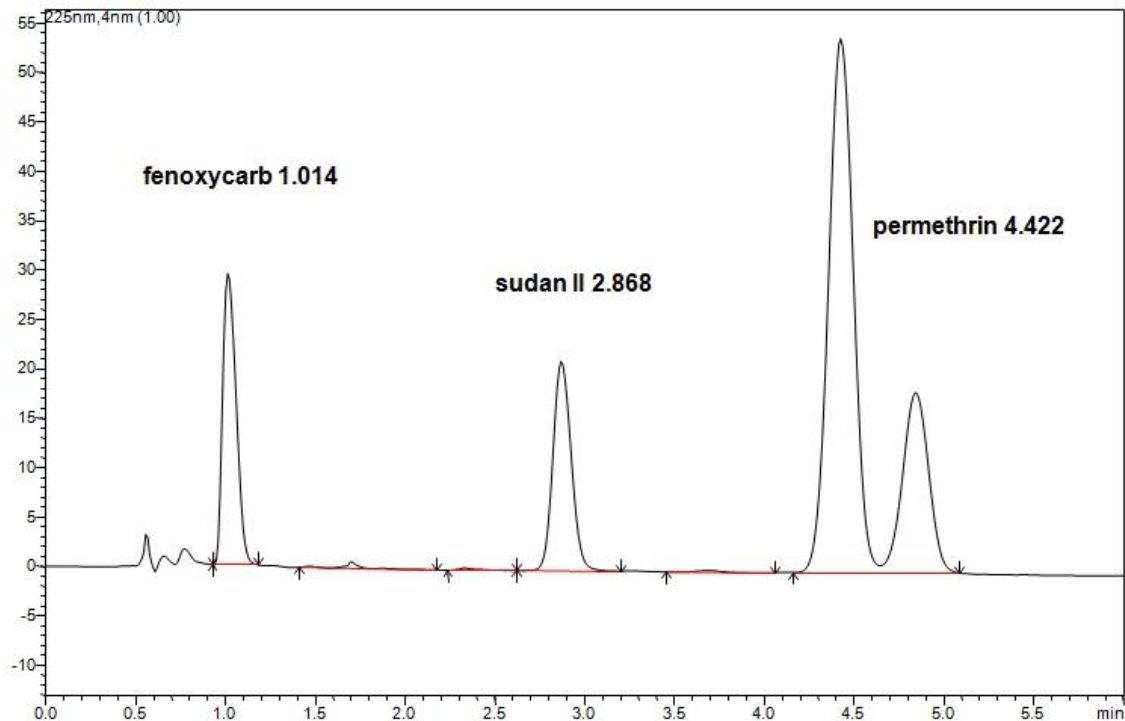
t_{R1} a t_{R2} – retenční časy látek, kdy $t_{R2} > t_{R1}$;

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

Tabulka č. 4 - rozlišení chromatografických píků

Analyzované látky	R_s
Fenoxycarb – IS	10,612
IS - Permetrin	6,524

Obrázek č. 10 - separace za optimálních podmínek



5.3 Validace analytické metody

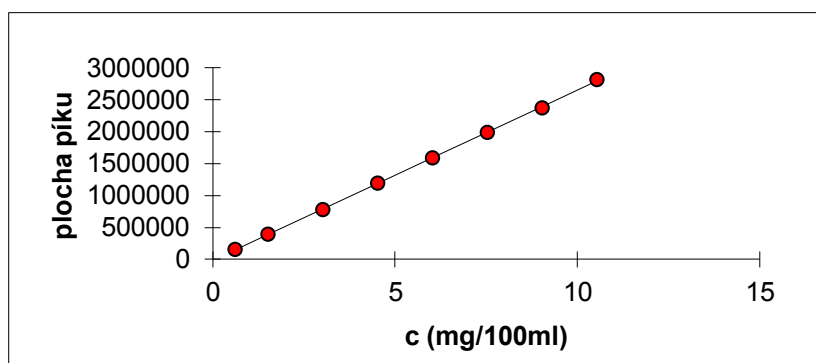
5.3.1 Linearita

Zjištění linearity bylo provedeno metodou absolutní kalibrace. K měření bylo připraveno 8 roztoků standardu fenoxycarbu, permetrinu a vnitřního standardu. Pro vyhodnocení závislosti absorbancí kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla použita metoda lineární regrese.

Obrázek č. 11 - testování linearity – fenoxycarb

FENOXYKARB

c (mg/100 ml)	plocha píku
0,602	152566
1,504	390660
3,008	775447
4,512	1189569
6,016	1584897
7,520	1983834
9,024	2366822
10,525	2810329

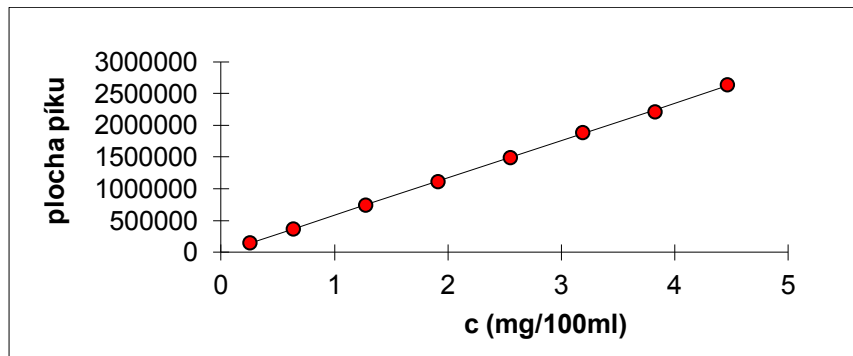


Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 266259,1	± 1486,824
Abs. člen	q = -14745,48	± 9359,038
Korelační koef.	r = 0,999906	
Reziduální odch.	s = 14023,25	

Obrázek č. 12 - testování linearity – IS

IS

c (mg/100 ml)	plocha píku
0,255	151169
0,638	368755
1,276	744164
1,914	1113770
2,552	1491753
3,190	1885931
3,828	2211649
4,466	2637993

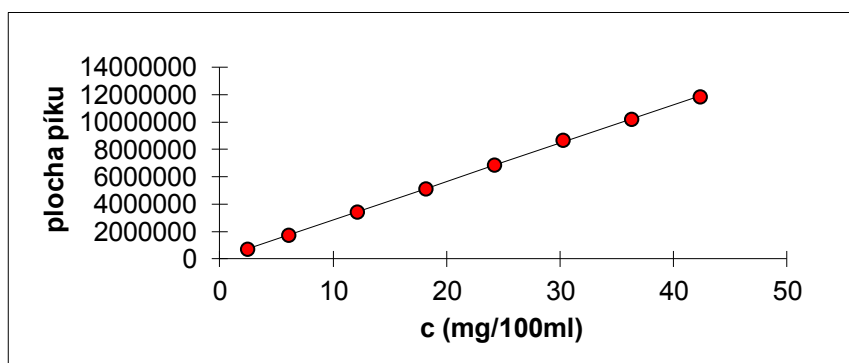


Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 587394,6	± 4297,328
Abs. člen	q = -4741,969	± 11475,89
Korelační koef.	r = 0,999839	
Reziduální odch.	s = 17196,35	

Obrázek č. 13 - testování linearity – permetrin

PERMETRIN

c (mg/100 ml)	plocha píku
2,419	708814
6,048	1730803
12,096	3422973
18,144	5113419
24,192	6853678
30,240	8666131
36,288	10195284
42,336	11834946



Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 280314,5	± 1826,414
Abs. člen	q = 47291,91	± 46235,75
Korelační koef.	r = 0,999873	
Reziduální odch.	s = 69283,22	

5.3.2 Opakovatelnost

Pro vyhodnocení opakovatelnosti byly použity výsledky při opakovaném dávkování roztoků analyzovaných látek v mobilní fázi ve třech různých koncentracích. Relativní směrodatné odchylky byly vyhodnoceny z ploch píků.

Fenoxykarb byl vyhodnocován při $c = 0,6016 \text{ mg}/100\text{ml}$, $c = 6,016 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ a $c = 10,525 \text{ mg}/100 \text{ ml}$.

Tabulka č. 5 - opakovatelnost analýzy pro fenoxykarb

FENOXYKARB			
Číslo pokusu	Plocha píku (A)		
	c = 0,6016 mg/100ml	c = 6,016 mg/100 ml	c = 10,525 mg/100 ml
1	152812	1560857	2765402
2	153957	1565718	2771083
3	153763	1563174	2767569
4	153827	1564887	2762986
5	153057	1566724	2770892
6	152560	1562622	2764494
N	6	6	6
\bar{x}	153329	1563997	2767071
S	594	2173	3378
RSD (%)	0,38	0,13	0,12

Sudan II byl vyhodnocován při $c = 0,2552 \text{ mg/100ml}$, $c = 2,552 \text{ mg/100 ml}$ a $c = 4,466 \text{ mg/100 ml}$.

Tabulka č. 6 - opakovatelnost analýzy pro sudan II

IS			
Číslo pokusu	Plocha píku (A)		
	$c = 0,2552 \text{ mg/100ml}$	$c = 2,552 \text{ mg/100 ml}$	$c = 4,466 \text{ mg/100 ml}$
1	149555	1506591	2644358
2	149832	1505265	2648254
3	149326	1504582	2643864
4	149328	1486219	2626098
5	148968	1512103	2633681
6	149523	1527665	2649626
N	6	6	6
\bar{x}	149422	1507070	2640980
S	290	13371	9188
RSD (%)	0,19	0,88	0,34

Permetrin byl vyhodnocován při $c = 2,4192 \text{ mg/100ml}$, $c = 24,192 \text{ mg/100 ml}$ a $c = 42,336 \text{ mg/100 ml}$.

Tabulka č. 7 - opakovatelnost analýzy pro permetrin

PERMETRIN			
Číslo pokusu	Plocha píku (A)		
	$c = 2,4192 \text{ mg/100ml}$	$c = 24,192 \text{ mg/100 ml}$	$c = 42,336 \text{ mg/100 ml}$
1	702770	6896890	11949838
2	707627	6903154	11974238
3	708586	6897935	11956043
4	708415	6905524	11958059
5	707970	6906312	11956621
6	706528	6911219	11950008
N	6	6	6
\bar{x}	706982	6903505	11957468
S	2189	5410	8924
RSD (%)	0,31	0,07	0,07

5.3.3 Přesnost

Pro vyhodnocení přesnosti byly analyzovány roztoky vzorku šamponu Arpalit Neo (č.š. V20-02*05/2010), které byly připraveny postupem uvedeným v kapitole (4.4). Byly provedeny 3 nástřiky každého roztoku na kolonu a určena průměrná plocha píku vztahující se na průměrnou navážku 0,8 g. Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka byla stanovena pro 6 roztoků.

Obsah fenoxycarbu a permetrinu (c_v) byl vypočítán podle vzorce:

$$c_v = \frac{\frac{A_v}{A_{IS(v)}} \times c_s \times K}{\frac{A_s}{A_{IS(s)}} \times n \times 50}$$

c_v – obsah účinné látky v %;

A_v – plocha píku vzorku;

$A_{IS(v)}$ – plocha píku vnitřního standardu v roztoku vzorku;

A_s – plocha píku standardu (fenoxycarb: $A_s = 1614072$; permetrin: $A_s = 6954206$);

$A_{IS(s)}$ – plocha píku vnitřního standardu v roztoku standardu ($A_{IS(s)} = 1472195$);

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

K – korekce na čistotu suroviny (obsah účinné látky v surovině – fenoxycarb: $K = 97,30\%$, permetrin: $K = 98,76\%$.)

Tabulka č. 8 - přesnost metody

Vzorek	Navážka (g)	AV (fenoxy-karb)	AV (permetrin)	AIS(V)	c (fenoxy-karb)	c (permetrin)
1	0,7864	1399652	5821560	1599603	0,1185	0,4644
2	1,0487	1388982	5774818	1197608	0,1178	0,4614
3	0,8092	1395327	5738024	1549855	0,1185	0,4592
4	1,0398	1393642	5791619	1207213	0,1183	0,4630
5	0,8068	1401560	5838826	1553365	0,1191	0,4675
6	0,8398	1404137	5849800	1496439	0,1189	0,4671
n					6	6
\bar{x}					0,1185	0,4638
s					0,0005	0,0033
RSD (%)					0,41	0,70

5.3.4 Správnost

Bylo připraveno 6 roztoků vzorku šampónu postupem uvedeným v kapitole (4.4), ke kterým byl přidán 1 ml roztoku standardů o koncentraci c_0 (fenoxykarb: $c_0 = 0,06015$ g/100 ml, permetrin: $c_0 = 0,24192$ g/100 ml). Byly provedeny 3 nástřiky těchto roztoků na kolonu a spočítána průměrná plocha píku přepočítaná na navážku 0,8 g.

Pro výpočet výtěžnosti byla použita průměrná plocha píku každého pracovního roztoku pro správnost a \bar{x} získaný při měření pracovních roztoků pro přesnost uvedených v kapitole (bez přídavku roztoku standardů.)

Výtěžnost byla vypočtena podle vzorce:

$$R_v = 100 \times \frac{A_v - \bar{x}}{A_s}, \text{ kde}$$

R_v – výtěžnost v %;

A_v – plocha píku vzorku;

\bar{x}_s - průměr ploch pracovních roztoků získaný při měření přesnosti (fenoxykarb: $\bar{x}_s = 1392600$, permetrin: $\bar{x}_s = 5790017$);

A_s – plocha píku standardu (fenoxykarb: $A_s = 1614072$; permetrin: $A_s = 6954206$).

Tabulka č. 9 - správnost metódy

Vzorek	A _v (fenoxykarb)	A _v (permetrin)	R _v (fenoxykarb)	R _v (permetrin)
1	2983825	12691901	98,58	99,25
2	3105690	12602331	106,13	97,96
3	3069010	12656275	103,86	98,74
4	3072697	12596354	104,09	97,87
5	3062588	12986347	103,46	103,48
6	3119213	13176879	106,97	106,22
N			6	6
\bar{x}			103,85	100,59
s			2,93	3,45
RSD (%)			2,82	3,43

5.3.5 Robustnost

. Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek bylo stanoveno u pracovního roztoku o složení:

- fenoxycarb (c = 6,016 mg/100ml)
- IS (c = 2,552 mg/100 ml)
- permetrin (c = 24,192 mg/100ml)

5.3.5. Vliv složení mobilní fáze

Pracovní roztok byl testován při změnách poměru dvou složek zastoupených v mobilní fázi – acetonitrilu a vody, a to v poměrech 50:50, 55:45 a 60:40. Byly provedeny tři měření a spočítán jejich průměr.

a) Vliv na plochu chromatografických píků

$$A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{55:45}}, \text{ kde}$$

A_i – plocha píku za testovaných podmínek

$A_{55:45}$ – plocha píku za standardních podmínek.

Byly získány výsledky uvedené v tabulkách . Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 96,94 % až 99,80 % u fenoxycarbu, 100,15 % až 101,13 % u IS a 100,06 % až 100,36% u permetrinu.

Tabulka č. 10 - vliv složení mobilní fáze na plochu píku (fenoxycarb)

Acetonitril - Voda	Fenoxycarb	
	A_i	A_R (%)
50:50	1587323	99,80
55:45	1590464	100
60:40	1541856	96,94

Tabulka č. 11 - vliv složení mobilní fáze na plochu píku (IS)

Acetonitril - Voda	IS	
	A_i	A_R (%)
50:50	1500571	100,15
55:45	1498270	100
60:40	1515189	101,13

Tabulka č. 12 - vliv složení mobilní fáze na plochu píku (permetrin)

Acetonitril - Voda	Permetrin	
	A_i	A_R (%)
50:50	6914435	100,36
55:45	6889785	100
60:40	6894102	100,06

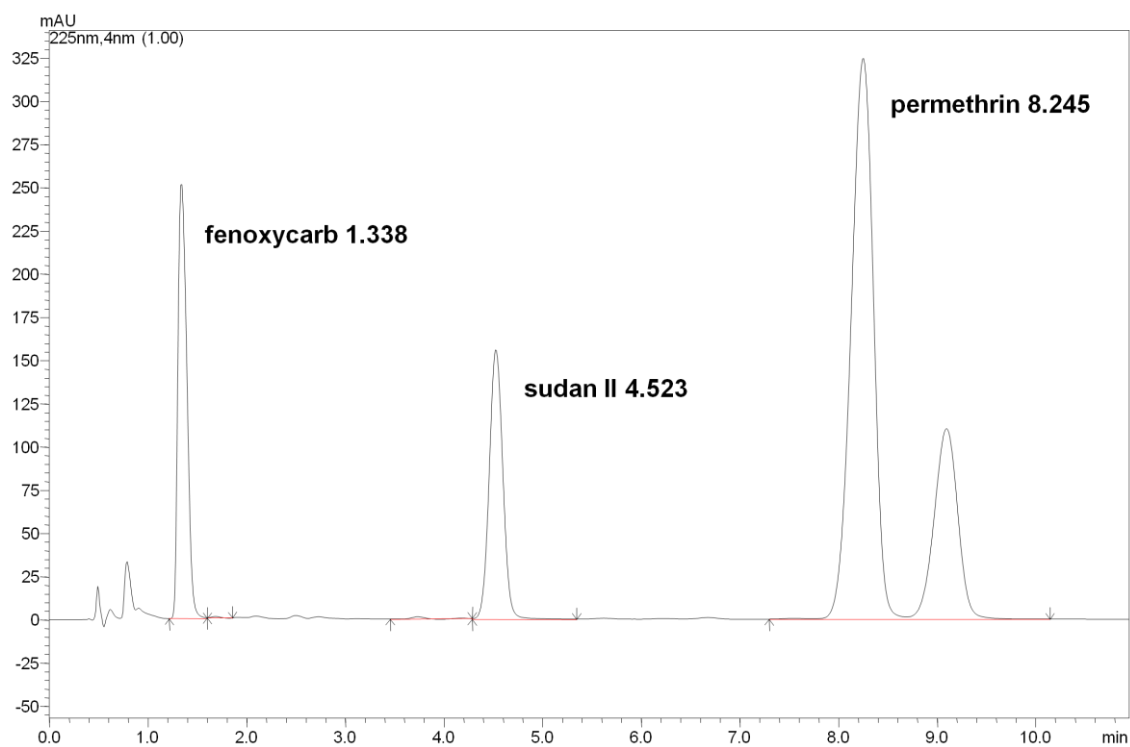
b) Vliv na retenční čas

K dokonalé separaci všech složek dochází v celém testovacím rozmezí, ale složení mobilní fáze ovlivňuje retenční čas, a tím i dobu trvání analýzy. Při složení mobilní fáze acetonitril – voda (55:45) byly dle srovnání jednotlivých chromatogramů složky separovány nejlépe.

Tabulka č. 13 - vliv složení mobilní fáze na retenční čas

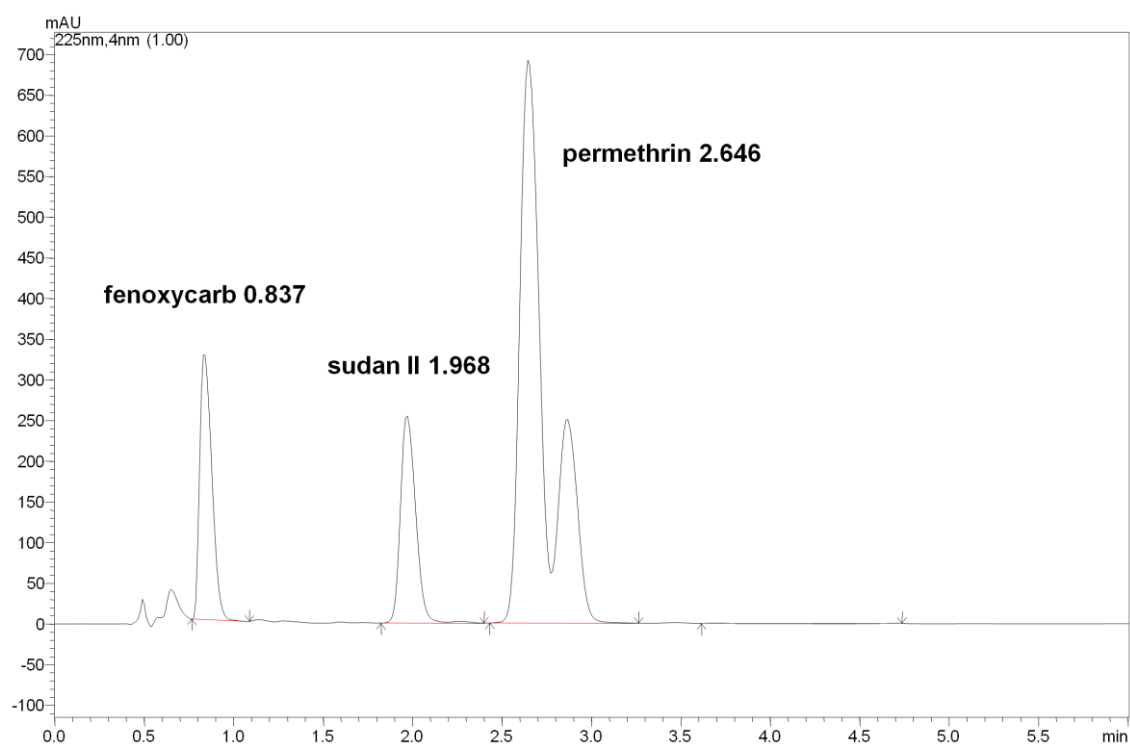
Acetonitril - Voda	t_R (min)		
	Fenoxycarb	IS	Permetrin
50:50	1,34	4,52	8,25
55:45	1,03	2,91	4,51
60:40	0,84	1,97	2,65

Obrázek č. 14 - chromatogram separace za podmínek acetonitril - voda (50:50)



Obrázek znázorňuje chromatogram za podmínek složení mobilní fáze v poměru acetonitril – voda (50:50). Separace všech látek probíhá až k základní linii, došlo k prodloužení doby analýzy.

Obrázek č. 15 - chromatogram separace za podmínek acetonitril - voda (60:40)



Obrázek znázorňuje chromatogram za podmínek složení mobilní fáze v poměru acetonitril – voda (60:40). Separace všech látek probíhá až k základní linii, došlo ke zkrácení doby analýzy.

5.3.5. Vliv teploty

Vliv teploty byl testován při 50 °C a 70 °C pro srovnání s původní teplotou 60 °C. Každá teplota byla proměřena třikrát a byl spočítán průměr, za podmínek složení mobilní fáze acetonitril – voda (55:45).

a) Vliv na plochu píku

$$A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{60\text{ }^\circ\text{C}}}, \text{ kde}$$

A_i – plocha píku za testovaných podmínek,

$A_{60\text{ }^\circ\text{C}}$ – plocha píku za standardních podmínek.

Byly získány výsledky uvedené v tabulkách . Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimální teplotě se pohybovala v rozmezí 98,15 % až 99,09 % u fenoxycarbu, 97,98 % až 100,49 % u IS a 100,19 % až 100,30 % u permetrinu.

Tabulka č. 14 - vliv teploty na plochu píku (fenoxycarb)

Teplota (°C)	Fenoxycarb	
	A_i	A_R (%)
50 °C	1575963	99,09
60 °C	1590464	100
70 °C	1561021	98,15

Tabulka č. 15 -vliv teploty na plochu píku (IS)

Teplota (°C)	IS	
	A _i	A _R (%)
50 °C	1467948	97,98
60 °C	1498270	100
70 °C	1505661	100,49

Tabulka č. 16 - vliv teploty na plochu píku (permetrin)

Teplota (°C)	Permetrin	
	A _i	A _R (%)
50 °C	6910422	100,30
60 °C	6889785	100
70 °C	6903202	100,19

b) Vliv na retenční čas

Tabulka č. 17 - vliv teploty na retenční čas

Teplota (°C)	t _R (min)		
	Fenoxykarb	IS	Permetrin
50 °C	1,11	3,36	5,3
60 °C	1,03	2,91	4,51
70 °C	0,95	2,47	3,74

Z tabulky vyplývá, že změny teploty působily mírně na retenční čas sudanu II a o něco výrazněji na retenční čas permetrinu.

5.4 Stanovení obsahu fenoxycarbu a permetrinu ve vzorku přípravku Arpalit[®] Neo šampon

Dle postupů uvedených v kap. (4.3 a 4.4) byl připraven roztok standardů a dva vzorky šamponu Arpalit Neo (č.š. V20-02*05/2010). U každého vzorku byly provedeny dvě analýzy a průměr jejich ploch byl přepočítán na navážku 0,8 g.

Obsah fenoxycarbu a permetrinu v šamponu byl spočítán z naměřených hodnot dle následujícího vzorce:

$$c_v = \frac{\frac{A_v}{A_{IS(v)}} \times c_s \times K}{\frac{A_s}{A_{IS(s)}} \times n \times 50}, \text{ kde}$$

c_v – obsah účinné látky v %;

A_v – plocha píku vzorku;

$A_{IS(v)}$ – plocha píku vnitřního standardu v roztoku vzorku;

A_s – plocha píku standardu (fenoxycarb: $A_s = 1551237$; permetrin: $A_s = 6829917$);

$A_{IS(s)}$ – plocha píku vnitřního standardu v roztoku standardu ($A_{IS(s)} = 1493940$);

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

K – korekce na čistotu suroviny (obsah účinné látky v surovině – fenoxycarb: $K = 97,30\%$, permetrin: $K = 98,76\%$.)

Tabulka č. 18 - stanovení obsahu ve vzorku Arpalit[®] Neo šampon

Vzorek	Navážka (g)	A_v (fenoxycarb)	A_v (permetrin)	$A_{IS(v)}$	c (fenoxycarb)	c (permetrin)
1	0,8569	1299890	5851543	1452357	0,1175	0,4875
2	0,8216	1285708	5801071	1496031	0,1176	0,4894

6 Závěr

Pro stanovení účinných látek fenoxycarbu a permetrinu, obsažených ve zkoumaném kosmetickém přípravku Arpalit[®] Neo šampon proti parazitům s bambusovým extraktem, pomocí HPLC za využití metody vnitřního standardu byly nejprve optimalizovány vhodné chromatografické podmínky separace. Poté byl nalezen vhodný vnitřní standard, což bylo barvivo Sudan II. Tato metoda byla poté validována a byl stanoven obsah účinných látek v kosmetickém přípravku.

Pro separaci byly optimální chromatografické podmínky metody HPLC tyto:

<i>Chromatograf:</i>	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
<i>Detektor:</i>	Shimadzu M 20A Prominence Diode Array Detector
<i>Kolona:</i>	Ascentis Express RP-Amide, 100 x 3 mm, 2,7 μm částice
<i>Dávkování:</i>	2 μl
<i>Detekce:</i>	UV, 225 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	Acetonitril – Voda (55:45)
<i>Typ eluce:</i>	Izokratická
<i>Průtok:</i>	1,0 ml/min
<i>Teplota:</i>	60 °C
<i>Čas analýzy:</i>	6 min
<i>Vyhodnocení:</i>	Chromatografický software LC Solution

Byl také proveden test vhodnosti chromatografického systému. Počet teoretických pater, který vyjadřuje účinnost kolony, měl hodnoty N pro fenoxycarb 657, pro IS 3228 a pro permetrin 4434. Faktor symetrie A_s byl pro fenoxycarb 1,422, pro IS 1,151 a pro permetrin 1,017. Rozlišení chromatografických píků fenoxycarbu a IS bylo 10,612, rozlišení píků IS a permetrinu bylo 6,524.

Při testu opakovatelnosti bylo měření provedeno na 3 hladinách, u fenoxycarbu byly výsledky relativní směrodatné odchylky (RSD) 0,38%, 0,13% a 0,12%, u IS 0,19%, 0,88% a 0,34% a u permetrinu 0,31%, 0,07% a 0,07%.

U vyhodnocení linearity byl sledován korelační koeficient a tento odpovídal u fenoxycarbu 0,9999 a u IS a permetrinu 0,9998.

Při zjišťování přesnosti byla zjišťována RSD, pro fenoxycarb měla hodnotu 0,41% a pro permetrin 0,70%.

Správnost stanovení, resp. výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 98,58% do 106,97% pro fenoxycarb a od 97,87% do 106,22% pro permetrin.

Testováním robustnosti byla dokázána vhodnost podmínek separace, tj. teploty a složení mobilní fáze. K dokonalé separaci všech složek dochází po celé testovací rozmezí, změna složení mobilní fáze a výše teploty ovlivňují pouze dobu trvání analýzy.

Ačkoliv tyto sledované parametry mají stanovené požadavky na jejich hodnoty, vzhledem k tomu, že se jedná o kosmetický přípravek, není nezbytné dodržovat limity těchto parametrů.

Obsah účinných látek byl stanoven na 0,118 % u fenoxycarbu a 0,488% u permetrinu.

7 Seznam použité literatury

- [1] <http://www.arpalit.cz/psi/antiparazitarni-vyroby/arpalit-neo-sampon-proti-parazitum-s-bambusovym-extraktem> (březen 2012)
- [2] DUCHÁČEK, Lubomír, LAMKA Jiří: Veterinární vademecum pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2006, s. 5 – 7
- [3] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=51605#x27> (březen 2012)
- [4] <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/fenoxycarb-ext.html> (březen 2012)
- [5] ŠVESTKOVÁ Petra, Vývoj HPLC metody pro stanovení účinných látek v přípravku Arpalit, Hradec Králové, 2009
- [6] <http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/permethrin/wi/50/kg/> (březen 2012)
- [7] http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=40326&loc=ec_rcs#x27 (březen 2012)
- [8] <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+52645-53-1> (březen 2012)
- [9] Český lékopis 2009, Grada Publishing a.s., Praha 2009, s. 106 - 107
- [10] <http://www.hplc.cz/> (březen 2012)
- [11] HANAI, Toshiko: HPLC a practical guide, Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999, s. 11 – 24
- [12] WEBB Michael L., LEE, David C.: Pharmaceutical analysis, Blackwell, Oxford 2003, s. 45
- [13] MEYER, Veronika R.: Practical high-performance liquid chromatography, Wiley, Chichester 2010, s. 117 – 120

- [14] RUTA, Joséphine, ZURLINO Daria, GRIVEL Candice, HEINISCH Sabine, VEUTHEY Jean-Luc, GUILLARME Davy: Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest, *Journal of Chromatography A* 2012, roč. 1228, s. 221-231, ISSN 00219673
- [15] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express/fused-core-advantage.html> (duben 2012)
- [16] OLÁH, Erzsébet, FEKETE, Szabolcs, FEKETE, Jenő, GANZLER, Katalin, VEUTHEY, Jean-Luc, GUILLARME, Davy: Comparative study of new shell-type, sub-2 μ m fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance, *Journal of Chromatography A* 2010, roč. 1217, č. 23, s. 3642-3653, ISSN 00219673
- [17] <http://www.mn-net.com/tabid/11797/language/en-US/default.aspx> (duben 2012)
- [18] http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/General_Information/t403121.Par.0001.File.tmp/t403121.pdf (duben 2012)
- [19] HAVLÍKOVÁ, Lucie, MATYSOVÁ, Ludmila, HÁJKOVÁ, Renata, ŠATÍNSKÝ, Dalibor, SOLICH, Petr: Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18 stationary phase - Application to analysis of triamcinolone acetonide, *Talanta* 2008, roč. 76, č. 3, s. 597-601, ISSN 00399140
- [20] PELLATI, Federica, BENVENUTI, Stefania: Fast high-performance liquid chromatography analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary phase, *Journal of Chromatography A* 2007, roč. 1165, 1-2, s. 58-66, ISSN 00219673
- [21] BÜCHELE, Berthold, ZUGMAIER, Waltraud, GENZE, Felicitas, SIMMET, Thomas: High-performance liquid chromatographic determination of acetyl-11-keto- α -boswellic acid, a novel pentacyclic triterpenoid, in plasma using a fluorinated stationary phase and photodiode array detection - Application in pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B* 2005, roč. 829, č. 1-2, s. 144-148, ISSN 15700232

- [22] VYBÍRALOVÁ, Zuzana, NOBILIS Milan, ZOULOVÁ Jana, KVĚTINA Jaroslav, PETR, P: High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples: Application in pharmacokinetic studies, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005, roč. 37, č. 5, s. 851-858, ISSN 07317085
- [23] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-hplc-columns/rp-amide.html> (duben 2012)
- [24] BENHAIM, Deborah, GRUSHKA, Eli: Characterization of Ascentis RP-Amide column: Lipophilicity measurement and linear solvation energy relationships, Journal of Chromatography A 2010, roč. 1217, č. 1, r. 65-74, ISSN 00219673
- [25] HANSEN, Steen, PEDERSEN-BJERGAARD, Stig, RASMUSSEN Knut: Chemical analysis in pharmaceutical science, West Sussex: John Wiley, Chichester 2012, s. 313 – 314
- [26] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=24851931#x27> (duben 2012)
- [27] <http://www.guidechem.com/products/3118-97-6.html> (duben 2012)
- [28] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pigmented%20contact%20dermatitis%20from%20azo%20dyes.%20I.%20Cross-sensitivity%20in%20humans> (duben 2012)
- [29] FISHBEIN, Lawrence, PEDERSEN-BJERGAARD Stig, RASMUSSEN Knut, Potential industrial carcinogens and mutagens, New York: distributors for the U.S. and Canada, Elsevier/North Holland 1979, s. 394 - 395
- [30] CHOCHOLOUŠ, Petr, ŠATÍNSKÝ, Dalibor, SLADKOVSKÝ, Radek, POSPÍŠILOVÁ, Marie, SOLICH, Petr: Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column, Talanta 2008, roč. 77, č. 2, s. 566-570, ISSN 0039-9140