

Разработка и валидация методики определения содержания действующего вещества — флувалината в ветеринарном препарате против варроатоза

📄 | ECA-МИ-1/5-01-02-15

👤 | Сергей Хатунцев, химик-исследователь
Ольга Виноградова, к.х.н.
начальник отдела исследований и разработок
ООО «ЕКА Сервис», Санкт-Петербург

📅 | 04.05.2016

📍 | Кристалл 5000, ЗАО СКБ «Хроматэк»

Введение

В статье представлены результаты по разработке и валидации процедуры определения флувалината — действующего вещества препаратов против варроатоза у пчёл. Возбудителем заболевания являются клещи *Varroa destructor*, которые, поселяясь на теле пчелы, питаются её кровью, что приводит к гибели пчёл. Заболевание поражает личинки и куколки, в результате чего появляется нежизнеспособное потомство. Варроатоз является карантинным заболеванием; зараженная варроатозом семья пчёл проявляет расстройства обычного поведения; на фоне варроатоза усугубляются другие заболевания, что может приводить к массовой гибели пчёл [1].

Одним из подходов для борьбы с варроатозом является контактная обработка пчёл препаратами-акарицидами, к которым относится действующее вещество флувалинат. Для этих целей используются две препаративные формы вещества: самоэмульгирующиеся водные растворы и деревянные (или полимерные) пластины, пропитанные препаратом.

Поскольку данный вид препаратов является ветеринарным, в ходе процесса производства должен выполняться аналитический контроль качества продукции, в том числе, контроль входного сырья и контроль концентрации действующего вещества в препарате [2].

Представляемая в данной статье методика была

разработана и валидирована по заказу компании-производителя данного вида препаратов. Методика устанавливает метод определения содержания флувалината в водных эмульсиях и деревянных пластинах методом газовой хроматографии с детектором электронного захвата.

Экспериментальная часть

Назначение и область применения методики измерений

Методика предназначена для целей технологического контроля и контроля качества готовой продукции для производства препаратов против варроатоза пчёл на основе флувалината.

Объектами анализа в рамках данной методики являются: ветеринарный препарат «Апифит» в виде деревянных пластин, пропитанных раствором флувалината, исходная эмульсия флувалината — коммерчески доступное сырье, а также рабочая эмульсия флувалината — реактив, который готовится посредством разбавления исходной эмульсии флувалината и используется непосредственно для пропитывания деревянных пластин препарата.

Методика обеспечивает получение результатов измерений с метрологическими характеристиками, не превышающими значений, приведенных в таблице 1.

Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15.

Объект	Диапазон измерений	Относительная расширенная неопределённость измерений (при коэффициенте охвата $k=2$), U^0 , %	Предел повторяемости результатов измерений, r , %
Экземпляры препарата «Апифит» (деревянные пластины)	75 – 125 мг/экземпляр	15	5
Исходная эмульсия флувалината	180 – 300 г/дм ³	15	5
Рабочая эмульсия флувалината	36 – 60 г/дм ³	15	5

Таблица 1. Метрологические характеристики методики.

Объекты исследования

Разработка методики осуществлялась с использованием образцов препарата «Апифит», а также коммерчески доступного реагента водной эмульсии флувалината.

Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

- Газовый хроматограф, оснащенный детектором электронного захвата и компьютерной системой обработки хроматографических данных, например, Кристалл-5000.2.
- Колонка хроматографическая капиллярная типа DB-5 длиной 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм.
- Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 специального или высокого класса точности, например, МТ MS204S.
- Микрошприцы хроматографические вместимостью 10, 50, 100, 250 и 500 мм³ с погрешностью дозирования не более 5 %, например, Hamilton серия 700.
- Колбы мерные по ГОСТ 1770, 2-го класса точности, вместимостью 50 и 100 см³.
- Дозатор пипеточный регулируемый со сменными наконечниками 50 – 1000 мм³.
- Набор ареометров общего назначения стеклянных АОН-1.
- Стандартный образец состава флувалината, например, СОП 43-06, с содержанием основного вещества не менее 88,0 %.
- Мельница лабораторная, например, ЛЗМ-М.
- Центрифуга лабораторная до 3500 об/мин, например, ELM1 CM-6M.
- Экстракционный аппарат Сокслета с камерой объемом 70 см³.
- Плитка электрическая лабораторная, например, ИКА С-MAG HP7.
- Бумага фильтровальная в листах марки ФС по ГОСТ 12026.
- Пробирки полипропиленовые центрифужные 15 см³ с винтовыми крышками, например, Corning кат. номер 430791.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
- Ацетон квалификации «ч.д.а.» по ГОСТ 2603.
- Гексан эталонный по СТП ТУ СОМР 3-012-06.
- Азот газообразный высокой чистоты по ГОСТ 9293 или генератор азота лабораторный PEAK Precision Nitrogen 250cc, кат. № 65-3000.

Результаты и их обсуждение

Флувалинат представляет собой смесь двух изомеров. При выбранных условиях хроматографирования изомеры выходят в виде двух неразделенных до базовой линии пиков; для расчета концентрации определяют сумму площадей пиков. Пример хроматограммы представлен на рисунке 1.

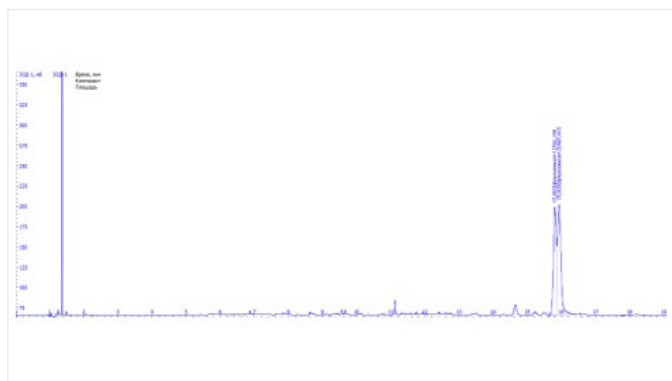


Рис. 1. Пример хроматограммы экстракта флувалината из пластины препарата «Апифит».

Определение содержания флувалината проводится по методу абсолютной градуировки по растворам с известной концентрацией, приготовленных из стандартного образца. Линейность градуировки сохраняется, по крайней мере, в диапазоне от 1 до 10 мкг/см³. В методике для выполнения измерений рекомендуется проводить градуировку в диапазоне концентраций флувалината 2 – 6 мкг/см³. Проведенные испытания показали, что градуировочная характеристика является стабильной не менее 14 дней.

Параметр	Значение
Температура ЭЗД	320 °С
Расход поддувного газа ЭЗД	40 см ³ /мин
Поток газа-носителя	3 см ³ /мин
Деление потока	1:20
Начальное давление газа-носителя	180 кПа
Температура испарителя	280 °С
Время анализа	25 мин
Температурная программа термостата колонок	
Начальная температура — 60 °С	1 мин
Подъем до 270 °С	20 °С/мин
Выдержка при 270 °С	10 мин
Подъем до 300 °С	50 °С/мин
Выдержка при 300 °С	до конца анализа

Таблица 2. Параметры хроматографического режима.

Процедура подготовки проб и хроматографический анализ эмульсии флувалината

Поскольку флувалинат практически нерастворим в воде, для приготовления коммерчески доступной растворимой формы используют высокомолекулярные эмульгаторы. Прямой хроматографический анализ такой эмульсии невозможен из-за высокого содержания эмульгатора. Для извлечения флувалината из эмульсии используется экстракция ацетоном и последующее центрифугирование раствора с целью отделения выпавшего осадка эмульгатора от раствора флувалината. Исследование процесса эффективности экстракции флувалината приведено в таблице 3.

Этапы экстракции	Сумма площадей пиков флувалината, у.е., среднее по трем измерениям	Эффективность экстракции, %
1-я экстракция	18790	99,5%
2-я экстракция	70	0,38%
3-я экстракция	не обнаружен	–

Таблица 3. Определение эффективности экстракции флувалината из эмульсии.

Для анализа используют навеску эмульсии (0,200 ± 0,050) г; экстракцию пробы проводят, добавляя 10 см³ ацетона, полученный экстракт флувалината отделяют от выпавшего осадка методом декантации.

Осадок эмульгатора дважды промывают ацетоном (2×10 см³), при этом раствор ацетона, полученный после промывки, объединяют с начальным экстрактом. Объединенные экстракты переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, доводят до метки ацетоном и тщательно перемешивают.

Для проведения хроматографического анализа готовят аналитические пробы. Для этого полученный ацетоновый экстракт разбавляют гексаном. Коэффициенты разбавления для экстрактов исходной и рабочей эмульсий приведены в таблице 4.

Вид эмульсии / концентрация флувалината	Коэффициент разбавления, К
Исходная эмульсия / (240±20) г/дм ³	0,002 (1 : 500)
Рабочая эмульсия / (45±5) г/дм ³	0,01 (1 : 100)

Таблица 4. Коэффициенты разбавления ацетонового экстракта эмульсии для получения аналитической пробы.

Навеска эмульсии флувалината, мг	Масса флувалината в навеске эмульсии, мг	Массовая доля флувалината, %	Среднее содержание флувалината, масс %, n=5	ОСКО, %
201,1	45,27	22,51	23,57	2,98
309,2	75,69	24,48		
362,9	85,86	23,66		
398,5	93,73	23,52		
462,9	109,66	23,69		

Таблица 5. Показатели определения концентрации флувалината в эмульсии.

Процедура подготовки проб и хроматографический анализ для препарата «Апифит»

Экстракцию действующего вещества с деревянных пластин проводят с помощью аппарата Сокслета. Для этого предварительно препарат измельчают: деревянную пластину разрезают на произвольное количество частей таким образом, чтобы вся полученная совокупность уместилась в измельчающей камере лабораторной мельницы. Мельницу закрывают крышкой и проводят измельчение препарата до частиц, имеющих размеры не более 10 мм. Рекомендуется проводить измельчение последовательным включением мельницы на (45±5) с не менее трех раз.

Полученный измельченный материал количественно переносят в экстракционный патрон, свернутый из фильтровальной бумаги. Патрон с материалом помещают в экстракционную камеру аппарата Сокслета. Собирают экстракционную установку. В аппарат заливают ацетон в количестве равном двум полным сливам из экстракционной камеры. Включают нагрев колбы установки. Экстракцию измельченного препарата проводят в течение 4 часов.

Расчет массовой концентрации флувалината в пробе эмульсии, С_{эмульсии}, г/дм³, проводят по формуле:

$$C_{\text{эмульсии}} = \frac{K \cdot C_{\text{ан.пр.}} \cdot V_{\text{ац.экстр.}} \cdot \rho_{\text{эм.}}}{1000 \cdot M_{\text{эм.}}}$$

где V_{ац.экстр.} — объем ацетонового экстракта, полученного при экстрагировании эмульсии; дм³;

K — коэффициент разбавления;

ρ_{эм.} — плотность эмульсии, кг/дм³;

M_{эм.} — навеска эмульсии, используемая для получения аналитической пробы, г.

Примечание: Плотность эмульсии измеряют при помощи ареометра. Допускается использовать значение плотности, указанное в сопроводительных документах на партию эмульсии флувалината.

Описанная процедура позволяет достичь хорошей сходимости результатов анализа (таблица 5).

Полученный экстракт количественно переносят в мерную колбу на 100 см³, доводят ацетоном до метки и тщательно перемешивают. Аналитическую пробу готовят путем разбавления полученного раствора гексаном в 250 раз. Строение аппарата Сокслета представлено на рис. 2.

При отработке процедуры подготовки проб была проверена устойчивость флувалината в условиях экстракции в аппарате Сокслета.

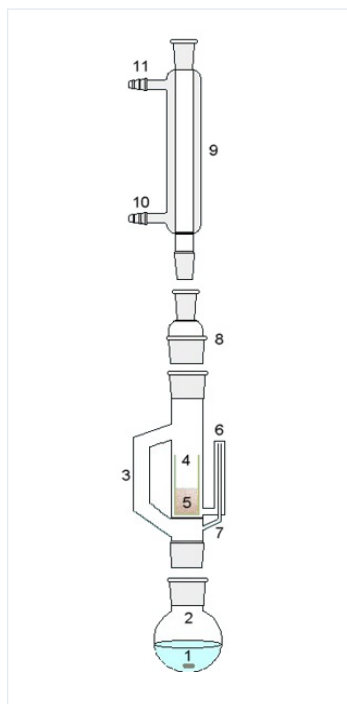


Рис. 2. Аппарат Сокслета.

1 – экстракт, 2 – колба-приемник экстракта, 3 – паропроводящая трубка, 4 – экстракционная камера, 5 – образец в экстракционном патроне, представляющем собой цилиндр из фильтровальной бумаги с загнутым в виде дна нижним краем, 6 – сифонирующая трубка, 7 – слив сифонирующей трубки, 8 – переходная муфта, 9 – проточный стеклянный холодильник, 10 – подача воды, 11 – слив воды.

	Введено флувалината, мг	Найдено флувалината, мг	Относительная разница, %
Образец 1	92,215	92,155	менее 1
Образец 2	102,245	97,502	4,64
Образец 3	112,276	110,42	1,65

Таблица 6. Определение концентрации флувалината методом добавок.

Заключение

Отработана и валидирована процедура определения действующего вещества — флувалината в водной эмульсии и ветеринарном препарате «Апифит». Предложенный метод анализа обеспечивает правильную и точную процедуру измерений с использованием оптимального подхода к подготовке проб и современного хроматографического оборудования. Предложенная методика анализа также регламентирует контрольные процедуры для обеспечения правильности и точности измерений.

Расчет массы флувалината в экземпляре препарата «Апифит», М, г, проводят по формуле:

$$M = C_{\text{ан.пр.}} \cdot V_{\text{ац.эстр.}} \cdot 250$$

где $V_{\text{ац.эстр.}}$ — объем ацетонового экстракта, полученного при экстрагировании эмульсии; дм^3 ;

$C_{\text{ан.пр.}}$ — концентрация флувалината в аналитической пробе.

За результат измерения принимают значение массы флувалината в единичном экземпляре препарата «Апифит».

Правильность предложенного метода анализа проверяли методом добавок. Для этого древесные опилки, заведомо не содержащие флувалината, были пропитаны ацетоновым раствором флувалината, приготовленным из стандартного образца, и высушены на воздухе в экстракционном патроне. Затем была проведена экстракция описанным выше способом и получены следующие данные о содержании флувалината (таблица 6).

Список литературы

1. Домацкий А.Н. Эффективность акарицидов при варроатозе. *Международный научно-исследовательский журнал*, № 7 (73), стр. 61 – 64.
2. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», ст. 17.