

РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ-МЕТОДУ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФІПРОНІЛУ ТА S-МЕТОПРЕНУ У КРАПЛЯХ ПРОТИ БЛІХ ТА КЛІЩІВ

*Р. Д. Остапів, канд. біол. наук,
В. І. Ткаченко, канд. біол. наук,
С. Л. Гуменюк, старший науковий співробітник
Л. К. Самарська, старший науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
romostapiv@scivp.lviv.ua

Фіпроніл – селективний блокатор метаболічних йонних рецепторів нервової системи безхребетних тварин. А S-метопрен аналог ювенільного гормону, який веде до зупинки розвитку та репродукції комах. Ці діючі речовини застосовуються у інсекто-акарицидних краплях для знищення та попередження розмноження вошей, бліх та кліщів у домашніх улюбленців.

Мета роботи полягала в розробці методики ідентифікації та одночасного кількісного визначення фіпронілу та S-метопрену в краплях для зовнішнього застосування. Методику розробили та валідували за показниками вибіркової, лінійності та параметрами придатності хроматографічної системи. В якості зразка-об'єкту для розробки використовували інсекто-акарицидні краплі для зовнішнього застосування. Стандартний зразок та випробну пробу розчиняли у ацетонітрилі, до концентрації фіпронілу 100 мкг/мл та S-метопрену 90 мг/мл. Зразки розділяли на хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному хроматографічною колонкою Acclaim C18 150×4,6, 5 μm. Рухомою фазою була суміш ацетонітрилу та води в об'ємному співвідношенні 90:10. Фіпроніл та S-метопрен детектували за довжини хвилі поглинання – 270 нм.

За вищевказаних умов вдалося повністю розділити фіпроніл та S-метопрен (час утримування виходу хроматографічних піків – 2,3 хв та 7,6 хв) та інші компоненти досліджуваного препарату. При цьому, параметри придатності хроматографічної системи не виходили за межі, зазначені в рекомендаціях USA Food and Drug Association. Для піків фіпронілу та S-метопрену ефективність хроматографічної системи становила 8300–13000 теор. тарілок. Відносний стандартний відхил (RSD) для площ піків діючих речовин становив ± 0,50 %, а коефіцієнт розділення піків (R_s) фіпронілу, S-метопрену та інших компонентів препарату становив 27,6. Коефіцієнт симетрії піку фіпронілу становив – 1,4, а S-метопрену – 1,2. Калібрувальні криві були лінійними у рекомендованому ДФУ 2.0 діапазоні (80–120 % від номінальної концентрації відповідної діючої речовини). Коефіцієнт лінійності (R^2) для фіпронілу становив – 0,9990, а для S-метопрену – 0,9989.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ФІПРОНІЛ, ВАЛІДАЦІЯ, S-МЕТОПРЕН, КРАПЛІ ПРОТИ БЛІХ ТА КЛІЩІВ.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF FIPRONIL AND S-METHOPRENE IN DROPS AGAINST FLEA AND TICKS

R. D. Ostapiv, V. I. Tkachenko, S. L. Humeniuk, L. K. Samarska

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
romostapiv@scivp.lviv.ua

Fipronil is a selective blocker of metabotropic ion receptors of the nervous system of invertebrate animals. And S-methoprene is an analogue of the juvenile hormone, which leads to the arrest of the development and reproduction of insects. These active substances are used in insect-acaricidal drops to destroy and prevent the reproduction of lice, fleas and ticks in pets.

Aim of the work was to develop a method for the identification and simultaneous quantification of fipronil and S-methoprene in drops for external use. The method was developed and validated by indicators of selectivity, linearity and suitability parameters of the chromatographic system. Insecto-acaricidal drops for external use were used as a sample-object for development. The standard sample and the test sample were dissolved in acetonitrile to fipronil concentration – 100 µg/ml and S-methoprene – 90 µg/ml. The samples were separated on a Dionex Ultimate 3000 chromatograph equipped with an Acclaim C18 chromatographic column 150×4.6, 5 µm. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water in a volume ratio of 90:10. Fipronil and S-methoprene were detected at an absorption wavelength of 270 nm.

Under the above-mentioned conditions, it was possible to completely separate fipronil and S-methoprene (retention time of the chromatographic peaks - 2.3 min and 7.6 min) and other components of the studied drug. At the same time, the suitability parameters of the chromatographic system did not exceed the limits specified in the recommendations of the USA Food and Drug Association for HPLC methods. For fipronil and S-methoprene peaks the efficiency of the chromatographic system was 8300–13000 theor. plates. The relative standard deviation (RSD) for the peak areas of the active substances was ± 0.50%, and the peak separation ratio (RS) of fipronil and S-methoprene and other drug components was 27.6. The symmetry coefficient of the fipronil peak was 1.4, and that of S-methoprene was 1.2. The calibration curves were linear in the recommended DFU 2.0 range (80–120% of the nominal concentration of the corresponding active substance). The coefficient of linearity (R^2) for fipronil was 0.9990, and for S-methoprene it was 0.9989.

Keywords: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, FIPRONIL, VALIDATION, S-METHOPRENE, FLEA AND TICK DROPS.

Фіпроніл – інсектицид з класу фенілпіразолів, що інгібує передачу нервових подразників ГАМК-залежних рецепторів (Simon-Delso et al, 2014). Тобто відбувається незворотне зв'язування фіпронілу з рецепторами γ -аміномасляної кислоти, що веде до паралічу і смерті бліх та кліщів. Речовина має найвищий ефект при безпосередньому контакті з шкідниками та через споживання ними отруєної їжі (Gunasekara et al, 2007). Афінність фіпронілу до ГАМК-залежних рецепторів у комах є набагато вищою, ніж до подібних рецепторів у тварин, тому за відповідного дозування та використання фіпроніл не несе небезпеки для людини й інших тварин (Bhatt et al, 2023). Фіпроніл застосовується у препаратах для боротьби з блохами та кліщами. В останній час набули популярності комбінації фіпронілу з S-метопреном (Kotsiumbas et al., 2015).

S-метопрен – протипаразитарний препарат, який володіє овцидним ефектом (Tianyun et al, 2023). За хімічною структурою S-метопрен є аналогом гормону росту у комах тому використовується для попередження дозрівання личинок бліх та їх розмноження (Daglish,

2008). S-метопрен широко використовується для боротьби з розмноженням домашніх мух, бліх, комарів та кліщів у розчинах та порошках, а у комбінації з фіпронілом – у краплях для зовнішнього застосування (Kotsiumbas et al., 2015).

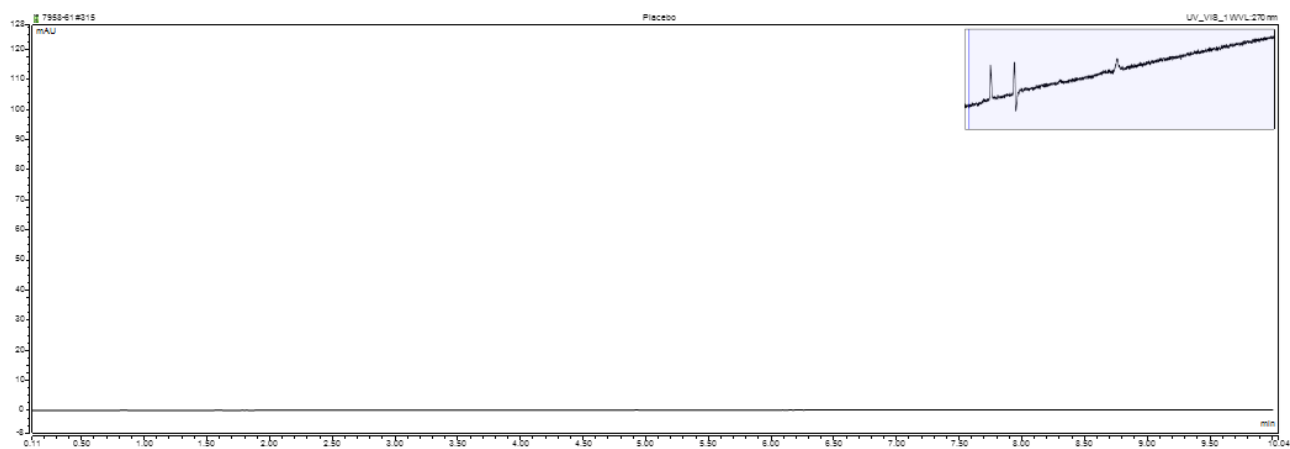
Фіпроніл та S-метопрен мають синергічну протипаразитарну дію, яка знищує більшість паразитів домашніх тварин, оскільки фіпроніл знищує дорослих особин, а S-метопрен – незрілі личинки та яйця комах (Dryden et al, 2013). Разом з тим, S-метопрен та фіпроніл володіють різною хроматографічною рухливістю, проте однаковим спектром поглинання 265-275 нм, що унеможливило їх аналіз прямим спектрофотометричним методом. Тому, найкращий метод для кількісного визначення даних речовин – високоефективна рідинна хроматографія. Метою роботи було розробити та валідувати методику одночасного кількісного визначення фіпронілу та S-метопрену методом ВЕРХ з ультрафіолетовим детектуванням.

Матеріали і методи. У роботі використовували стандартні зразки фіпронілу та S-метопрену виробництва Sigma-Aldrich. Вихідні розчини фіпронілу та S-метопрену з концентрацією 1 та 0,9 мг/мл, відповідно, готували з урахуванням чистоти стандартних зразків згідно із сертифікатами якості, шляхом розчинення у ацетонітрилі. Вихідні розчини розводили тим самим розчинником до концентрації робочих розчинів стандартних зразків (100 мкг/мл для фіпронілу та 90 мкг/мл для S-метопрену). Досліджувані зразки крапель з вмістом фіпронілу та S-метопрену розчиняли до приблизно такої ж концентрації, як і стандартні зразки.

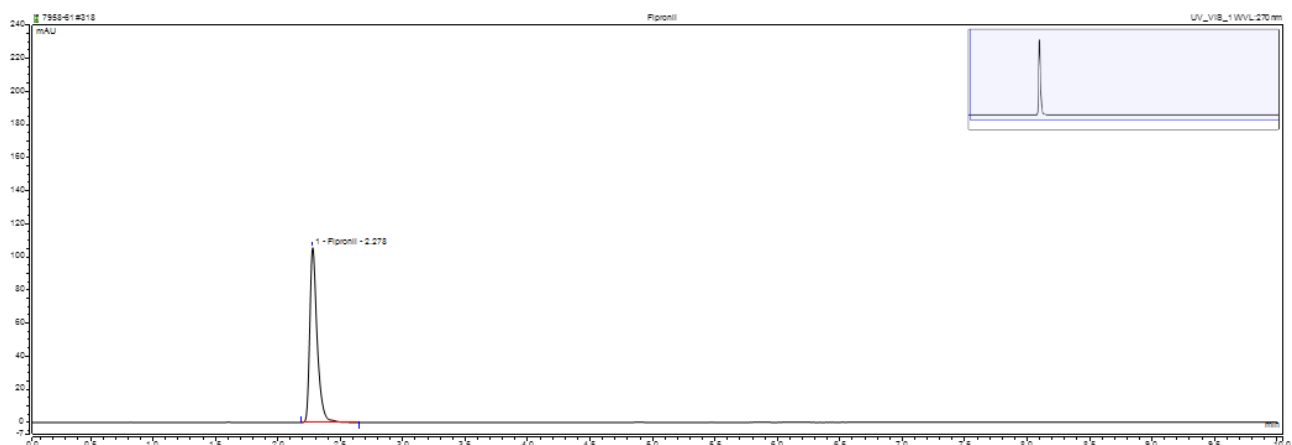
Аналіз виконано на рідинному хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному насосом LPG-3400SD, автосемплером ACC-3000 та діодноматричним детектором DAD-3000. Зразки розділяли на хроматографічній колонці Acclaim C 18 150 × 4,6 мм. Рухомою фазою служила суміш ацетонітрилу та води у об'ємному співвідношенні 9:1. Об'єм інжекції складав 0,005 мл, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки становила 30 °С.

Обчислення результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Chromeleon 7.2. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. Методику валідували за показниками вибірковості, лінійності та придатності хроматографічної системи.

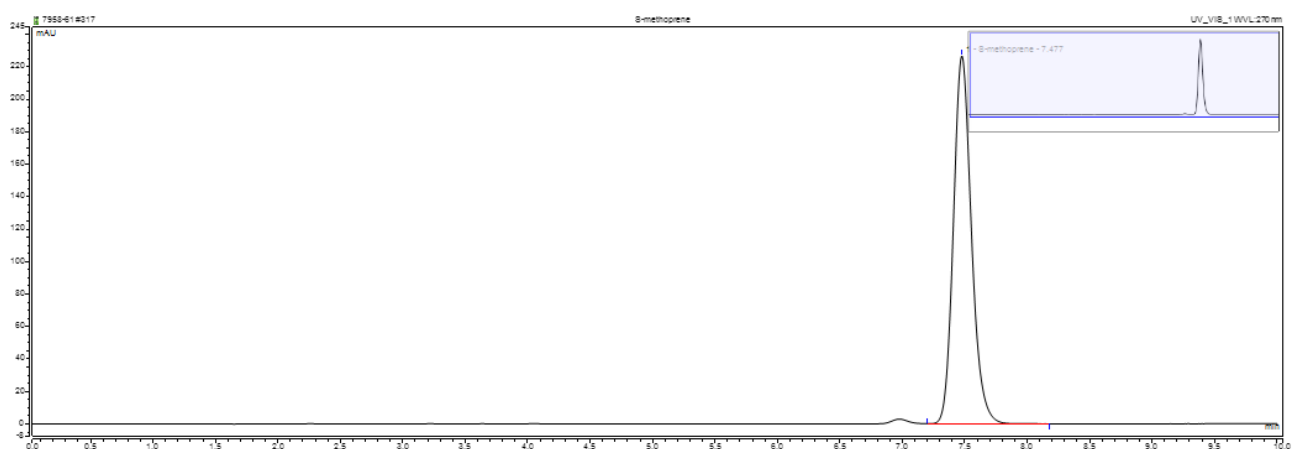
Результати й обговорення. Валідували методику одночасного кількісного визначення фіпронілу та S-метопрену за параметром вибірковості, порівнюючи хроматограми робочого розчину стандартного зразку (РРСЗ), робочого розчину випробної проби (РРВП) і розчину плацебо (РРПл). Жоден пік на хроматограмі РРПл повністю або частково не перекривається за часом утримування з піками фіпронілу та S-метопрену на хроматограмах РРСЗ та РРВП (рис. 1) (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015).



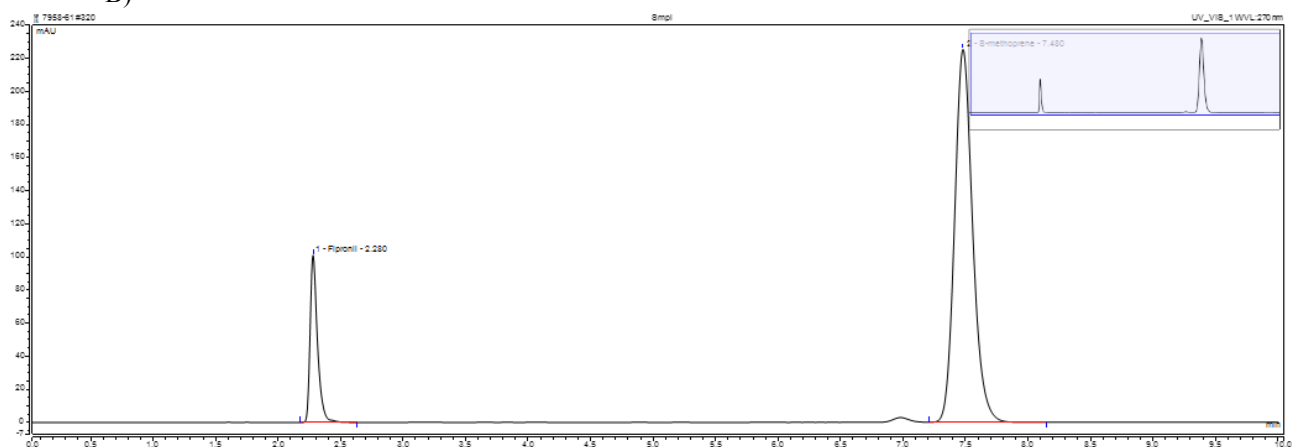
A)



Б)



В)



Г)

Рис. 1. Хроматограми плацебо (А), розчину стандартного зразку фіпронілу (Б), S-метопрену (В) та крапель для зовнішнього застосування з вмістом фіпронілу та S-метопрену (В).

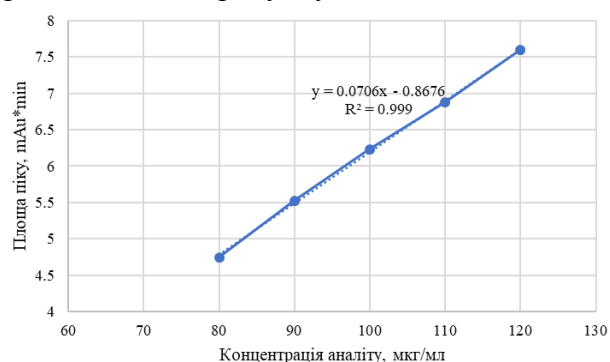
Оскільки, обраний режим хроматографічного розділення забезпечував виконання вимоги ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakoreia Ukrainy 2.0, 2015) до параметру вибірковість, проводили дослідження параметрів хроматографічних піків фіпронілу та S-метопрену (табл.).

Параметри придатності хроматографічної системи

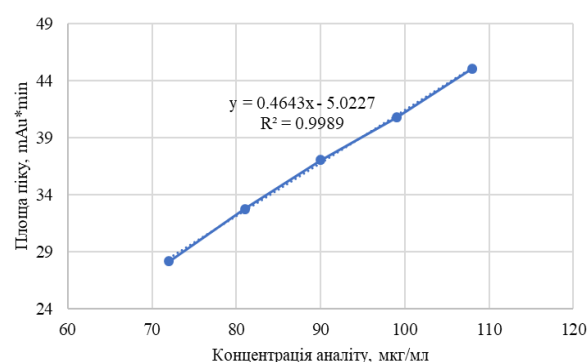
Параметри	Характеристики хроматографічних піків		Вимоги до показника
	Фіпроніл	S-метопрен	
Час утримування, хв.	2,3	7,6	—
Ефективність хроматографічної системи (N)	8300	13000	> 2000
Коефіцієнт симетрії піку (A_s)	1,4	1,2	Від 0,8 до 1,5
Відносний стандартний відхил (RSD) за площею піка, %	0,50	0,45	Не більше 1,43 %
Відносний стандартний відхил (RSD) за часом утримання піка, %	0,01	0,04	< 1%
Ширина піку, хв.	0,5	0,9	—
Ступінь розділення R_s	29,4	29,4	> 1,5

Усі характеристики хроматографічних піків відповідають рекомендаціям FDA по розробці хроматографічних методик (Validation of Chromatographic Methods, 1994). Тому проводили дослідження за параметром лінійність.

Графік залежності площі хроматографічних піків від концентрації аналіту представлено на рисунку 2.



А)



Б)

Рис. 2. Графік залежності площі хроматографічних піків від концентрації аналіту у розчині (А – фіпроніл, Б – S-метопрен).

Коефіцієнт R^2 для площі піків фіпронілу та S-метопрену був у межах, рекомендованих ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. 2015).

ВИСНОВКИ

Досліджувані характеристики методу ідентифікації та кількісного визначання вмісту фіпронілу та S-метопрену у краплях для зовнішнього застосування не виходять за межі критеріїв, зазначених у директиві FDA (Validation of Chromatographic Methods, 1994) та ДФУ 2,0, 2015 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015 a,b), тому метод придатний для продовження валідації за параметром прецизійність та внутрішньолабораторна повторюваність.

Перспективи досліджень. Продовження валідації методики за параметрами робастність, прецизійність та внутрішньолабораторна повторюваність.

References

- Bhatt, P., Gangola, S., Ramola, S., Bilal, M., Bhatt, K., Huang, Y. (2023). Insights into the toxicity and biodegradation of fipronil in contaminated environment. *Microbiological Research*. Vol. 266. DOI:10.1016/j.micres.2022.127247.
- Daglish, G.J. (2008). Impact of resistance on the efficacy of binary combinations of spinosad, chlorpyrifos-methyl and s-methoprene against five stored-grain beetles. *Journal of Stored Products Research*. 44 (1). 71–76. DOI:10.1016/j.jspr.2007.06.003.
- Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH. 1. 910–916 [In Ukrainian].
- Dryden, M.W., Ryan, W.G., Bell, M., Rumschlag, A.J., Young, L.M., Snyder, D.E. Assessment of owner-administered monthly treatments with oral spinosad or topical spot-on fipronil/(S)-methoprene in controlling fleas and associated pruritus in dogs. *Veterinary Parasitology*. 191. 340–346. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.09.003.
- Gunasekara, A.S., Truong, T., Goh, K.S., Spurlock, F., Tjeerdema, R.S. (2007) Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*. 32. 189–199. DOI: 10.1584/jpestics.R07-02.
- Kotsiumbas, I.Ya., Kosenko, Yu.M., et al. (2015). Dovidnyk kormovykh dobavok i premiksiv. Lviv: TzOV VF «Afisha»; 1408. [In Ukrainian].
- Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, USA: FDA. 1994. 33.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M. (2014). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22. 5–34. DOI: 10.1007/s11356-014-3470-y.
- Tianyun, S., Jin-sheng, Y., Ying, Z., Xuhong, Q., Heng, S. (2023). Comparative bioactivity of S-methoprene and novel S-methobutene against mosquitoes (Diptera: Culicidae) *Journal of Medical Entomology*. Doi: 10.1093/jme/tjad110.