УДК: 543.544.5.068.7
doi: 10.36359/scivp.2023-24-2.17

РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ-МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕТИЛБУТИЛАЦЕТАМІНОПРОПІОНАТУ У СПРЕЯХ

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

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

Етилбутилацетамінопропіонат – селективний активатор метаботропних йонних G–рецепторів нервової системи безхребетних тварин, що веде до перезбудження комах та їх відлякування від джерела цієї речовини. Етилбутилацетамінопропіонат використовуються у інсекто-акарицидних спреях для домашніх улюбленців, як репелент проти комарів, вошей, бліх та кліщів.

Мета роботи полягала у розробці методики ідентифікації та кількісного визначання етилбутилацетамінопропіонату в спреї для зовнішнього застосування. Методику розробили та валідували за показниками вибірковості, лінійності та параметрами придатності хроматографічної системи. У якості зразка-об'єкту для розробки методики використовували спрей-репелент. Стандартний зразок та випробну пробу розчиняли у суміші ацетонітрилу та води у об'ємному співвідношенні 1:1, до концентрації етилбутилацетамінопропіонату 50 мкг/мл. Зразки розділяли на хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному хроматографічною колонкою Acclaim C18 250×3,0, 3 μм. Рухомою фазою була суміш ацетонітрилу та води в об'ємному співвідношенні 60:40. Етилбутилацетамінопропіонат детектували за довжини хвилі поглинання – 210 нм.

За вищевказаних умов вдалося повністю розділити етилбутилацетамінопропіонат (час утримування хроматографічного піку – 4,9 хв) та інші компоненти досліджуваного препарату. При цьому, параметри придатності хроматографічної системи не виходили за межі, зазначені в рекомендаціях USA Food and Drug Asossiation. Для етилбутилацетамінопропіонату ефективність хроматографічної системи становила 15100 теоретичних тарілок. Відносний стандартний відхил (RSD) для площ піків діючої речовини становив ± 0,42 %, а коефіцієнт розділення піку (R_S) етилбутилацетамінопропіонату та інших компонентів препарату становив 25,0. Коефіцієнт симетрії піку етилбутилацетамінопропіонату становив – 1,31. Калібрувальна крива була лінійною у рекомендованому ДФУ 2.0 діапазоні (80–120 % від номінальної концентрації діючої речовини). Коефіцієнт лінійності (R^2) для етилбутилацетамінопропіонату становив 0,9991.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ВАЛІДАЦІЯ, ЕТИЛБУТИЛАЦЕТАМІНОПРОПІОНАТ, РЕПЕЛЕНТ.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETHYLBUTYLACETAMINOPROPIONATE IN SPRAYS

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

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

Ethylbutylacetaminopropionate is a selective activator of metabotropic ionic G-receptors of the nervous system of invertebrate animals, which leads to overexcitation of insects and their repelling from the source of this substance. Ethylbutylacetaminopropionate is used in insect acaricidal sprays as a repellent against mosquitoes, lice, fleas and ticks for pets.

The aim of the work was to develop a method of identification and quantitative determination of ethylbutylacetaminopropionate in a spray for external use. The method was developed and validated by indicators of selectivity, linearity and suitability parameters of the chromatographic system. A spray repellent was used as a sample-object for the development of the technique. The standard sample and the test sample were dissolved in a mixture of acetonitrile and water in a volume ratio of 1:1, to a concentration of ethylbutylacetaminopropionate of 50 μg/ml. The samples were separated on a Dionex Ultimate 3000 chromatograph equipped with an Acclaim C18 chromatographic column 250×3.0, 3 μm. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water in a volume ratio of 60:40. Ethyl butylacetaminopropionate was detected at an absorption wavelength of 210 nm.

Under the above conditions, it was possible to completely separate ethylbutylacetaminopropionate (retention time of the chromatographic peak – 4.9 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 ethylbutylacetaminopropionate, the efficiency of the chromatographic system was 15,100 theoretical plates The relative standard deviation (RSD) for the peak areas of the active substances was ± 0.31%, and the peak separation ratio (R_S) of ethyl butylacetaminopropionate and other components of the drug was 25.0. The symmetry coefficient of the ethyl butylacetaminopropionate peak was 1.31. The calibration curve was linear in the recommended DFU 2.0 range (80–120% of the nominal concentration of active substance). The coefficient of linearity (R^2) for ethyl butylacetaminopropionate was 0.9991.

Keywords: HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, VALIDATION, ETHYLBUTYLACETAMINOPROPIONATE, REPELLENT.

Етилбутилацетиламінопропіонат – це безбарвна рідина без запаху, розчинна у воді і органічних розчинниках. Ця речовина була розроблена та синтезована фірмою Merck KGaA (Німеччина) з амінокислоти – β-аланіну та названа IR 3535 (Naucke et al., 2007). Етилбутилацетиламінопропіонат – селективний активатор метаботропних йонних G–рецепторів нервової системи безхребетних тварин, що веде до перезбудження комах. Це в свою чергу призводить до рефлексу уникнення джерела перезбудження (Moreau et al., 2020). Тому, етилбутилацетиламінопропіонат використовується як репелент проти бліх та кліщів. Так, на основі цієї речовини створено ряд препаративних форм репелентів у вигляді лосьйону, гелю, спрею, в тому числі для ветеринарної медицини (Kotsiumbas et al., 2015). Репелентні засоби на основі IR 3535 значно безпечніші, ніж широко впроваджені засоби на основі ДЕТА, завдяки чому їх можна використовувати для захисту людей та тварин (Faulde et al., 2010).

Велика кількість препаратів з IR 3535 на ринку ветеринарної медицини робить актуальним питання розробки методу ідентифікації та кількісного визначення

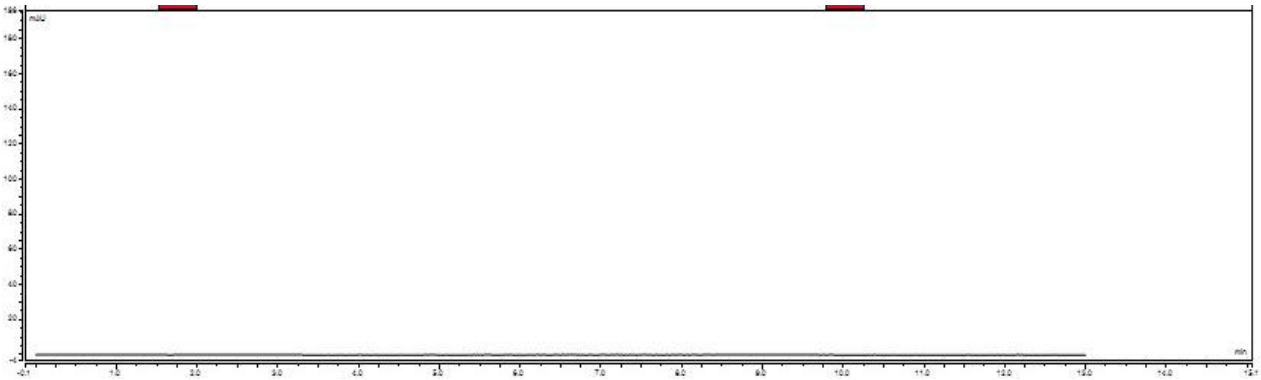
етилбутилацетиламінопропіонату. Пряме спектрофотометричне визначення IR 3535 неможливе, оскільки спектр поглинання та пік поглинання даної речовини співпадає з більшістю розчинників, які використовуються для виготовлення репелентів. Тому, метою роботи було розробити та валідувати методику кількісного визначення етилбутилацетиламінопропіонату у репелентних спреях методом ВЕРХ з ультрафіолетовим детектуванням.

Матеріали і методи. У роботі використовували стандартний зразок етилбутилацетиламінопропіонату, виробництва Sigma-Aldrich. Вихідний розчин етилбутилацетиламінопропіонату з концентрацією 1 мг/мл готували з урахуванням чистоти стандартного зразку згідно із сертифікатом якості, шляхом розчинення у суміші ацетонітрилу та води у об'ємному співвідношенні 1:1. Вихідні розчини розводили тим самим розчинником до концентрації робочого розчину стандартного зразку 50 мкг/мл. Досліджуваний зразок спрею зі вмістом етилбутилацетиламінопропіонату розчиняли до приблизно такої ж концентрації, як і стандартний зразок.

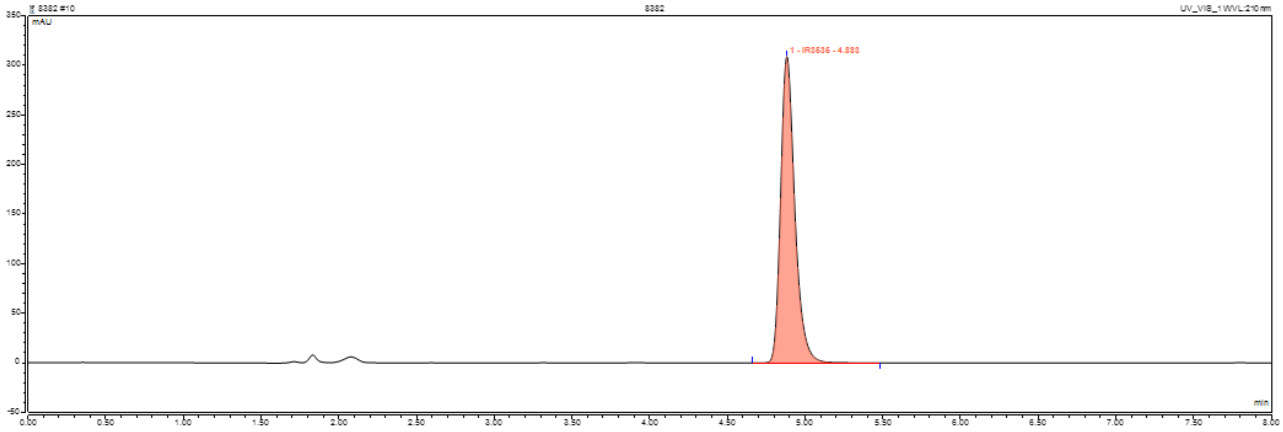
Аналіз виконано на рідинному хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному насосом LPG-3400SD, автосемплером ACC–3000 та діодноматричним детектором DAD-3000. Зразки розділяли на хроматографічній колонці Acclaim C 18 250 × 3,0 мм. Рухомою фазою була суміш ацетонітрилу та води у об'ємному співвідношенні 6:4. Об'єм інжекції складав 0,005 мл, швидкість потоку рухомої фази – 0,4 мл/хв, температура колонки становила 30 ºС.

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.

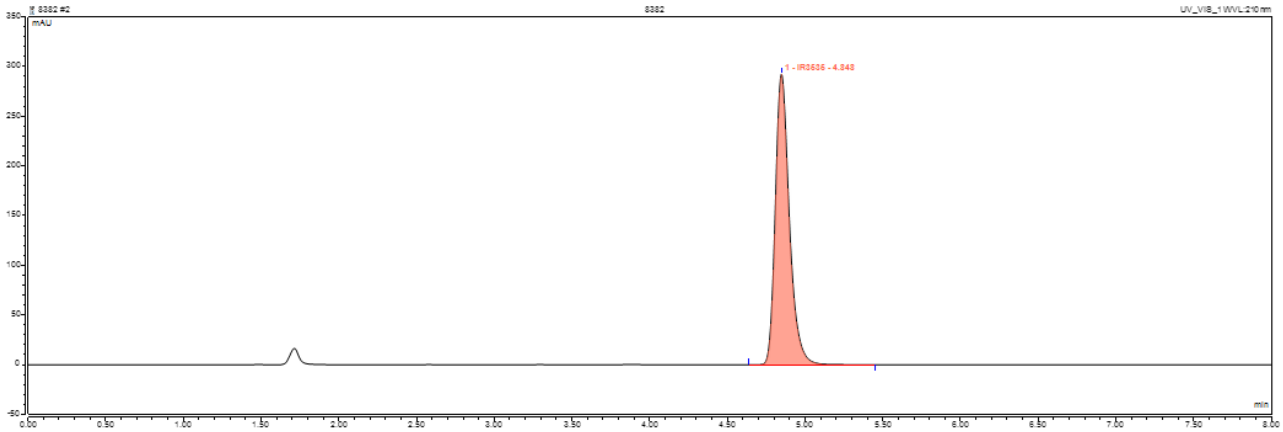
Результати й обговорення. Валідували методику кількісного визначення етилбутилацетиламінопропіонату за параметром вибірковість, порівнюючи хроматограми робочого розчину стандартного зразку (РРСЗ), робочого розчину випробної проби (РРВП) і розчину плацебо (РРПл). Жоден пік на хроматограмі РРПл повністю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



А)



Б)



В)

Рис. 1. Хроматограми плацебо (А), розчину стандартного зразку етилбутилацетиламінопропіонату (Б) та спрею зі вмістом етилбутилацетиламінопропіонату (В)

Оскільки, обраний режим хроматографічного розділення забезпечував виконання вимоги ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015) до параметру вибірковість, проводили дослідження параметрів хроматографічного піку етилбутилацетиламінопропіонату (табл.).

Таблиця

Параметри придатності хроматографічної системи

Параметри	Характеристики хроматографічного піку	Вимоги до показника
Час утримування, хв.	4,9	—
Ефективність хроматографічної системи (*N*)	15100	> 2000
Коефіцієнт симетрії піку (As)	1,31	Від 0,8 до 1,5
Відносний стандартний відхил (*RSD*) за площею піка, %	0,42	Не більше 1,43 %
Відносний стандартний відхил (*RSD*) за часом утримання піка, %	0,05	< 1 %
Ширина піку, хв.	0,9	—
Ступінь розділення R_S	25,0	> 1,5

Усі характеристики хроматографічного піку етилбутилацетиламінопропіонату відповідають рекомендаціям FDA по розробці хроматографічних методик (Validation of Chromatographic Methods, 1994). Тому, проводили дослідження за параметром лінійність. Графік залежності площі хроматографічного піку від концентрації аналіту представлено на рис. 2.

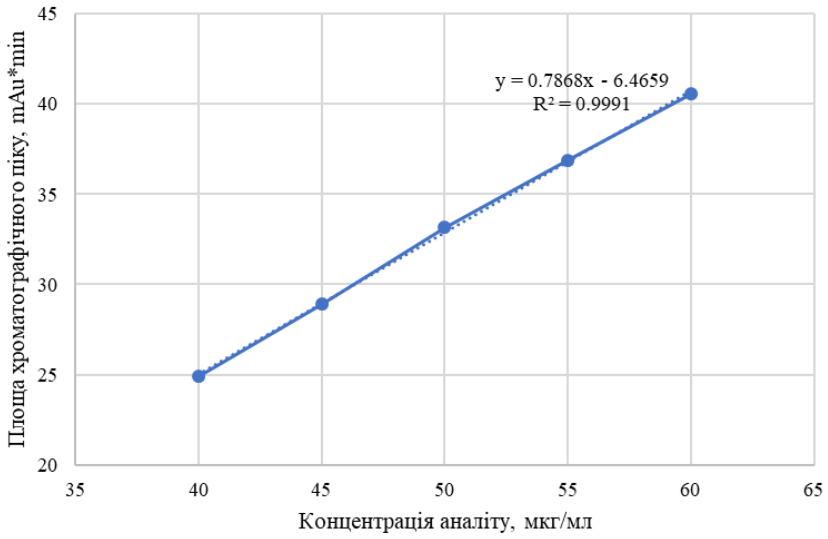


Рис. 2. Графік залежності площі хроматографічного піку від концентрації етилбутилацетиламінопропіонату у розчині

Коефіцієнт R^2 для площі піку етилбутилацетиламінопропіонату був у межах, рекомендованих ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. 2015).

В И С Н О В К И

Досліджувані характеристики методу ідентифікації та кількісного визначання вмісту етилбутилацетиламінопропіонату у спреї 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), тому метод придатний для продовження валідації за параметром прецизійність та внутрішньолабораторна повторюваність.

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

References

Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015). Derzhavne pidpryiemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH. 1. 910–916 [In Ukrainian].

Kotsiumbas I. Ya., Kosenko Yu. M., et al. (2015). Dovidnyk kormovykh dobavok i premiksiv. Lviv: TzOV VF «Afisha»; 1408. [In Ukrainian].

Faulde M.K., Albiez G., Nehring O. (2010). Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. Parasitol Res. 106. 957–965. https://doi.org/10.1007/s00436-010-1749-6.

Moreau E., Mikulska-Ruminska K., Goulu M. (2020). Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control. Sci Rep. 10. 6842–6857. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63957-x

Naucke, T.J., Kröpke, R., Benner, G. et al. (2007). Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535® and Picaridin against Aedes aegypti. Parasitol. Res., 101. 169–177. https://doi.org/10.1007/s00436-006-0450-2.

Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, USA: FDA, (1994).. 33.