

## РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ-МЕТОДУ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІМІДАКЛОПРИДУ ТА ІВЕРМЕКТИНУ 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](mailto:romostapiv@scivp.lviv.ua)

*Імідаклоприд та івермектин – селективні блокатори метаболічних йонних рецепторів нервової системи безхребетних тварин, що веде до паралічу та смерті екто- та ендопаразитів. Ці діючі речовини використовуються у інсекто-акарицидних краплях для знищення вошей, бліх та кліщів у великої та дрібної рогатої худоби і домашніх улюбленців.*

*Мета роботи полягала у розробці методики ідентифікації та одночасного кількісного визначення імідаклоприду та івермектину в краплях для зовнішнього застосування. Методику розробили та валідували за показниками вибіркості, лінійності та параметрами придатності хроматографічної системи. У якості зразка-об'єкту для розробки методики використовували краплі для зовнішнього застосування. Стандартний зразок та випробну пробу розчиняли у ацетонітрилі, до концентрації імідаклоприду 100 мкг/мл та івермектину 10 мкг/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. Івермектин та імідаклоприд детектували за довжини хвилі поглинання – 242 нм.*

*За вищевказаних умов вдалося повністю розділити імідаклоприд та івермектин (час утримування виходу хроматографічних піків – 2,0 хв та 10,0 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 імідаклоприду та івермектину ефективність хроматографічної системи становила 8000–10000 теор. тарілок. Відносний стандартний відхил (RSD) для площ піків діючих речовин становив ± 0,31 %, а коефіцієнт розділення піків ( $R_s$ ) імідаклоприду від івермектину та інших компонентів препарату становив 35,9. Коефіцієнт симетрії піку імідаклоприду становив – 1,5, а івермектину – 1,1. Калібрувальні криві були лінійними у рекомендованому ДФУ 2.0 діапазоні (80–120 % від номінальної концентрації відповідної діючої речовини). Коефіцієнт лінійності ( $R^2$ ) для імідаклоприду становив 0,9991, а для івермектину – 0,9993.*

**Ключові слова:** ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ІМІДАКЛОПРИД, ВАЛІДАЦІЯ, ІВЕРМЕКТИН, КРАПЛІ ПРОТИ БЛІХ ТА КЛІЩІВ.

# DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF IMIDACLOPRID AND IVERMECTIN IN DROPS AGAINST FLEAS 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](mailto:romostapiv@scivp.lviv.ua)

Imidacloprid and ivermectin are selective blockers of metabotropic ion receptors of the nervous system of invertebrates, leading to paralysis and death of ecto- and endoparasites. These active substances are used in insect-acaricidal drops to kill lice, fleas and ticks in cattle, domestic animals and pets.

The aim of the work was to develop a method for the identification and simultaneous quantitative determination of imidacloprid and ivermectin in drops for external use. The method was developed and validated by selectivity, linearity and suitability parameters of the chromatographic system. Drops for external use were used as a sample-object for development. The standard sample and the test sample were dissolved in acetonitrile to a concentration of imidacloprid 100 µg/ml and ivermectin 10 µg/ml. The samples were separated on a Dionex Ultimate 3000 chromatography system equipped with a chromatographic column Acclaim C18 150×4.6, 5 µm. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water in a volume ratio of 90:10. Ivermectin and imidacloprid were detected at an absorption wavelength of 242 nm.

Under the above-mentioned conditions, it was possible to completely separate imidacloprid and ivermectin (retention time of chromatographic peaks – 2.0 min and 10.0 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 the peaks of imidacloprid and ivermectin, the efficiency of the chromatographic system was 8000–10000 theoretical plates. The relative standard deviation (RSD) for the peak areas of the active substances was ± 0.31%, and the peak separation ratio (RS) of imidacloprid from ivermectin and other drug components was 35.9. The symmetry coefficient of the imidacloprid peak was 1.5, and that of ivermectin was 1.1. 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 imidacloprid was 0.9991, and for ivermectin it was 0.9993.

**Keywords:** HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, IMIDACLOPRID, VALIDATION, IVERMECTIN, FLEA AND TICK DROPS.

Імідаклоприд – інсектицид з класу неонікотиноїдів, що інгібує передачу нервових подразників нікотинергічним нейрональним шляхом. Тобто відбувається незворотне зв'язування імідаклоприду з нікотиновими ацетилхоліновими рецепторами, що веде до паралічу і смерті бліх та кліщів (Mikolić & Karačonji, 2018). Речовина має найвищий ефект при безпосередньому контакті з шкідниками через споживання ними отруєної їжі. Афінність імідаклоприду до нікотинових ацетилхолінових рецепторів у комах є набагато вищою, ніж до подібних рецепторів у тварин, тому за відповідного дозування та використання імідаклоприд не несе небезпеки для людини й інших тварин (Abbink, 1991). Це зробило його найпопулярнішим інсектицидом у світі у 1998–2015 роках. Імідаклоприд застосовується у препаратах для системної обробки дерев та злакових культур проти шкідників. Крім цього, він є компонентом у інсектицидних препаратах для обробки ВРХ, ДРХ та деяких інших тварин. В останній час набули популярності комбінації імідаклоприду з івермектином (Kotsiumbas, 2015).

Івермектин – протипаразитарний препарат широкого спектру дії, який використовується для знищення як комах, так і глистів. Вперше застосований для профілактики та лікування дирофіляріозу та акаридозу. В подальшому виявлено, що івермектином можна лікувати педикульоз, коросту, онхоцеркоз, стронгілоїдоз, трихуріоз, аскаридоз і лімфатичний філяріатоз (Laing et al., 2017).

Механізм дії сполуки пов'язаний з незворотнім зв'язуванням з глутамат-залежними хлорними каналами, які наявні у великій кількості у міоцитах та нейронах безхребетних тварин. Інгібування каналів призводить до постійної гіперполяризації клітини, паралічу і смерті комах та червів (Dourmishev et al., 2005). Івермектин використовується у пероральних та ін'єкційних розчинах, а у комбінації з імідаклопридом – у краплях для зовнішнього застосування (Kotsiumbas, 2015).

Разом ці речовини створюють синергічну протипаразитарну дію, яка знищує більшість паразитів домашніх тварин. Одночасно з цим, імідаклоприд та івермектин володіють різною хроматографічною рухливістю та спектром поглинання 240-270 нм, що утруднює їх одночасне хроматографічне визначення та унеможливує їх аналіз прямим спектрофотометричним методом.

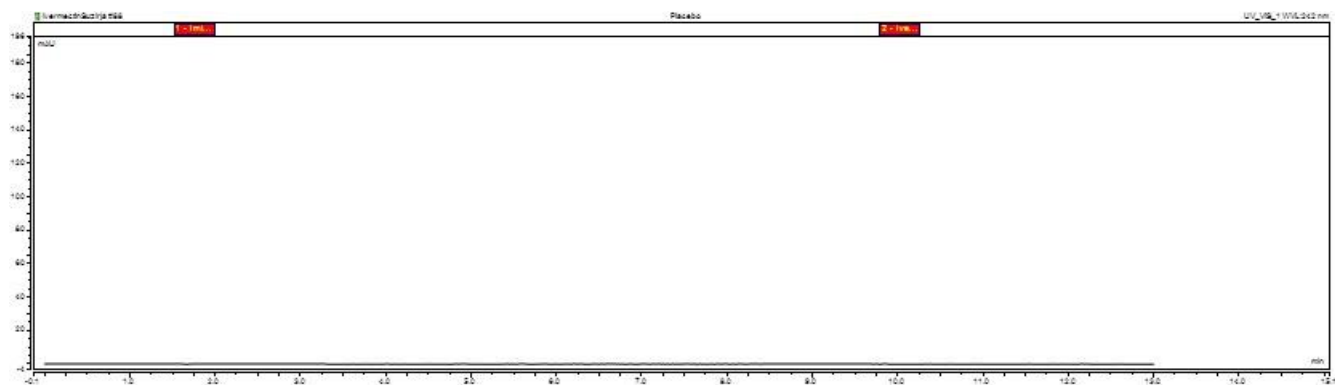
Тому метою роботи було розробити та валідувати методику одночасного кількісного визначення імідаклоприду та івермектину методом ВЕРХ з ультрафіолетовим детектуванням.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували стандартні зразки імідаклоприду та івермектину, виробництва Sigma-Aldrich. Вихідні розчини імідаклоприду та івермектину з концентрацією 1 та 0,1 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 імідаклоприду та 10 мкг/мл для івермектину). Досліджувані зразки крапель із вмістом імідаклоприду та івермектину розчиняли до приблизно такої ж концентрації, як і стандартні зразки.

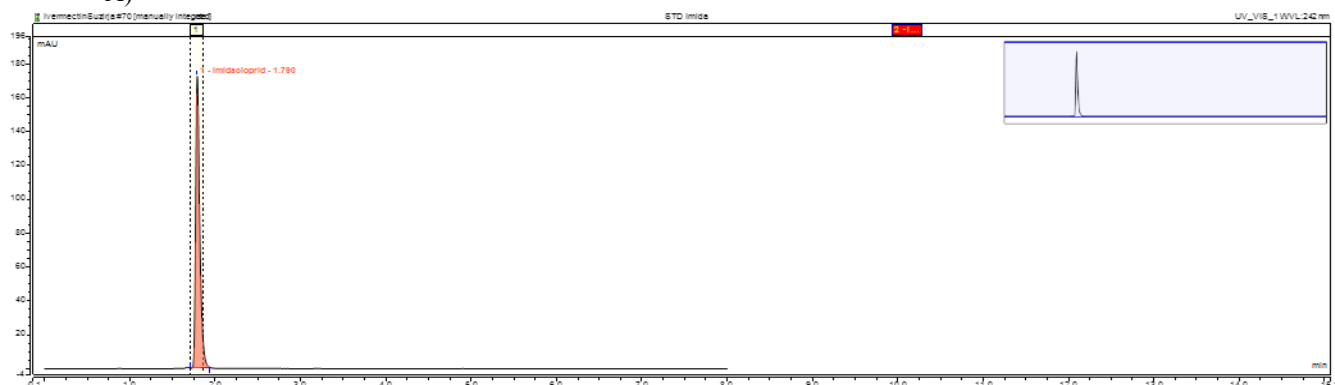
Аналіз виконано на рідинному хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному насосом LPG-3400SD, автосемплером АСС-3000 та діодноматричним детектором DAD-3000. Зразки розділяли на хроматографічній колонці Acclaim C 18 150 × 4,6 мм. Рухомою фазою була суміш ацетонітрилу та води у об'ємному співвідношенні 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.

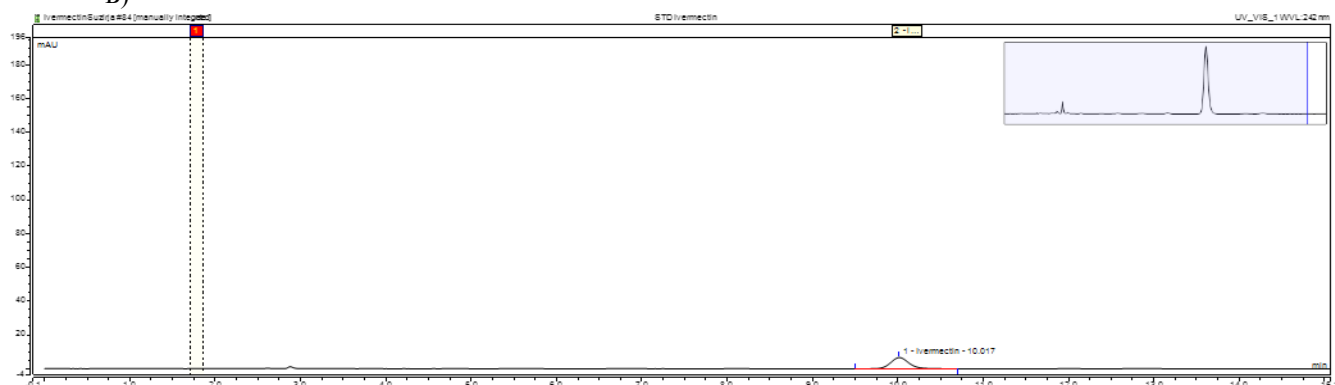
**Результати й обговорення.** Валідували методику одночасного кількісного визначення імідаклоприду та івермектину за параметром вибірковість, порівнюючи хроматограми робочого розчину стандартного зразку (РРСЗ), робочого розчину випробної проби (РРВП) і розчину плацебо (РРПл). Жоден пік на хроматограмі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



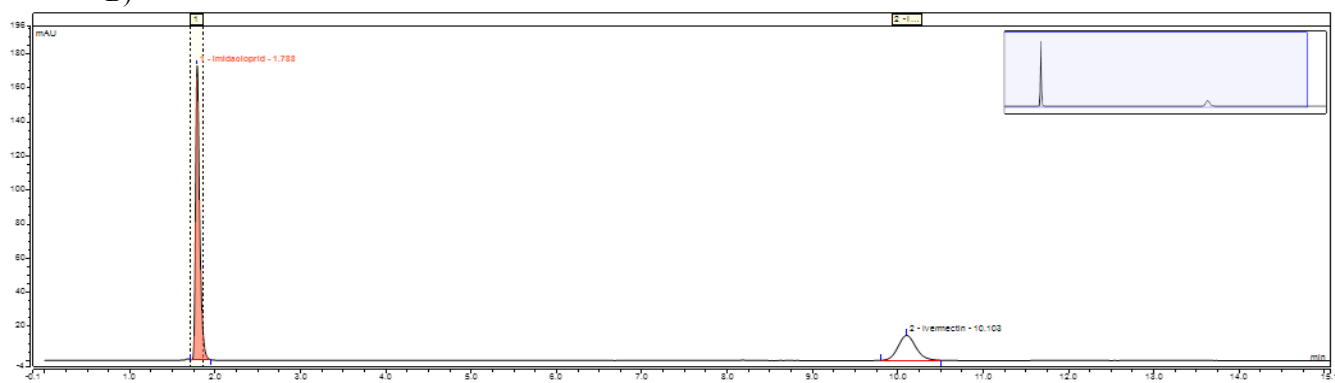
A)



Б)



В)



Г)

Рис. 1. Хроматограми плацебо (А), розчину стандартного зразку імідаклоприду (Б), івермектину (В) та крапель для зовнішнього застосування з вмістом імідаклоприду та івермектину (В).

Оскільки, обраний режим хроматографічного розділення забезпечував виконання вимоги ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakoreia Ukrainy 2.0, 2015) до параметру вибірковість,

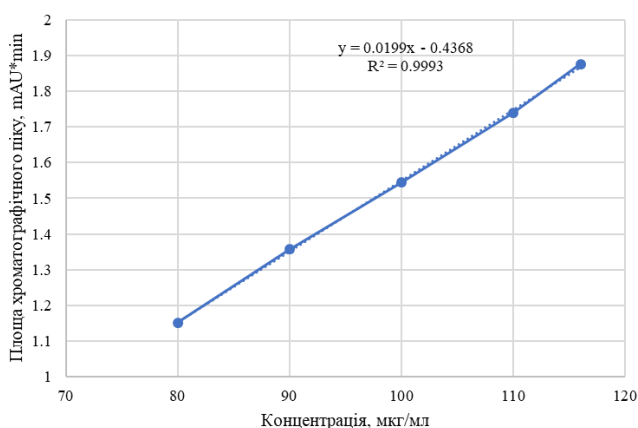
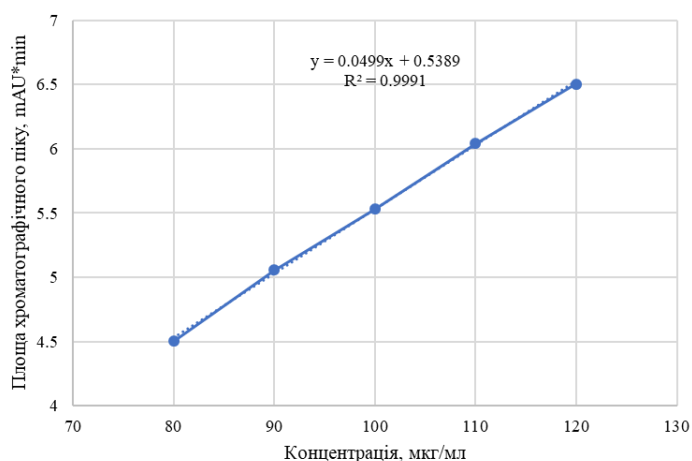
проводили дослідження параметрів хроматографічних піків імідаклоприду та івермектину (табл.).

Таблиця

**Параметри придатності хроматографічної системи**

Параметри	Характеристики хроматографічних піків		Вимоги до показника
	Імідаклоприд	Івермектин	
Час утримування, хв.	1,8	10,0	—
Ефективність хроматографічної системи ( $N$ )	8200	10600	> 2000
Коефіцієнт симетрії піку ( $A_s$ )	1,5	1,1	Від 0,8 до 1,5
Відносний стандартний відхил ( $RSD$ ) за площею піка, %	0,09	0,31	Не більше 1,43 %
Відносний стандартний відхил ( $RSD$ ) за часом утримання піка, %	0,01	0,09	< 1%
Ширина піку, хв.	0,3	0,9	—
Ступінь розділення $R_s$	35,9	35,9	> 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 – імідаклоприд, Б – івермектин).

Коефіцієнт  $R^2$  для площ піків імідаклоприду та івермектину був у межах, рекомендованих ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015).

## ВИСНОВКИ

Досліджувані характеристики методу ідентифікації та кількісного визначання вмісту імідаклоприду та івермектину 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), 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

Abbink, J. (1991). The biochemistry of imidacloprid. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 42 (2). 183–195.

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

Dourmishev, A. L., Dourmishev, L. A., Schwartz, R. A. (2005). Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. International Journal of Dermatology. 44 (12). 981–988. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2004.02253.x.

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

Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. (2017). Ivermectin – Old Drug, New Tricks? Trends in Parasitology. 33 (6).463–472. DOI:10.1016/j.pt.2017.02.004.

Mikolić, A. & Karačonji, I. (2018). Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 69 (2). 103–108. DOI:10.2478/aiht-2018-69-3144

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