

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.04

HPLC-PDA 法测定 3 种兽药中非法添加非泼罗尼

杨 星¹, 丁双阳², 赵富华¹, 马秋冉¹, 于晓辉^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

[收稿日期] 2017-11-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0019-06 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 建立了 3 种兽药中非法添加非泼罗尼的 HPLC-PDA 检查方法。采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以水-乙腈为流动相, 梯度洗脱; 二极管阵列检测器, 提取波长为 220 nm。通过液相色谱保留时间、峰纯度检查和光谱相似度检查对非法添加物进行确证。结果表明, 该色谱条件下非泼罗尼与其他物质分离良好。非泼罗尼在阿维菌素粉、甲基吡啶磷可湿性粉、环丙氨嗪预混剂中的平均回收率分别为 100.0% ($RSD=1.6\%$)、108.7% ($RSD=1.1\%$)、109.3% ($RSD=1.2\%$)。本方法简便、准确、可靠, 可用于检查以上 3 种兽药中非法添加的非泼罗尼。

[关键词] 阿维菌素粉; 甲基吡啶磷可湿性粉; 环丙氨嗪预混剂; 非泼罗尼; 峰纯度检查; 光谱相似度检查; 高效液相色谱法

Determination of Fipronil in Veterinary Drug by HPLC-PDA

YANG Xing¹, DING Shuang-yang², ZHAO Fu-hua¹, MA Qiu-ran¹, YU Xiao-hui^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Corresponding author: YU Xiao-hui, E-mail: yuxiaohui@ivdc.org.cn

Abstract: A method for the determination of fipronil in three kinds of veterinary drug was developed by the high performance liquid chromatography with photo-diode array detector (HPLC-PDA). It was tested with C18 column, using gradient elution with water and acetonitrile as the mobile phase. The extract wavelength was 220 nm. Retention time, peak purity test and spectrum similar test were used to identify fipronil. Results showed that fipronil and other materials were finely separated. The mean recoveries of fipronil in avermectin powder, azamethiphos wettable powder and cyromazine premix were 100.0% ($RSD=1.6\%$), 108.7% ($RSD=1.1\%$), 109.3% ($RSD=1.2\%$) respectively. In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of fipronil in the three kinds of veterinary drug.

Key words: avermectin powder; azamethiphos wettable powder; cyromazine premix; fipronil, peak purity test; spectrum similar test; HPLC

作者简介: 杨 星, 硕士, 从事化学药品检验工作。

通讯作者: 于晓辉。E-mail: yuxiaohui@ivdc.org.cn

非泼罗尼 (Fipronil) 又名氟虫腈, 商品名为锐劲特, 是一种苯基吡唑类的广谱杀虫剂, 由法国罗纳-普朗克公司研发^[1], 通过与昆虫神经中枢细胞膜上的 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体结合而阻塞神经细胞的氯离子通道, 从而干扰昆虫神经系统的正常功能而导致昆虫死亡^[2]。虽然非泼罗尼活性高, 对多种害虫有优良的防效, 但由于抗药性风险、残留风险和生态风险较大^[3], 作为农药已被许多国家禁用。我国 2009 年发布农业部第 1157 号公告: 除卫生用、玉米等部分旱田种子包衣剂外, 在我国境内停止销售和使用用于其他方面的含氟虫腈成分的农药制剂。因此, 非泼罗尼现在多用于防治宠物 (猫/狗) 身上的跳蚤/螨和虱子。2017 年 8 月波及欧洲多国的“毒鸡蛋”事件引发公众对食品安全的再次关注, 该批问题鸡蛋是由于氟虫腈被不恰当地用于养鸡场的清洁物品中, 造成鸡蛋被检出残留物。国内也有些不法厂家为使兽药达到迅速起效的目的, 在兽药产品中非法添加化学药物, 从而提高销量来获取更大利润。考虑到非泼罗尼存在被非法添加的可能, 从而给动物源性食品安全埋下隐患, 因此, 急需建立一种方法以筛查其他兽药中非法添加的非泼罗尼, 为农业农村部严查违法使用氟虫腈提供技术支撑。本试验参考非泼罗尼含量测定相关检测方法, 并结合兽药中非法添加检测工作特点^[4-8], 采用高效液相色谱法与二极管阵列检测器, 建立了阿维菌素粉、甲基吡啶磷可湿性粉、环丙氨嗪预混剂 3 种兽药中非法添加非泼罗尼的 HPLC-PDA 检测方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪-二极管阵列检测器 (Waters e2695 2998, Empower2 色谱工作站软件); 分析天平 (梅特勒 XS 205, 十万分之一); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水 (超纯水)。

1.2 试药 非泼罗尼对照品 (含量: 98.5%, 批号: GBW(E)061583 20170328, 上海市农药研究所有限公司); 空白制剂: 阿维菌素粉空白样品 (批号: 20161205, 规格: 1%)、甲基吡啶磷可湿性粉空白样

品 (批号: 20170714, 规格: 50%)、环丙氨嗪预混剂空白样品 (批号: C807955, 规格: 10%), 经检测均不含非泼罗尼; 供试品: 阿维菌素粉阳性样品 (自制, 含 2% 的非泼罗尼)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以水为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 按表 1 进行梯度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 采用二极管阵列检测器, 采集波长范围为 190 ~ 400 nm, 分辨率为 1.2 nm; 记录 220 nm 波长处的色谱图, 同时记录光谱图。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Procedure of gradient elution		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	30	70
12	30	70
13	5	95
20	5	95
21	30	70
25	30	70

2.2 溶液配制

2.2.1 制剂空白溶液 取空白制剂 1.0 g, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 5 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 取 5.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。

2.2.2 供试品溶液 取供试品 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 5 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 取 5.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。

2.2.3 非泼罗尼对照品储备液 取非泼罗尼对照品 50 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。

2.2.4 非泼罗尼对照品溶液 精密量取非泼罗尼对照品储备液 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。

2.2.5 检测限溶液(0.25、0.5、1.0 g/kg) 取空白制剂 1.0 g,置 50 mL 量瓶中,分别精密加入非泼罗尼对照品储备液 0.5、1、2 mL,加甲醇适量,超声处理 5 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀;精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。

2.2.6 回收率试验溶液 取空白制剂 1.0 g,置 50 mL 量瓶中,精密加入非泼罗尼对照品储备液 2 mL,加甲醇适量,超声处理 5 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀;精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。

2.2.7 建立光谱数据库的溶液 以非泼罗尼对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 通过制剂空白试验和本底添加试验排除各制剂中主要成分与辅料对被测物的干扰。分别精密量取 2.2.1 项下制剂空白溶液、2.2.4 项下非泼罗尼对照品溶液、2.2.6 项下回收率试验溶液各 10 μL,照 2.1 项下色谱条件,注入高效液相色谱仪,记录色谱图与光谱图。结果显示,非泼罗尼对照品的保留时间约为 8.5 min,阿维菌素粉、甲基吡

啶磷可湿性粉与环丙氨嗪预混剂的主成分的保留时间分别约为 19.6、3.9、3.0 min,其辅料也不在非泼罗尼出峰处出峰(图 1~图 4)。此外,回收率试验溶液中非泼罗尼峰的纯度角度均小于纯度阈值(表 2),为单一物质峰,表明该色谱条件下 3 种制剂本底均对非泼罗尼的测定无干扰。

2.3.2 检测限 通过制剂空白添加被测物对照品来考察方法的检测限。照 2.2.5 项下配制各制剂的检测限溶液(0.25、0.5、1.0 g/kg),精密量取 10 μL 进行测定。综合考虑色谱图峰型、峰面积,以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限。结果显示,3 种制剂检查非泼罗尼的检测限均为 0.5 g/kg。

2.3.3 准确度 通过制剂空白添加被测物对照品做回收率试验来考察方法的准确度。照 2.2.6 项下平行配制 6 份各制剂的回收率试验溶液,精密量取 10 μL 进行测定。结果显示,阿维菌素粉、甲基吡啶磷可湿性粉与环丙氨嗪预混剂中非泼罗尼的回收率分别为 100.0%(RSD=1.6%)、108.7%(RSD=1.1%)、109.3%(RSD=1.2%)。

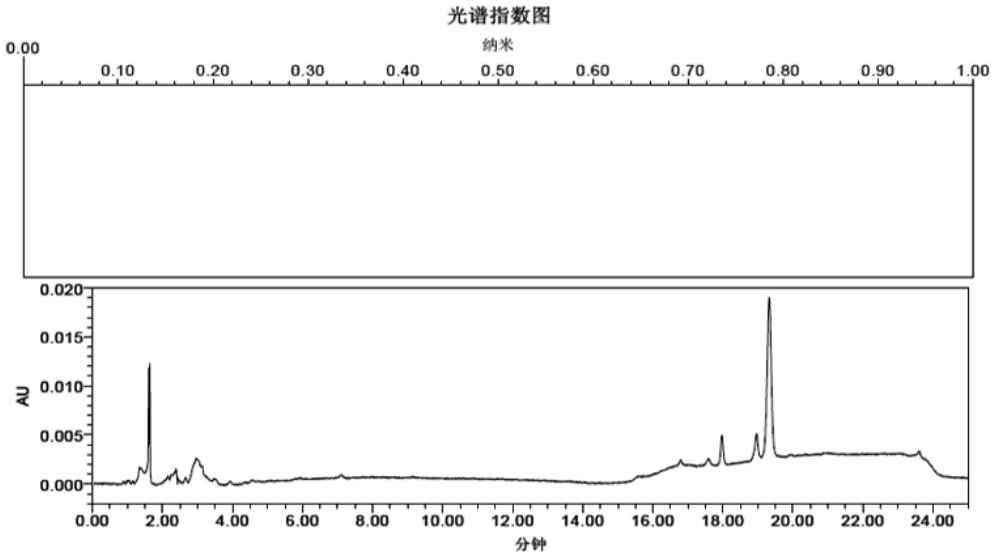


图 1 阿维菌素粉空白溶液光谱色谱图

Fig 1 The chromatogram and spectrum of avermectin powder

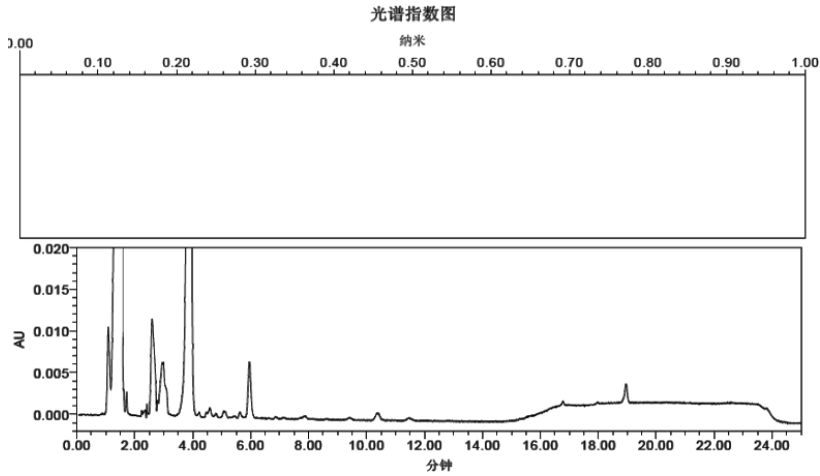


图 2 甲基吡啶磷可湿性粉空白溶液光谱色谱图

Fig 2 The chromatogram and spectrum of azamethiphos wettable powder

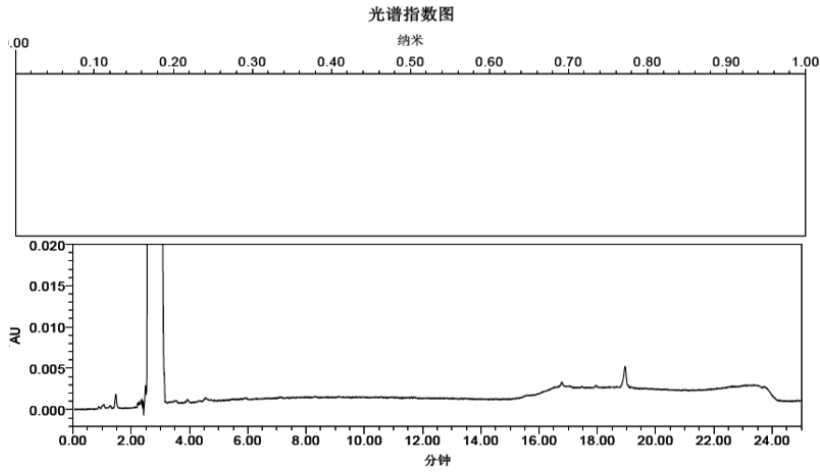


图 3 环丙氨嗪预混剂空白溶液光谱色谱图

Fig 3 The chromatogram and spectrum of cyromazine premix

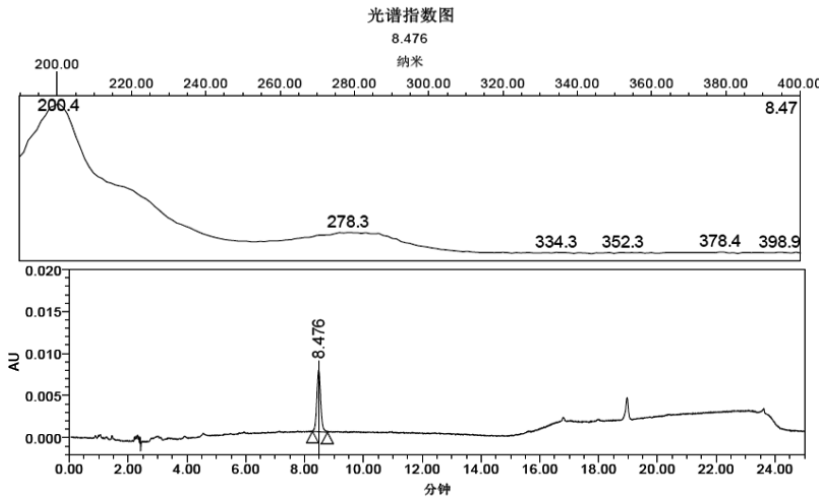


图 4 非泼罗尼对照品光谱色谱图

Fig 4 The chromatogram and spectrum of fipronil

表 2 峰纯度及光谱相似度检查结果表

Tab 2 The results of peak purity test and spectrum similar test

药物名称	保留时间/min	纯度角度	纯度阈值	纯度结果	匹配角度	匹配阈值	匹配结果
阿维菌素粉	8.478	1.732	2.978	单一物质峰	0.863	2.063	光谱相似
甲基吡啶磷可湿性粉	8.496	1.610	2.767	单一物质峰	0.749	1.917	光谱相似
环丙氨嗪预混剂	8.468	1.659	2.742	单一物质峰	0.688	1.897	光谱相似
非泼罗尼对照品	8.476	1.742	3.060	单一物质峰	0.721	2.039	光谱相似

2.3.4 耐用性 以各制剂的回收率试验溶液作为耐用性试验溶液,从柱温、流速、色谱柱三个方面考察非泼罗尼检查方法的耐用性。调节柱温分别为 25、30、35 ℃,结果显示:随柱温升高,非泼罗尼保留时间提前,分离度均符合要求;改变流速分别为 0.9、1.0、1.1 mL/min,结果显示:随流速增大,非泼罗尼保留时间明显提前,分离度均符合要求;选择三款不同品牌色谱柱, Waters Atlantis T3 C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、GRACE Alltima C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Agilent Extend C18 (250 mm×4.6 mm,5 μm),结果显示:三款色谱柱仅保留时间不同,非泼罗尼峰与其他峰分离度均符合要求,理论板数均高于 10000,拖尾因子均约为 1.1。

以上结果表明,本方法耐用性较好,能满足非泼罗尼的检查要求。

2.4 样品测定 取阿维菌素粉阳性样品,照 2.2.2 项下配制供试品溶液,非泼罗尼对照品溶液的浓度调整为峰面积与供试品溶液相当。分别精密量取 10 μL,照 2.1 项下色谱条件,注入高效液相色谱仪,记录色谱图与光谱图。结果显示,供试品溶液在与非泼罗尼对照品保留时间一致处出峰;该色谱峰纯度角度小于纯度阈值,为单一物质峰;将其光谱与非泼罗尼对照品的光谱匹配,匹配角度小于匹配阈值,说明与非泼罗尼对照品的光谱相似,且两者最大吸收波长一致。以上结果表明样品中检出非泼罗尼(表 3)。

表 3 阿维菌素粉阳性样品检查结果表

Tab 3 The results of avermectin powder sample test

/	保留时间/min	最大吸收波长/nm	纯度角度	纯度阈值	匹配角度	匹配阈值
阿维菌素粉	8.494	200.4,278.3	0.130	1.146	0.061	1.073
非泼罗尼对照品	8.500	200.4,278.3	0.109	1.102	0.000	1.056

3 讨 论

3.1 溶媒的选择 非法添加检查通常只需考虑被测物尽可能被提取并检测到,而不需要考虑制剂自身主成分的溶解性,因此,根据非泼罗尼在甲醇或丙酮中易溶、在水中几乎不溶的性质,选择甲醇作为溶媒。

3.2 流动相系统的选择 参考中华人民共和国农业部第 1938 号、第 2026 号与第 2138 号公告中非泼罗尼含量测定的流动相系统,发现多采用甲醇-乙腈-水体系,但是比例不同。当乙腈比例小甚至不使用

乙腈时,其质量标准或将流速提高到 1.2 mL/min,或使用 150 mm 的短色谱柱来加快非泼罗尼的出峰,同时试验过程也发现,对于非泼罗尼来说乙腈的洗脱能力明显强于甲醇。考虑到操作的简便性及检测的快速,有机相仅选取一种,采用乙腈-水作为流动相。此外,为了扩大方法的适用范围,综合考虑非泼罗尼的出峰时间不能太晚且与其他物质能完全分离,以及使制剂中自身的主成分与辅料也能洗脱出来,采用了梯度洗脱的方式。

3.3 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器,

在 190~400 nm 波长范围内进行紫外吸收图谱扫描。非泼罗尼在 200 nm 和 278 nm 波长处有最大吸收,前者低于甲醇的截止使用波长,后者的吸收度较低,参考中华人民共和国农业部第 1938 号、第 2026 号与第 2138 号公告中非泼罗尼含量测定均采用 220 nm 进行测定,该波长正好位于光谱图的肩缝处,且响应也较高,故选择 220 nm 作为检测波长。

3.4 保留时间、峰纯度检查与光谱相似度检查

保留时间是否一致是判断两个色谱峰是否为同一化合物的初步依据,而峰纯度检查可以判断色谱峰是否为单一物质峰,光谱相似度检查可以排除保留时间一致,但紫外光谱不同的化合物的干扰。在对 3 种制剂的回收率试验溶液和检测限溶液的各项检测中,在与非泼罗尼对照品溶液主峰保留时间一致处出峰,且纯度角度均小于纯度阈值,匹配角度均小于匹配阈值。表明在该液相条件下,可在 3 种制剂中检出非泼罗尼,方法可行。

4 结 论

本方法建立了 HPLC-PDA 法检测 3 种杀虫药中非法添加非泼罗尼的检查方法,综合保留时间、最大吸收波长、峰纯度检查和光谱相似度检查四方面的信息,实现了兽药中非法添加物的准确识别。该方法操作简便、快速、灵敏度高,为打击兽药制剂非法添加非泼罗尼制假行为提供了有力的技术支持。

参考文献:

- [1] 许小龙,韩丽娟,顾中言.氟虫腈对蔬菜几种主要害虫的毒力及应用研究[J]. 农药, 1998, (12): 26-27.
Xu X L, Han L J, Gu Z Y. The toxicity and application of fipronil to several major vegetable pests [J]. Agrochemicals, 1998, (12): 26-27.
- [2] 杨素钦,高希武,张子明.锐劲特及其飞机防治蝗虫技术[J]. 农药科学与管理, 2001, (6): 19-20.
Yang S Q, Gao X W, Zhang Z M. The air-spraying technology of Regent for the control of locusts [J]. Pesticide Science and Administration, 2001, (6): 19-20.
- [3] 徐广春,顾中言,杨玉清,等.氟虫腈的应用和风险研究进展[J]. 现代农药, 2008, (2): 1-11.
Xu G C, Gu Z Y, Yang Y Q, *et al.* Progress in research on risks of pesticide in fipronil and its application [J]. Modern Agrochemicals, 2008, (2): 1-11.
- [4] 戴青,于丽娜,张璐,等.硫酸安普霉素可溶性粉中非法添加乙酰甲嗪的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 19-23.
Dai Q, Yu L N, Zhang L, *et al.* Determination of mequindox in apramycin sulfate soluble powder by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(2): 19-23.
- [5] 韩春晓,张越,李洪伟,等.4 种兽用注射液中非法添加倍他米松 UPLC-PDA 检查方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(1): 46-51.
Han C X, Zhang Y, Li W H, *et al.* Establishment of detection methods for betamethasone in the 4 kinds of veterinary injections by UPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(1): 46-51.
- [6] 王静文,龚旭昊,范强,等.三种呼吸系统兽药制剂中非法添加盐酸溴己新、呋喃美辛的 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 45-50.
Wang J W, Gong X H, Fan Q, *et al.* Determination of bromhexine hydrochloride and indometacin illegally added in three veterinary preparations by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12): 45-50.
- [7] 龚旭昊,王静文,董玲玲,等.鱼腥草注射液中非法添加水杨酸和氧氟沙星 HPLC-PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(2): 37-40.
Gong X H, Wang J W, Dong L L, *et al.* Determination of salicylic and ofloxacin in houttuynia injection by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(2): 37-40.
- [8] 周红霞,李慧素,吴宁鹏,等.HPLC-PDA 法测定 17 种兽药中非法添加多西环素[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(10): 36-41.
Zhou H X, Li H S, Wu N P, *et al.* Determination of doxycycline in veterinary drug by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(10): 36-41.

(编辑:侯向辉)