

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.08

HPLC 法测定兽用除虫脒原料药含量及有关杂质

左三龄,张博,邱银生,叶纯,吴仲元*

(武汉轻工大学动物科学与营养工程学院,武汉 430023)

[收稿日期] 2019-10-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)02-0046-07 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了高效液相色谱法(HPLC)测定兽用除虫脒原料药含量及有关杂质的检测方法。采用 C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇为流动相 A,0.01 mol/L 乙酸铵溶液为流动相 B,进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,进样量 10 μL,柱温 25 ℃。除虫脒的线性范围为 10~1000 μg/mL($R^2=0.999$),回收率 97.01%~100.83%($RSD<1.0%$, $n=3$),精密度($RSD=0.13%$, $n=9$)、重复性($RSD=0.45%$, $n=6$)良好,主成分与各杂质峰分离良好。以主成分自身对照法计算,各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 0.1 倍(0.1%)。该方法简便灵敏,结果准确可靠,可作兽用除虫脒原料药含量及有关杂质测定。

[关键词] 兽用;除虫脒;有关杂质;高效液相色谱法

Determination of the Content and Related Substances in the Veterinary Diflubenzuron Raw Material by HPLC

ZUO San-ling, ZHANG Bo, QIU Yin-sheng, YE Chun, WU Zhong-yuan*

(College of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Corresponding author: WU Zhong-yuan, E-mail: zhongyu@163.com

Abstract: A method based on HPLC was developed for determination of the content and related substances of veterinary diflubenzuron. Using C18 column(250 mm x 4.6 mm, 5 μm) and methanol as mobile phase A, 0.01 mol/L ammonium acetate solution as mobile phase B, with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The UV detection at 254 nm. The injection volume was 10 μL. The column temperature was 25 ℃. The results showed that linear range of the method was 10~1000 μg/mL ($R^2=0.999$), the recovery rate of the preparation was between 97.01% and 100.83% ($RSD<1.0%$, $n=3$), with good precision ($RSD=0.13%$, $n=9$) and repeatability ($RSD=0.45%$, $n=6$). The main component and impurities could achieve a good separation. Calculated by the main component self-control method, the sum area of each impurity peak was not more than 0.1 times (0.1%) of the peak area of diflubenzuron in the control solution. This method was simple, sensitive, accurate and can be used for the determination of content and related impurities of veterinary diflubenzuron raw materials.

Key words: veterinary; diflubenzuron; related impurities; HPLC

作者简介:左三龄,硕士,从事饲料及动物性食品安全评价研究;张博,与左三龄为共同第一作者。

通讯作者:吴仲元。E-mail:zhongyu@163.com

目前国内外猪场普遍存在苍蝇污染问题,养殖场蝇蛆的控制是困扰养殖生产的一大难题。控制策略主要是使用敌敌畏和除虫菊喷雾剂,但毒副作用较大^[1]。除虫脲(diflubenzuron),化学名 1-(4-氯苯基)-3-(2,6-二氟苯甲酰基)脲(图 1)。属苯甲酰脲类杀虫剂,作用性质为昆虫生长调节剂,能够阻碍昆虫表皮中几丁质的合成,使昆虫变态受阻不能蜕皮而死亡^[2-3]。兽用除虫脲作用方式主要为胃毒和触杀,无内吸收特性^[4]。除虫脲的合成路线有多种^[5-7],主要合成工艺为 2,6-二氟苯甲酰脲与对氯苯基异氰酸酯在二甲苯溶液中缩合生成除虫脲。该农药于 1976 年,经美国环保局批准投入批量生产^[8],2016 年 1 月美国 Central Life Sciences 公司已开发出 0.04% 和 0.67% 的兽用除虫脲预混剂 Mix Clarify[®]作为猪、牛和马的杀蝇蛆剂使用,但目前国内无相关兽药制剂,且国内外对其原料药含量测定和有关物质检查少有相关报道。为完善兽用除虫脲的质量控制,本研究拟通过使用高效液相色谱(HPLC)建立兽用除虫脲含量测定及其有关物质检查的方法,以期为国内外进一步的兽用制剂质量标准的控制研究提供参考。

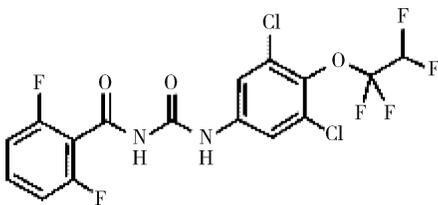


图 1 除虫脲结构式

Fig 1 Chemical structure of diflubenzuron

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(ACQUITY Arc HPLC)配备二极管阵列(PDA)检测器,购自美国 Waters 公司;精密分析天平(BS 110S),购自北京赛多利斯仪器系统有限公司;超纯水仪购自德国 Merck-Millipore 公司;涡旋混合仪(FW80 微型)购自上海沪西分析仪器厂有限公司;pH 计(STARTER 2100)购自奥豪斯仪器上海有限公司;超声仪(KQ5200)购自昆山市超声仪器有限公司;药物稳定性检测仪(WD-

A)购自天津天光光学仪器有限公司。

除虫脲对照品(批号 G139525,含量 $\geq 99.2\%$)购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;3 批兽用除虫脲原料药(自制,批号 2018090201、2018090202、2018090203);除虫脲可能的杂质(表 1):A、B、C、D(含量均大于 98.0%)购自 MACKLIN 公司;甲醇、乙腈(色谱纯)购自 Fisher Chemical 公司;乙酸铵、磷酸、盐酸、氢氧化钠(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司。

表 1 除虫脲可能的杂质

Tab 1 Suspended impurity of diflubenzuron

杂质名称	结构	化学名	来源
A		对氯苯胺	破坏产物
B		2,6-二氟苯酰胺	原料引入
C		对氯苯基异氰酸酯	原料引入
D		1,3-双(4-氯苯基)尿素	反应生成

2 方法与结果

2.1 含量测定方法与结果

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C18(250×4.6 mm,5 μm),检测波长为 254 nm,流速为 1 mL/min,柱温为 25 °C,进样量为 10 μL,以甲醇为流动相 A,0.01 mol/L 乙酸铵溶液为流动相 B,进行梯度洗脱,洗脱顺序为 0 min,40% A;0~5 min,40% A;5~20 min,40%~80% A;20~30 min,80% A;30~35 min,80%~40% A;35~40 min,40% A。

2.1.2 溶液配制 除虫脲储备液的制备:分别精密称量除虫脲对照品和原料药 100 mg,加甲醇溶解,制成浓度为 1000 μg/mL 的除虫脲对照品和原料药储备溶液,4 °C 冷藏备用。

2.1.3 系统适用性试验 将 2.1.2 项除虫脒对照品和原料药的储备液,分别用甲醇稀释为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分别进样,记录色谱图,结果见图 2。计算得到的主峰理论塔板数均大于 25000,各组分的分离度均大于 1.5,符合规定。

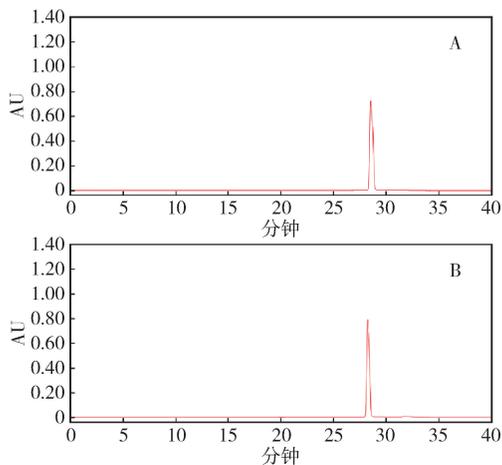


图 2 除虫脒对照品(A)和原料药(B)的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of diflubenzuron reference substances and raw material

2.1.4 线性关系考察 将 2.1.2 项除虫脒对照品溶液,用甲醇分别稀释为 10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以质量浓度(C , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标作线性回归,得线性回归方程为 $y = 28\ 812\ C - 1\ 957.7$, $R^2 = 0.999$ 。表明除虫脒质量浓度在 10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.1.5 重复性、精密度和稳定性试验 根据《中华人民共和国兽药典(2015 版)》一部的药品质量标准分析方法指导原则,精密称取 6 份 10 mg 的除虫脒对照品,用甲醇溶解定容至 100 mL,连续进样 6 次, $RSD = 0.45\%$,表明本方法重复性良好;将质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的除虫脒对照品溶液重复进样 9 次,计算可得其 $RSD = 0.13\%$,表明本方法精密度良好;又分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样记录峰面积,用外标法计算不同时间点相对于 0 h 时的除虫脒的降解率为 0.51%, $RSD = 0.20\%$,表明在常温条件下,24 h 内除虫脒原料药溶液稳定性良好。

2.1.6 回收率试验 加入除虫脒标准品,用甲醇分别配制 80%、100%、120% 的供试溶液,每个 3

份,用外标法计算平均回收率及 RSD 。回收率为 97.01% ~ 100.83%, $RSD < 1.0\%$ ($n = 3$),符合回收率要求。

2.1.7 含量测定 取三批除虫脒原料药配制供试品溶液和对照品溶液进样测定,并记录峰面积,用外标法计算除虫脒的含量。三批除虫脒原料药的含量分别为 99.73% (2018090201)、99.61% (2018090202)、99.67% (2018090203)。

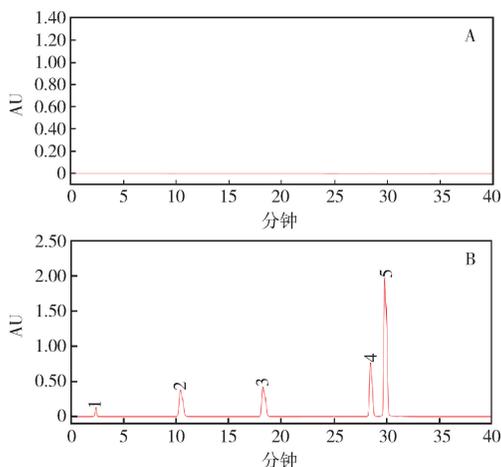
2.2 有关物质测定方法与结果

2.2.1 色谱条件 同 2.1.1 项色谱条件。

2.2.2 溶液配制 据文献^[9]及除虫脒合成原料及工艺中发现可能的杂质有 A、B、C、D。其中 C(对氯苯基异氰酸酯)需进行衍生化处理成在流动相中稳定的物质,再进样检测。根据文献^[10-12]衍生化方法, C 与甲醇进行酯化反应。

供试品溶液:称取除虫脒及其有关物质 A、B、C、D 各 0.05 g,将 C 衍生化处理与 A、B、D 混合于 100 mL 量瓶中,加甲醇定容,制成质量浓度均为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 系统适用性试验 将 2.2.2 项混合对照品溶液,按 2.1.1 项色谱条件测定,色谱图见图 3。计算得到的理论塔板数均大于 25000,各组分的分离度良好,均大于 1.5,符合规定。



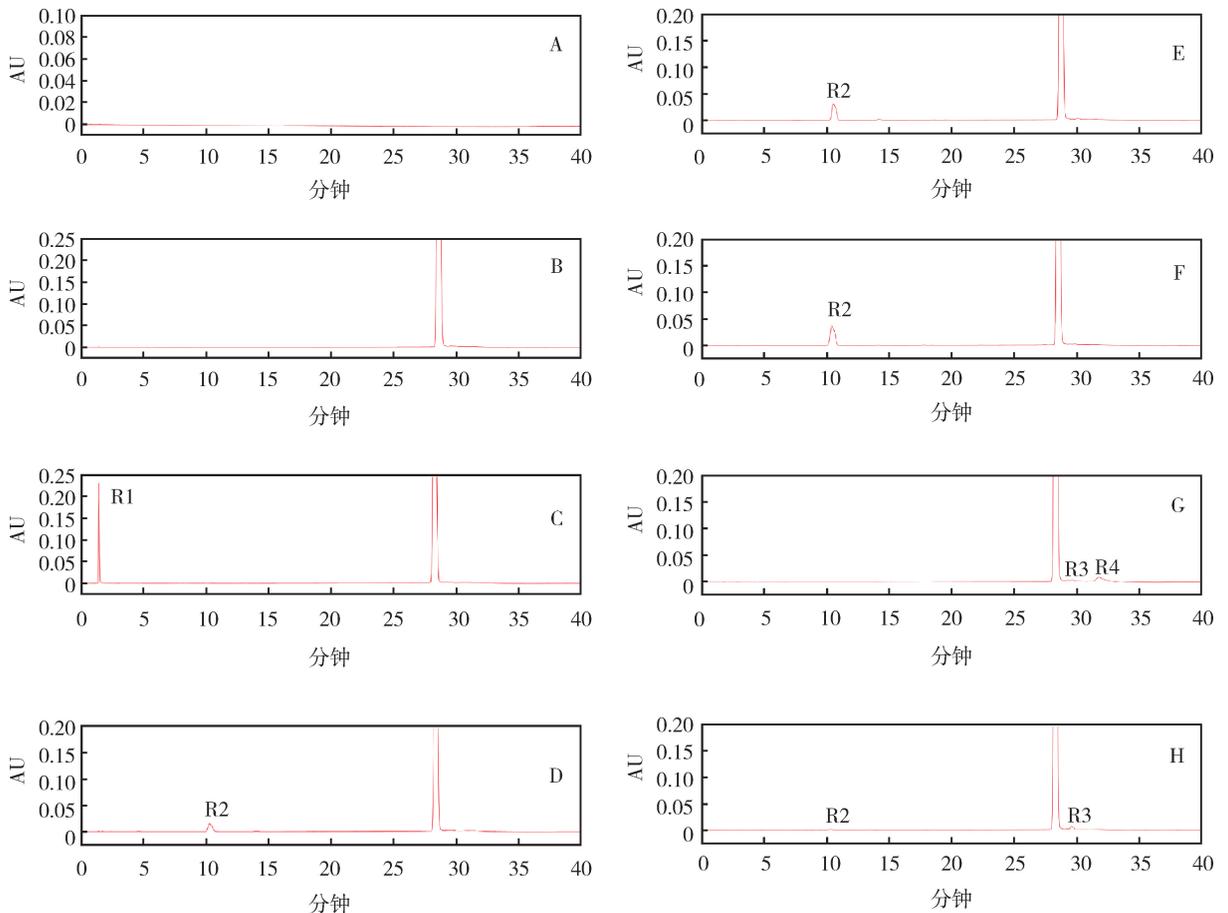
1:2,6-二氯苯酰胺;2:对氯苯胺;3:对氯苯基异氰酸酯;4:除虫脒;5:1,3-双(4-氯苯基)尿素

图 3 空白(A)和除虫脒及有关物质(B)色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of blank solution (A), diflubenzuron and related substances (B)

2.2.4 专属性与破坏性试验 分别精密称取 5 份除虫脲原料药 0.05 g 于 100 mL 量瓶中,处理如下:①氧化破坏:加入 30% 过氧化氢 1 mL,超声 20 min;②酸破坏:加入 1 mol/L 盐酸溶液(溶剂甲醇) 70 mL,90 °C 水浴加热 100 min;③碱破坏:加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 70 mL,90 °C 水浴加热 100 min;④高温破坏:于 105 °C 放置 10 h;⑤光照破坏:室温下,5 000 ± 500 Lux 强光照放置 14 h,自然光照放置 10 d。将未经降解试验的原料药和降解破坏样品加甲醇,完全溶解后,酸碱破坏样品分别中和后甲醇定容,进样测定。专属性和破坏试验的结果

见图 4 和表 2。可见未经破坏除虫脲原料药的相对保留时间(Rt)为 28.437 min,氧化破坏则主要产生了降解物 R1(Rt 为 1.404 min),酸碱、高温和自然光破坏条件下产生了降解物 R2(Rt 为 10.411 min),强光和自然光条件下产生了降解物 R3(Rt 为 29.624 min),强光下主要产生了降解物 R4(Rt 为 31.802 min)。根据 PDA 扫描光谱图,可知除虫脲主峰和主要降解物 R1、R2、R3、R4 均为单一纯度峰。各降解产物与主峰的分离度 R 均大于 1.5,符合要求,说明该方法良好。



A. 空白溶剂;B. 未经破坏原料药;C. 氧化破坏;D. 强酸破坏;E. 强碱破坏 F. 高温破坏;G. 强光破坏;H. 自然光破坏

A. Blank solvent;B. Untreated raw material drug;C. Destroyed by oxidation;D. Destroyed by acid;E. Destroyed by alkali;

F. Destroyed by heat;G. Destroyed by strong light;H. Destroyed by natural light

图 4 破坏试验色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of destruction test

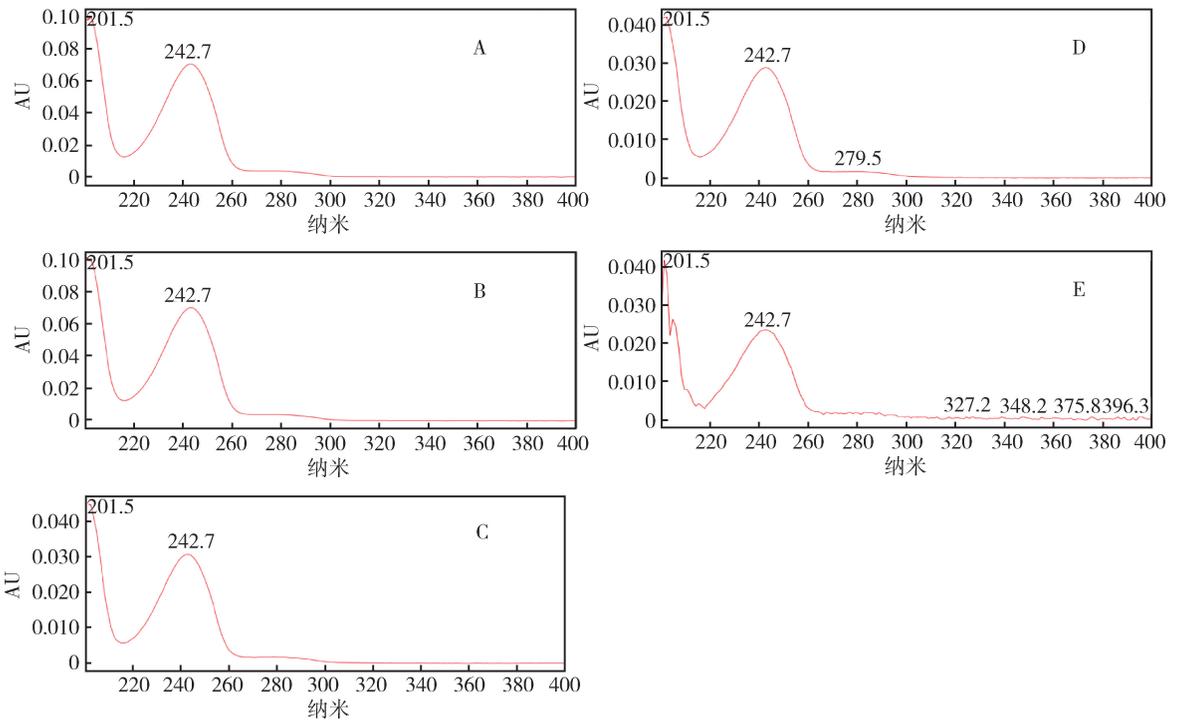
表 2 破坏试验的有关物质

Tab2 The related substances of destruction test

试验名称	主成分面积归一化法/%	主要杂质相对保留时间/min	所有峰面积之和/%
原料药	100	-	100
氧化破坏	92.30	1.404(R1)	100
强酸破坏	96.62	10.411(R2)	100
强碱破坏	93.67	10.411(R2)	100
高温破坏	92.88	10.411(R2)	100
强光破坏	97.57	29.624(R3);31.802(R4)	100
自然光破坏	98.99	10.411(R2);29.624(R3)	100

其中对氯苯胺与强碱、强酸、高温和自然光破坏产生的降解物 R2 的 PDA 扫描光谱图见图 5,对比后发现,R2 与对氯苯胺的出峰时间和最佳波长

几乎一致,有理由怀疑 R2 为对氯苯胺。PDA 扫描图谱的对比分析为除虫脲有关物质的定性检测提供了参考依据。



A. 对氯苯胺;B. 强碱破坏;C. 强酸破坏;D. 高温破坏;E. 自然光破坏

A. 4 - Chlorophenylamine;B. Destroyed by alkali;C. Destroyed by acid;D. Destroyed by heat;E. Destroyed by natural light

图 5 对氯苯胺与降解物 R2 的 PDA 扫描光谱图

Fig 5 PDA spectrogram of 4 - Chlorophenylamine and degradant R2

2.2.5 杂质检测限与定量限 将 2.2.2 项混合对照溶液,用甲醇逐步稀释后进样测定,以信噪比 S/N = 3、S/N = 10 测定,杂质 A、B、C、D 检测限分别为 0.5244、1.5261、0.4691、0.0997 μg/mL (S/N =

3),定量限分别为 1.7479、5.0869、1.5638、0.3324 μg/mL (S/N = 10)。

2.2.6 样品溶液精密度、稳定性试验 将 2.2.2 项混合对照品溶液进样,连续进样 9 次,计算得 A

~D 杂质峰面积的 *RSD* 分别为 0.29%、0.42%、0.73%、0.45%；每天进样,连续进样 6 d,计算得 A~D 杂质峰面积的 *RSD* 分别为 0.83%、1.78%、2.31%、1.88%。并分别于 0、2、4、8、12 h 进样,计算得不同时间点时 A~D 杂质峰面积的 *RSD* 分别为 0.60%、1.07%、1.89%、1.26%。表明在常温条件下,本方法日内、日间精密度良好,12 h 内除虫脲原料药溶液稳定性良好。

2.2.7 有关物质检查 取三批除虫脲原料药,按照 2.2.2 项的方法配制供试品溶液浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进样测定并记录峰面积。测定结果如表 3 所示,用外标法计算除虫脲主成分含量均大于 99%,以主成分自身对照法计算有关杂质的量,原料药杂质峰面积的总和均低于 0.1% 的鉴定限。

表 3 除虫脲主成分含量和有关杂质

Tab 3 Components and related substances of raw material drug of diflubenzuron

批号	主成分含量/%	单个最大杂质/%	总杂质/%
2018090201	99.73	0.05	0.06
2018090202	99.61	0.06	0.08
2018090203	99.67	0.05	0.07

3 讨论与结论

3.1 衍生化方法的选择 根据文献^[10-12]发现对氯苯基异氰酸酯在含有水相的溶液中不稳定,易水解,进样后在流动相中会发生水解影响检测,需要在进样前进行衍生化处理成在流动相中相对稳定的物质后,再进样检测。衍生化方法分别考察了两种常见的方法:一为对氯苯基异氰酸酯用四氢呋喃溶解后用过量二正丁胺进行衍生;二为用甲醇与对氯苯基异氰酸酯进行酯化反应的衍生方法。其中衍生化方法二的处理过程简单,易反应完全,且无溶剂峰和杂峰,不影响除虫脲及相关杂质的分析。因此,选择了甲醇与对氯苯基异氰酸酯进行酯化反应的衍生方法。

3.2 色谱条件的选择 本试验根据文献^[13-15],流动相分别考察了乙腈-水-二恶烷、甲醇-水、甲

醇-乙酸铵水这 3 种流动相体系。结果显示在乙腈-水-二恶烷的流动相条件下,对氯苯基异氰酸酯的峰型不佳,有拖尾且各峰分离不佳;在甲醇-水的流动相条件下,2,6-二氟苯甲酰胺的峰型不佳,有拖尾且各峰分离一般;甲醇-乙酸铵水的流动相条件下,除虫脲与 2,6-二氟苯甲酰胺、对氯苯基异氰酸酯、对氯苯胺及 1,3-双(4-氯苯基)尿素的峰型良好且各峰分离良好。因此,选择甲醇-乙酸铵水作为流动相体系。试验发现将流动相等度洗脱调整为梯度洗脱后,既能短时高效的检测出兽用除虫脲原料药是否引入其合成工艺上的杂质,同时能测定出主成分含量和有关物质,且各峰分离度良好。试验发现检测波长调整为 254 nm 时,各峰响应值均较高。

3.3 PDA 检测色谱图分析 通过破坏性试验发现了除虫脲的多种有关物质,将降解产物 R2 和对氯苯胺的 PDA 检测色谱图进行对比分析,两张图谱最佳波长几乎一致,光谱学上说明强酸、强碱、高温和自然光破坏条件下的降解物 R2 为对氯苯胺,若完全确定,可做进一步的结构确证研究,其生成途径也有待进一步的解析。

药物有关物质的检查与鉴定在其质量标准的制定实施中十分的重要,但目前除虫脲未被药典收录且无有关物质的控制标准。本研究对除虫脲含量和有关物质液相方法建立的同时,对其有关物质进行了初步的研究。本研究发现 3 批次的除虫脲原料药中总杂质最大限度为 0.1%,均低于《兽用化学药物杂质研究技术指导原则》中兽医专用原料药的杂质报告限度 0.1%,鉴定限度 0.2%,质控限度 0.5% 的标准。因此,依据现行传统工艺水平可暂定为如有杂质峰,各杂质峰面积的面积和不得大于对照溶液主峰面积的 0.1 倍(0.1%)。本研究建立测定除虫脲原料药主成分含量及有关杂质的高效液相色谱法,使除虫脲及有关杂质在同一色谱条件下检测并取得良好的分离效果,PDA 检测图谱为除虫脲有关物质的定性分析提供了参考依据。该方法含量测定准确灵敏,杂质分离度好,结果准确可靠,可作兽用除虫脲原料药主成分含量及有关物

质的检测与分析,为兽用除虫脒原料药的质量控制和质量标准制定提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Milutin D, Milorad M, Novica S, *et al.* Statistical evaluation of the larvicidal effect of diflubenzuron on culex pipiens larval stages [J]. *Acta Veterinaria*, 2015, 65(4): 112-116.
- [2] 周学良. 精细化学品大全. 农药卷[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 2000: 15-16.
Zhou X L. Fine Chemicals Encyclopedia. Pesticide Roll [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2000: 15-16.
- [3] Kim K, Kim Y, Kim Y. A Biochemical Evidence of the Inhibitory Effect of Diflubenzuron on the Metamorphosis of the Silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2002, 5(2): 175-180.
- [4] Metcalf R L, Lu P Y, Bowlus S. Degradation and environmental fate of 1-(2,6-difluorobenzyl)-3-(4-chlorophenyl)urea [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1975, 23(23): 359-364.
- [5] 王小永,刁锡华. 除虫脒的特性与合成[J]. 河北科技大学学报, 1996, (3): 62-66.
Wang X Y, Diao X H. Characteristic and Synthesis of Diflubenzuron[J]. *Journal of Hebei Institute of Chemical Technology and Light Industry*, 1996, (3): 62-66.
- [6] 万国林,景峭壁. 除虫脒合成的经济性研究[J]. 广东化工, 2012, 39(6): 27-27.
Wang G L, Jing X B. Research on economy of diflubenzuron synthesis[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2012, 39(6): 27-27.
- [7] 于登博,张平南. 除虫脒合成研究[J]. 农药, 2000, 39(3): 16-16.
Yu D B, Zhang P N. Study on the synthesis of diflubenzuron[J]. *Pesticides*, 2000, 39(3): 16-16.
- [8] 米娜,王唤,范志金,等. 苯甲酰脒类杀虫剂研究进展[J]. 世界农药, 2009, 31(2): 24-26.
Mi N, Wang H, Fan Z J, *et al.* Study progress of BPU's insecticides[J]. *World Pesticides*, 2009, 31(2): 24-26.
- [9] 姚洁,戴云生,王公应. 苯异氰酸酯的高效液相色谱分析 [C]. 全国生物医药色谱学术交流会, 2007: 299-300.
Yao J, Dai Y S, Wang G Y. High Performance Liquid Chromatography Analysis of Phenyl Isocyanate[C]. National Biomedical Chromatography Academic Exchange Conference, 2007: 299-300.
- [10] 赵国敏,郑德强,江玉娟. 柱前衍生化 HPLC 法测定 4-氯-3-(三氟甲基)苯异氰酸酯中 CTF-苯胺和 CTF-脒[J]. 药物分析杂志, 2016, (12): 162-166.
Zhao G M, Zheng D Q, Jiang Y J. Determination of CTF-aminobenzene and CTF-urea in 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate by HPLC after pre-column derivatization[J]. *Journal of Pharmaceutics Analysis*, 2016, (12): 162-166.
- [11] 杨静,李珮斯,聂炎炎,等. 超高效液相色谱串联质谱法-柱前衍生同时测定食品接触产品中的 5 种异氰酸酯[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(3): 635-640.
Yang J, Li P S, Nie Y Y, *et al.* Simultaneous determination of 5 kinds of isocyanates in food contact materials by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pre-column derivatization[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(3): 635-640.
- [12] 胡小键,宋喜丽,付慧,等. LC-MS/MS 法直接测定水中甲苯二异氰酸酯[J]. 环境卫生学杂志, 2016, (3): 234-236.
Hu X J, Song X L, Fu H, *et al.* Toluene Diisocyanate Determination in Water by LC-MS/MS [J]. *Journal of Environmental Hygiene*, 2016, (3): 234-236.
- [13] 郑志祥,王大兵,黄得庆. 2,6-二氟苯甲酰基异氰酸酯的高效液相色谱分析方法研究[J]. 化工设计通讯, 2016, (8): 75-78.
Zheng Z X, Wang D B, Huang D Q. Determination of 2,6-difluorobenzoyl isocyanate by high performance liquid chromatography[J]. *Chemical Engineering Design Communications*, 2016, (8): 75-78.
- [14] 胡敏,张强,吴兵兵,等. 高效液相色谱法定量分析除虫脒[J]. 现代农药, 2007, 6(2): 29-30.
Hu M, Zhang Q, Wu B B, *et al.* Analytical Method of Diflubenzuron by HPLC [J]. *Modern Agrochemicals*, 2007, 6(2): 29-30.
- [15] 农业部农药检定所. FAO/WHO 农药产品标准手册[M]. 北京:化学工业出版社, 2015: 456-458.
The Ministry of Agriculture Pesticide Testing Institute. FAO/WHO Pesticide Product Standards Manual[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015: 456-458.

(编辑:侯向辉)