

◆ 加工与分析 ◆

## 硝磺草酮原药中硝基咕吨酮杂质的HPLC分析

王 英, 薛建强, 孙海建, 潘朝晖\*

(江苏龙灯化学有限公司, 江苏昆山 215300)

**摘要:** 使用XDB-C<sub>18</sub>色谱柱和PDA检测器, 以乙腈-乙酸铵水溶液为流动相, 建立了测定硝磺草酮原药中硝基咕吨酮杂质的HPLC方法。结果表明, 硝基咕吨酮的线性相关系数为0.999 6, 相对标准偏差为6.11%, 平均回收率为108.20%。该方法具有较高的准确度和精密度, 适用于硝磺草酮原药中硝基咕吨酮杂质的检测。

**关键词:** 硝基咕吨酮; 杂质; 分析; 高效液相色谱

**中图分类号:** TQ 457 D 657.7 **文献标志码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1671-5284.2021.04.005

### Analysis of Nitroxanthone in Mesotrione by HPLC

WANG Ying, XUE Jianqiang, SUN Haijian, PAN Zhaohui\*

(Jiangsu Rotam Chemical Co., Ltd., Jiangsu Kunshan 215300, China)

**Abstract:** The HPLC method for determination of nitroxanthone in mesotrione was established with XDB-C<sub>18</sub> column and PDA detector, using acetonitrile-ammonium acetate aqueous solution as mobile phase. The results showed that the linear correlation coefficient of nitroxanthone was 0.999 6. The relative standard deviation was 6.11%, and the average recovery was 108.20%. The method was suitable for the analysis of nitroxanthone in mesotrione with high precision and accuracy.

**Key words:** nitroxanthone; impurity; analysis; HPLC

硝磺草酮是先正达公司开发的三酮类除草剂, 可有效防除阔叶杂草及禾本科杂草, 在玉米、水稻、甘蔗等作物上广泛应用<sup>[1-3]</sup>。在全球除草剂排行榜中, 硝磺草酮位居第三, 每年原药需求量千吨以上<sup>[4-6]</sup>, 但在硝磺草酮原药生产中如控制不当, 则会产生杂质硝基咕吨酮<sup>[7]</sup>。硝基咕吨酮Ames实验呈阳性, 对人类健康有潜在危害。EFSA<sup>[8]</sup>将硝基咕吨酮(R287431)定为相关杂质, 规定原药中限量最大值为2 mg/kg。

硝基咕吨酮作为相关杂质, 是硝磺草酮质量控制的重点。目前, 对硝基咕吨酮的分析研究, 文献中鲜有报道。李东等<sup>[7]</sup>报道用LC-MS/MS (GB 29382—2012) 法检测, 但是众多企业因缺少此类仪器而无法检测。

笔者建立了测定硝磺草酮原药中硝基咕吨酮杂质的HPLC方法。该方法准确度和精密度高, 检出限符合限量要求, 是一种简单、实用的分析方法, 可满足企业日常检验需求。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器和试剂

SHIMADZU 20-AD高效液相色谱仪 (PDA检测器), 岛津(中国)有限公司; XS 205分析天平, 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司; Agilent XDB-C<sub>18</sub> 不锈钢色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 安捷伦科技(中国)有限公司; SK5200超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; 有机过滤器 (孔径 0.22 μm)。

收稿日期: 2020-09-16

作者简介: 王英 (1982—), 女, 陕西渭南人, 硕士, 工程师, 主要从事农药分析工作。E-mail: anniewang@rotam.com

共同第一作者简介: 薛建强 (1966—), 男, 江苏昆山人, 本科, 高级工程师, 主要从事农药分析工作。E-mail: johnxue@rotam.com

通信作者: 潘朝晖 (1975—), 男, 上海人, 硕士, 主要从事农药有机合成研究。E-mail: peterpan@rotam.com

乙腈(色谱纯) ;乙酸铵(分析纯) ;乙酸铵水溶液(5 mmol/L) 蒸馏水 硝基咕吨酮标样(质量分数99.0%)、硝磺草酮原药(质量分数 $\geq 98\%$ ),江苏龙灯化学有限公司。

## 1.2 色谱条件

流动相 乙腈+乙酸铵水溶液(体积比40:60),过滤,超声脱气;流速:1.0 mL/min;柱温:40℃;进样体积:10  $\mu$ L;波长:280 nm;保留时间:硝基咕吨酮约9.6 min。

上述操作条件是典型的操作参数,可根据不同仪器特点,对给定的操作参数做适当的调整,以获得最佳分离效果。典型的硝基咕吨酮标样及硝磺草酮加标图谱分别见图1、图2。

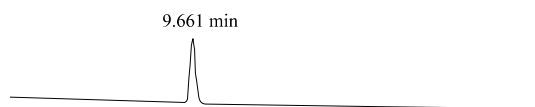


图1 硝基咕吨酮标样图谱



图2 硝磺草酮加标图谱

## 1.3 测定步骤

### 1.3.1 溶液的配制

(1) 称取硝基咕吨酮标样0.005 g(精确至0.000 01 g)于50 mL容量瓶,乙腈稀释,超声5 min,冷却至室温,定容,摇匀。(储备液1)

(2) 移取储备液1溶液1 mL于50 mL容量瓶(预先装入约10 mL乙腈),乙腈稀释,超声1 min,冷却至室温,定容,摇匀。(储备液2)

(3) 移取储备液2溶液1.0、1.25、1.5、3.0、5.0 mL于5个25 mL容量瓶(预先装入约10 mL乙腈),乙腈稀释,超声1 min,冷却至室温,定容,摇匀,即L1、L2、L3、L4、L5。

(4) 称取硝磺草酮厂家2原药2.0 g(精确至0.000 01 g)于7个25 mL容量瓶,加入15 mL乙腈,移取储备液2溶液1.5 mL于上述7个容量瓶中,超声5 min,冷却至室温,定容,摇匀,即P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7。

(5) 称取硝磺草酮厂家1原药2.0 g(精确至0.000 01 g)于5个25 mL容量瓶,加入15 mL乙腈,移取储备液

2溶液1.5 mL于上述5个容量瓶中,超声5 min,冷却至室温,定容,摇匀,即R1、R2、R3、R4、R5。

(6) 称取各厂家硝磺草酮原药2.0 g(精确至0.000 01g)于4个25 mL容量瓶,加入15 mL乙腈,超声5 min,冷却至室温,定容,摇匀,即S1、S2、S3、S4。

### 1.3.2 测定

按1.2的条件设定仪器参数,平衡仪器,待稳定后,连续注入数针标样溶液,直至相邻2针硝基咕吨酮的面积相对变化小于30%后,按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

### 1.3.3 计算

试样中硝基咕吨酮的质量分数按式(1)计算。

$$w/\% = \frac{A_2 m_1 P}{A_1 m_2} \quad (1)$$

式中: $w$ 为试样中硝基咕吨酮质量分数,%; $A_2$ 为试样溶液中硝基咕吨酮峰面积的平均值,mAU·s; $m_1$ 为硝基咕吨酮标样的质量,g; $P$ 为标样中硝基咕吨酮质量分数,%; $A_1$ 为标样溶液中硝基咕吨酮峰面积的平均值,mAU·s; $m_2$ 为试样的质量,g。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱柱的选择

色谱柱是样品分离、测定的关键。同一分析物,使用不同的色谱柱,分离效果不同。选择色谱柱时,要综合考虑色谱柱填料和分析物性质。

试验中比较了Agilent XDB-C<sub>18</sub>柱、Agilent XDB-Phenyl柱、Waters XBridge-C<sub>18</sub>柱、Waters Atlantis-T<sub>3</sub>柱等对硝磺草酮原药中硝基咕吨酮分离效果的影响,最终选择性能稳定且普遍的Agilent XDB-C<sub>18</sub>柱。该色谱柱分析硝基咕吨酮,干扰小、重现性好。

### 2.2 流动相的选择

HPLC反相分析中,有机相一般选择甲醇或乙腈,水相优先使用纯水。如被测物组分复杂,则需结合被测物结构、峰形、干扰等情况对水相及流动相比比例进行调节。硝基咕吨酮为硝磺草酮原药中的杂质,含量在ppm水平,以纯水为水相时,保留时间和硝磺草酮接近,需重点考察硝磺草酮的干扰。参考国标并试验后,在水相中加入乙酸铵,将硝磺草酮的保留时间调至4 min,避免了硝磺草酮对硝基咕吨酮的干扰(图2)。

### 2.3 波长的选择

利用PDA数据采集系统,采集硝磺草酮加标样在波长190~400 nm的紫外吸收光谱曲线。经与

基咕吨酮标样紫外吸收光谱图比对,同时考虑溶剂吸收干扰及其他组分的灵敏度、峰形、检出限等因素,最后优化选择的波长为280 nm。

2.4 专属性试验

在1.2分析条件下,分别进乙腈、硝基咕吨酮标样、硝磺草酮原药、厂家1原药低浓度标样添加液,从溶剂干扰、保留时间、峰纯度、图谱叠加等方面观察在硝基咕吨酮保留时间附近是否有干扰,无干扰则继续,否则需调整方法,以满足专属性试验。本试验条件下,在硝基咕吨酮保留时间附近无干扰,符合专属性要求。

2.5 线性试验

将准备好的溶液L1、L2、L3、L4、L5分别进样,测定硝基咕吨酮的峰面积。以硝基咕吨酮标样的质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线(图3)。结果显示,硝基咕吨酮质量浓度在0.000 082~0.000 410 mg/mL时,线性关系良好,线性方程为 $y=18\,839\,144.30x+25.16$ ,线性相关系数 $r=0.999\,6$ ,可满足定量分析要求。

2.6 精密度试验

将准备好的溶液P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7分别进样,记录硝基咕吨酮的峰面积,按1.3.3的方法计算硝基咕吨酮含量并求RSD和RSDr,结果见表1。根据SANCO 3030/99<sup>[9]</sup> (rev.5) 要求,结果应符合RSD小于RSDr。本试验RSD值为6.11%,RSDr值为10.03% ( $RSDr=2^{(1-0.5\log\hat{\sigma})} \times 0.67$ ),符合要求。

表 2 硝基咕吨酮回收率试验结果

| 样品编号 | 称样量/g    | 加标量/mg    | 理论量/mg    | 实测量/mg    | 回收率/%  | 平均回收率/% |
|------|----------|-----------|-----------|-----------|--------|---------|
| R1   | 2.003 97 |           |           | 0.003 299 | 108.25 |         |
| R2   | 2.006 36 |           |           | 0.003 359 | 110.24 |         |
| R3   | 2.001 54 | 0.003 078 | 0.003 047 | 0.003 229 | 105.96 | 108.20  |
| R4   | 2.004 31 |           |           | 0.003 277 | 107.53 |         |
| R5   | 2.002 35 |           |           | 0.003 322 | 109.01 |         |

2.8 LOD值及LOQ值试验

对溶剂乙腈多次进样,在硝基咕吨酮保留时间附近测量噪音,取5次平均值为基线噪音,以3倍基线噪音为最低检出限 (LOD),以3倍LOD值为最低定量限 (LOQ)。硝基咕吨酮的最低检出限 (LOD) 为0.51 mg/kg,最低检出限色谱图见图4。

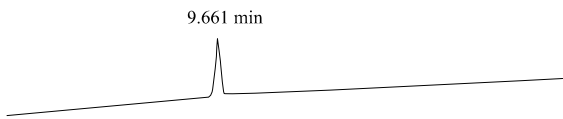


图 4 硝基咕吨酮最低检出限色谱图

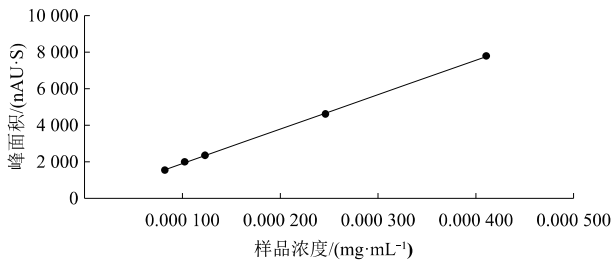


图 3 硝基咕吨酮标准曲线

表 1 硝基咕吨酮精密密度试验结果

| 样品编号 | 硝基咕吨酮含量/% | 平均值/%     | SD值          | RSD值/% | RSDr值/% |
|------|-----------|-----------|--------------|--------|---------|
| P1   | 0.000 149 |           |              |        |         |
| P2   | 0.000 157 |           |              |        |         |
| P3   | 0.000 163 |           |              |        |         |
| P4   | 0.000 153 | 0.000 155 | 0.000 000 09 | 6.11   | 10.03   |
| P5   | 0.000 149 |           |              |        |         |
| P6   | 0.000 144 |           |              |        |         |
| P7   | 0.000 171 |           |              |        |         |

2.7 回收率试验

将准备好的溶液R1、R2、R3、R4、R5分别进样,记录硝基咕吨酮的峰面积,按照1.3.3的方法计算硝基咕吨酮含量并折算至实测量,计算回收率,结果见表2。回收率在105.96%~110.24%,平均回收率为108.20%,根据SANCO 3030/99<sup>[9]</sup> (rev.5) 要求,含量小于0.1%时,回收率范围为75%~125%,结果符合要求。

2.9 硝磺草酮原药中硝基咕吨酮的测定

对市场上4家硝磺草酮原药,用上述方法对其中的硝基咕吨酮杂质进行测定,分析结果见表3。4个厂家样品图谱和标样图谱的叠加比较见图5。

表 3 不同厂家硝基咕吨酮测定结果

| 样品 | 测定结果/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 结论  |
|----|-----------------------------|-----|
| S1 | BDL                         | 合格  |
| S2 | BDL                         | 合格  |
| S3 | 0.51                        | 合格  |
| S4 | 9.10                        | 不合格 |

注:BDL为低于检出限,结论以合格或不合格表示

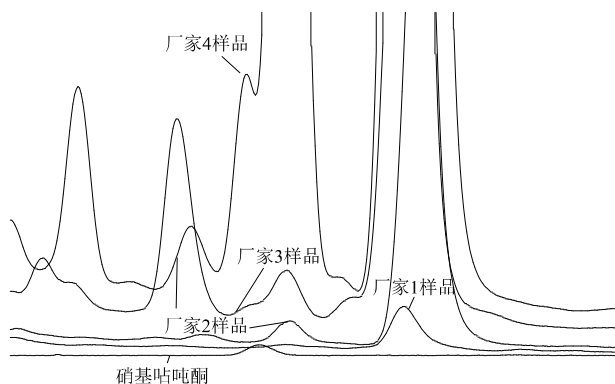


图5 硝基咕吨酮标样和不同厂家样品比较图

从测定结果和比较图谱可知,4个厂家的样品因硝磺草酮原药生产工艺不同,在硝基咕吨酮杂质检测中出现了4种情况。厂家1样品中不含硝基咕吨酮且周围没有任何干扰峰,为合格产品;厂家2样品在9.9 min有未知峰,经加标叠加试验及紫外吸收图谱比对,确认不是硝基咕吨酮(RT为9.6 min),为合格产品。厂家3样品定量结果为0.51 mg/kg,远低于限量(2 mg/kg),为合格产品。厂家4样品定量结果为9.10 mg/kg,远超限量,为不合格产品。如样品定量结果在限量 $\pm 30\%$ 范围(1.4~2.6 mg/kg),建议多次测定取平均值并比对样品峰面积与限量浓度标样峰面积或用GB 29382—2012方法确认后再做判定。

## 2 结 论

本方法采用普通的HPLC仪器,建立了测定硝磺草酮原药中硝基咕吨酮杂质的分析方法,验证了

线性、精密度、回收率、LOD值、LOQ值,结果符合要求。通过对市场上4个厂家硝磺草酮原药中硝基咕吨酮的分析可知,本方法简单、快速,可为众多无LC-MS/MS企业的质量控制提供参考。

## 参考文献

- [1] LOTHAR W, THOMAS H, KLAUS B, et al. Novel heterocyclically substituted benzyisulphonamides, their preparation, and their use as herbicides and plant growth regulators: DE, 3709340[P]. 1988-09-29.
- [2] 刘长令. 国外农药品种手册(增补本)[M]. 沈阳: 全国农药工业信息站, 2000: 322-323.
- [3] 秦恩昊. 硝磺草酮的市场及发展趋势述评[J]. 农药市场信息, 2019, 652(13): 29-32.
- [4] 柏亚罗, 陈燕玲. 除草剂硝磺草酮的应用与开发进展[J]. 现代农药, 2016, 15(2): 42-47.
- [5] 刘君良, 李树柏, 王旭, 等. 25%硝磺·二氯吡可分散油悬浮剂配方研究[J]. 现代农药, 2017, 16(2): 27-29.
- [6] 徐妍, 王金芳, 王佳, 等. 20%硝·烟·辛酰溴可分散油悬浮剂高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2017, 16(3): 27-29.
- [7] 李东, 候春青, 张雪冰, 等. 硝基咕吨酮液质联用分析测定方法[J]. 农药, 2014, 53(5): 340-342.
- [8] EFSA. peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mesotrione[EB/OL]. (2016-2-19) [2021-05-26]. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4419>.
- [9] 欧盟.SANCO/3030/99 rev.5 欧盟农药登记分析方法指南[EB/OL]. (2019-3-22) [2021-05-26]. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_ppp\\_app-proc\\_guide\\_phys-chem-ana\\_3030.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_ppp_app-proc_guide_phys-chem-ana_3030.pdf)

(责任编辑:高蕾)

(上接第 25 页)

中杂质较少,易分离,产品含量高。

表4 精馏结果及收率

| 批号 | 噻吩甲醛含量/% | 收率/% | 总收率/% |
|----|----------|------|-------|
| 1  | 99.50    | 90.1 | 92.80 |
| 2  | 99.60    | 89.7 | 91.70 |
| 3  | 99.34    | 91.2 | 92.03 |
| 4  | 99.20    | 90.7 | 91.90 |
| 5  | 99.50    | 90.2 | 92.30 |

## 3 结 论

笔者以HTBPC为催化剂,光气作为原料之一。噻吩与光气一步合成噻吩甲醛。与现有技术相比,该反应条件温和,易操作,工艺简单,使用安全方便、毒性小、污染小、收率高。在后处理方面,采用先通过水蒸气蒸馏,再精馏,所得产品采用气相色谱

面积归一化法测定其含量,发现产物含量高,收率高,成本低,设备投资少,适合工业化生产。

## 参考文献

- [1] 周卫平. 精细化工中间体[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 徐宝财, 温彬宇, 王洪钟. 2-噻吩乙胺的合成[J]. 精细化工, 2001, 18(1): 53-55.
- [3] 徐克勋. 精细有机化工原料及中间体手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [4] 张庆文, 周明华, 尹吴传, 等. 阿佐塞米的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(9): 419-420.
- [5] 何小伟, 刘晓珍, 郑书珍, 等. 3-甲氧基-2-噻吩甲醛的新制备法[J]. 防化研究, 2000, 4: 22-23.
- [6] 邢俊德, 苗茂谦, 张照昱, 等. 一种2-噻吩甲醛合成方法: CN, 102627627[P]. 2012-04-23.

(责任编辑:徐娟)