

HPLC 法检测氟雷拉纳对映异构体的比例

娄艳华¹, 侯建军¹, 刘紫薇¹, 韩怡¹, 李宏伟²

(1. 天津市中升挑战生物科技有限公司, 天津 300380; 2. 天津市农业发展服务中心, 天津 300061)

摘要 目的: 建立氟雷拉纳对映异构体比例的高效液相色谱测定方法。方法: 采用 CHIRALPAK AD-H 手性色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以正己烷-无水乙醇(60:40)为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温室温, 进样量 20 μL。结果: 在本文色谱条件下, 测定的 3 批样品, R-氟雷拉纳与 S-氟雷拉纳峰面积的比例均为 1:1, R-氟雷拉纳与 S-氟雷拉纳质量浓度分别在 80.288 ~ 187.338 μg · mL⁻¹ ($r=0.9997$) 和 81.902 ~ 191.104 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 100.6% 和 100.8%。结论: 本方法准确度高, 重复性好, 可用于氟雷拉纳外消旋体中对映异构体的比例测定方法。

关键词: 氟雷拉纳; 异唑啉类; 对映异构体; 手性; 杀虫剂; 杀螨剂; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)10-1789-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0061

Ratio of enantiomer in fluralaner by HPLC

LOU Yan-hua¹, HOU Jian-jun¹, LIU Zi-wei¹, HAN Yi¹, LI Hong-wei²

(1. Tianjin Speerise Challenge Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300380, China; 2. Tianjin Agricultural Development Service Center, Tianjin 300061, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the ratio of the enantiomer in fluralaner. **Methods:** The chromatographic separation was performed on chiral chromatography column CHIRALPAK AD-H (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of *n*-hexane-anhydrous ethanol (60:40) and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 265 nm and the column temperature was room temperature. **Results:** Under this chromatographic condition, three batches of samples were determined, the proportions of R-fluralaner and S-fluralaner were 1:1. The calibration curves of R-fluralaner and S-fluralaner good linearities at the range of 80.288 - 187.338 μg · mL⁻¹ ($r=0.9997$) and 81.902 - 191.104 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries were 100.6% and 100.8%. **Conclusion:** The method is accurate, reproducible and can be used for the ratio of enantiomers in fluralaner racemate.

Keywords: fluralaner isoxazolines; enantiomer; chiral; insecticides, acaricides; high performance liquid chromatography; quality control

氟雷拉纳(fluralaner)在 2004 年由日本日产化学和美国杜邦公司联合研发并获得化合物专利^[1]。该化合物具有 1 对对映异构体, 药物以右旋异构体和

左旋异构体组成的消旋体上市, 结构式见图 1。2019—2023 年英特威国际股份有限公司在我国相继对氟雷拉纳咀嚼片、溶液剂及滴剂进行了进口注册,

第一作者 Tel: (022)87982199-162; E-mail: 2824434456@qq.com

主要应用于犬、猫体外寄生虫及鸡螨虫的防治^[2]。Thomas 等^[3-6]研究得出,氟雷拉纳溶液可有效杀灭鸡皮刺螨,对蛋鸡体重无影响,且能提高产蛋率,耐受性、安全性良好。Walther 等^[7]在犬上的研究得出,氟雷拉纳宜与食物同服。此外,Rohdich 等^[8-11]通过

研究证实,氟雷拉纳对跳蚤和蜱的杀灭作用持效期达 12 周。单次口服和静脉注射治疗后 112 d 内,氟雷拉纳在血浆中均可测出。局部用药对预防网纹革蜱传播的巴贝斯虫病在 12 周内均有效。口服该药对犬实验感染长角血蜱的有效期可长达 114 d。

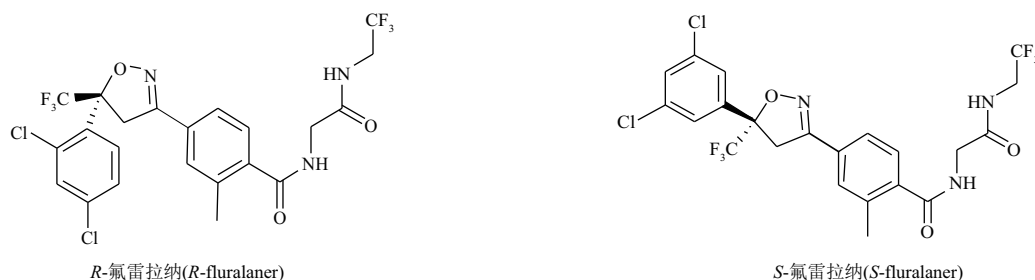


图 1 氟雷拉纳结构式

Fig. 1 Chemical structures of fluralaner

目前上市的药物成分为 *R* 和 *S* 构型的外消旋体,国内氟雷拉纳仅见其消旋体合成工艺^[12]、生物效应^[13]的文献,但是通过查询相关文献、企业标准和药典中均未有针对氟雷拉纳的异构体测定方法的报道,近年来 *S*-氟雷拉纳的手性拆分制备研究热度高涨^[14-15],因此,建立氟雷拉纳消旋体中异构体的分离检测方法是必要的。本研究建立了高效液相色谱法测定氟雷拉纳中对映异构体的检测方法,并进行了完整的方法学研究,结果表明该方法专属性强,可有效分离及快速检出对映异构体,方法简便可行,为后续开发 *S*-氟雷拉纳上市,并且为氟雷拉纳的质量控制提供重要的依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司); ES 225SM-DR 十万分之一电子天平(Precisa 公司); UV-1900i 紫外可见分光光度计(岛津公司)。

1.2 试剂

R-氟雷拉纳对照品(委托药明康德公司分离纯化制得,批号 R-FL-001-P1,纯度 99.652%); *S*-氟雷拉纳对照品(委托药明康德公司分离纯化制得,批号 R-FL-001-P2,纯度 99.448%); 氟雷拉纳(公司自制,批号分别为 FL-Z-200901、FL-Z-200910、FL-Z-200921); 正己烷、无水乙醇(HPLC 级,天津川普伟业科技有限公司); 异丙醇(HPLC 级,西陇科学股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

用直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)硅胶为填充剂(大赛璐 CHIRALPAK AD-H 柱, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 或效能相当的色谱柱)^[16], 以正己烷-无水乙醇(60:40)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 265 nm,柱温室温,进样体积 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶剂 以无水乙醇为空白溶剂。

2.2.2 *R*-氟雷拉纳对照品溶液 精密称取 *R*-氟雷拉纳的对照品约 125 mg,置 50 mL 量瓶中,加无水乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 *R*-氟雷拉纳对照品储备液。精密量取 *R*-氟雷拉纳对照品储备液 5 mL,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 *S*-氟雷拉纳对照品溶液 精密称取 *S*-氟雷拉纳对照品约 125 mg,置 50 mL 量瓶中,加无水乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 *S*-氟雷拉纳对照品储备液。精密量取 *S*-氟雷拉纳对照品储备液 5 mL,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

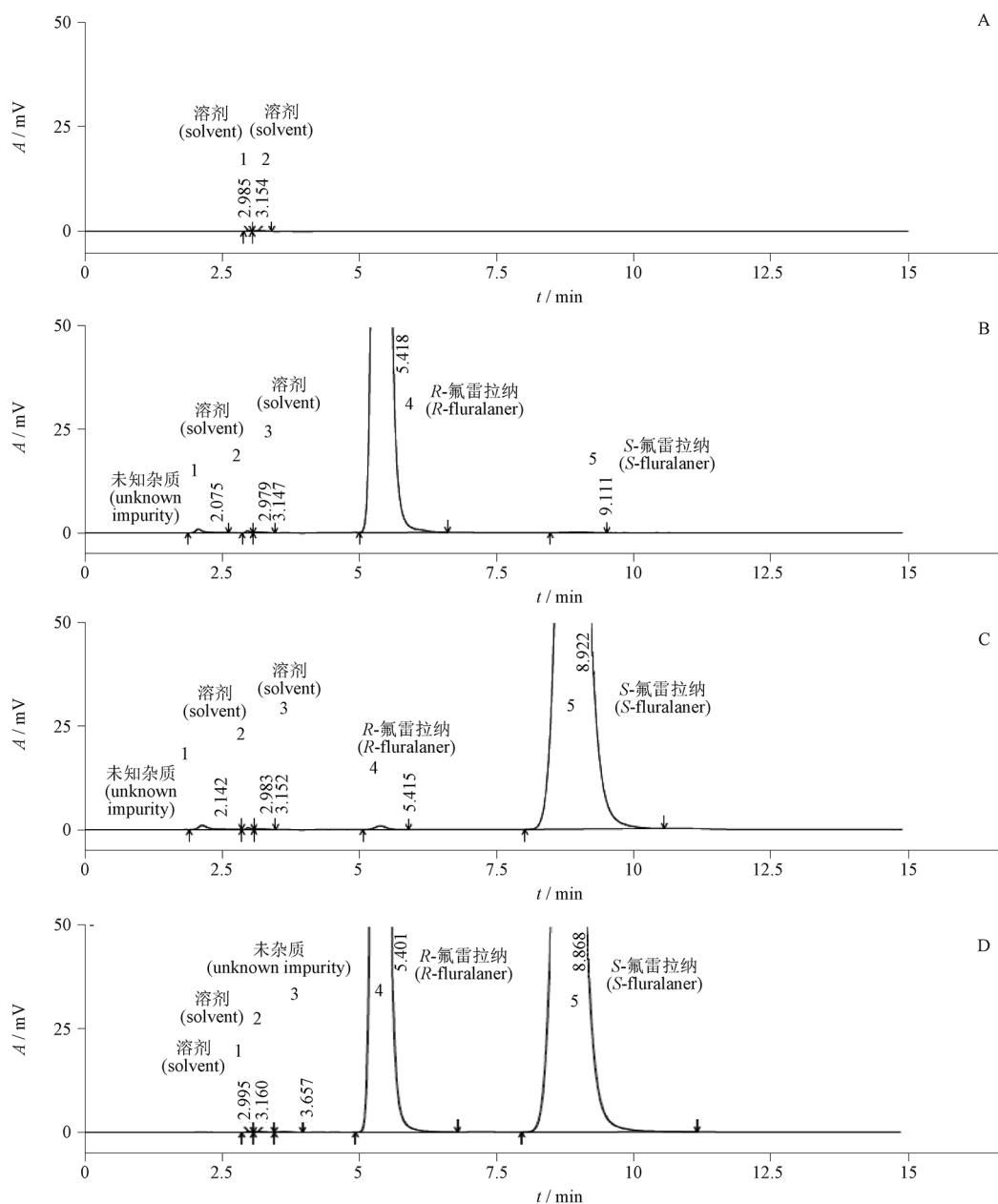
2.2.4 供试品溶液 取氟雷拉纳适量,精密称定,加无水乙醇溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 0.25 mg 的溶液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别取空白溶剂、*R*-氟雷拉纳

对照品溶液、*S*-氟雷拉纳对照品溶液、供试品溶液各 20 μ L 分别注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积。

结果表明,*R*-氟雷拉纳与 *S*-氟雷拉纳之间良好分离,溶剂无水乙醇不干扰本品异构体检查(见图 2)。



A. 溶剂(solvent) B. *R*-氟雷拉纳对照品溶液(reference solution of *R*-fluralaner) C. *S*-氟雷拉纳对照品溶液(reference solution of *S*-fluralaner) D. 供试品溶液(sample solution)

图 2 专属性试验图谱

Fig. 2 Chromatograms of specificity test

2.3.2 线性关系考察 精密量取 *R*-氟雷拉纳对照品储备液 3、4、5、6、7 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 *R*-氟雷拉纳系列浓度对照品溶液。精密量取 *S*-氟雷拉纳对照品储

备液 3、4、5、6、7 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 *S*-氟雷拉纳系列浓度对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 20 μ L, 分别按“2.1”项条件进样检测, 记录色谱图及

峰面积。以峰面积对浓度进行线性回归。求得 *R*-氟雷拉纳、*S*-氟雷拉纳回归方程分别为

$$Y = 43\,034.2X - 184\,967.7 \quad r = 0.999\,7$$

$$Y = 45\,930.1X - 296\,885.9 \quad r = 0.999\,9$$

结果表明, *R*-氟雷拉纳质量浓度在 80.288 ~ 187.338 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, *S*-氟雷拉纳质量浓度在 81.902 ~ 191.104 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密量取供试品溶液 20 μL , 按“2.1”项条件连续进样 6 次, 记录色谱图及峰面积。结果 *R*-氟雷拉纳的平均峰面积为 5 831 672, RSD 为 0.030%; *S*-氟雷拉纳的平均峰面积为 5 830 189, RSD 为 0.039%。表明进样精密度均良好。

2.3.4 耐用性试验 精密量取供试品溶液 20 μL , 按“2.1”项条件进样测定, 记录色谱图, 按面积归一化法计算 2 个异构体的比例。设计变化因素为柱温、流动相比、流速, 考察各变化因素对 2 个异构体比例的影响。变化柱温为 20、30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相比调整为 62 : 38.58 : 42, 变化流速为 0.9、1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果轻微改变测定条件, 2 个异构体峰分离度均 > 2.0, 2 个异构体峰面积的比值平均为 0.998, RSD 为 0.079%, 即 2 个异构体的比例为 1 : 1, 且基本不变, 表明本方法异构体测定的耐用性良好。

2.3.5 溶液稳定性试验 取供试品溶液于室温下

放置 6 h, 分别于第 0、1、2、4、6 h, 精密量取 20 μL 进样, 记录色谱图及峰面积。结果 *R*-氟雷拉纳的平均峰面积为 5 795 890, RSD 为 0.065%; *S*-氟雷拉纳的平均峰面积为 5 799 140, RSD 为 0.094%。表明供试品溶液在室温 6 h 内稳定。

2.3.6 回收率试验 分别精密量取 *R*-氟雷拉纳、*S*-氟雷拉纳的对照品储备液各 5 mL 置同一 100 mL 量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得氟雷拉纳异构体混合对照品溶液。取氟雷拉纳约 15 mg, 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 分别精密加入 *R*-氟雷拉纳、*S*-氟雷拉纳的对照品储备液各 5 mL, 振摇使溶解, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得回收率 80% 组供试溶液, 重复制备 3 份。取氟雷拉纳约 25 mg, 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 分别精密加入 *R*-氟雷拉纳、*S*-氟雷拉纳的对照品储备液各 5 mL, 振摇使溶解, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得回收率 100% 组供试溶液, 重复制备 3 份。取氟雷拉纳约 35 mg, 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 分别精密加入 *R*-氟雷拉纳、*S*-氟雷拉纳的对照品储备液各 5 mL, 振摇使溶解, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得回收率 120% 组供试溶液, 重复制备 3 份。取上述溶液各 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图及峰面积。按外标法以峰面积计算回收率。结果见表 1、2。

表 1 *R*-氟雷拉纳回收率试验结果

Tab. 1 Recovery test results of *R*-fluralaner

理论浓度 (theoretical concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得浓度 (measured concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/%	均值 (average recovery)/%	RSD/ %
90.4	89.6	99.2	100.6	0.97
90.2	91.1	101.0		
89.3	90.8	101.7		
122.1	123.3	101.0		
121.7	120.9	99.3		
122.4	124.3	101.6		
144.1	143.6	99.7		
138.7	140.5	101.3		
139.9	140.6	100.5		

2.4 样品检测

取氟雷拉纳 3 批, 按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件, 分别取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图及峰面积。计算 *R*-氟雷拉纳与 *S*-氟雷拉纳峰面积之间的比值, 结果分别为

0.998 7、0.998 8、0.999 0, 即 3 批样品 *R*-氟雷拉纳与 *S*-氟雷拉纳峰面积的比例均为 1 : 1。

3 讨论

3.1 异构体对照品的制备

委托药明康德公司采用手性制备柱分离纯化

表 2 S-氟雷拉纳回收率试验结果
Tab. 2 Recovery test results of S-fluralaner

理论浓度 (theoretical concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得浓度 (measured concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/%	均值 (average recovery)/%	RSD/ %
91.2	90.5	99.2	100.8	0.99
91.0	91.9	101.0		
90.2	91.8	101.8		
123.0	124.4	101.2		
122.6	122.0	99.5		
123.2	125.5	101.8		
145.0	144.9	99.9		
139.6	141.8	101.6		
140.8	141.8	100.7		

得到了氟雷拉纳 2 个对映异构体对照品,后通过比旋度的测定得到了左旋与右旋信息。

3.2 检测波长选择

对 R-氟雷拉纳对照品溶液、S-氟雷拉纳对照品溶液及氟雷拉纳供试品溶液分别进行紫外全波长扫描,结果显示均在 265 nm 波长处有最大吸收,因此选用 265 nm 检测波长进行检测。

3.3 色谱条件选择

采用大赛璐 AD-H(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,首先以正己烷-异丙醇(50:50)为流动相,结果 R-氟雷拉纳与 S-氟雷拉纳良好分离,但 S-氟雷拉纳拖尾因子略大;更换异丙醇为无水乙醇,改变流动相为正己烷-无水乙醇(50:50),结果 R-氟雷拉纳与 S-氟雷拉纳良好分离,S-氟雷拉纳峰形明显改善,但是 2 个对映异构体保留时间变近;降低无水乙醇比例,即调整流动相为正己烷-无水乙醇(60:40),结果 R-氟雷拉纳与 S-氟雷拉纳良好分离,2 个对映异构体保留时间合理,且峰形对称。

3.4 溶剂选择

氟雷拉纳在 N-N 二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈中溶解度好,在水、正己烷中几乎不溶。由于此液相色谱系统为正相模式,优选乙醇、异丙醇、正己烷等有机溶剂溶解样品。根据流动相为正己烷-无水乙醇(60:40),且氟雷拉纳在正己烷中几乎不溶,因此选择无水乙醇作为配制溶剂,与流动相的兼容性更好,且溶解性能也较好。

4 结论

本研究以消旋体氟雷拉纳为原料,通过手性制备柱分离纯化后,经比旋度测定得到 R-氟雷拉纳与

S-氟雷拉纳。以正相手性色谱柱开发出了 HPLC 法检测氟雷拉纳中对映异构体比例的方法,并进行了专属性、线性、精密度、耐用性、溶液稳定性、回收率等详细的方法学验证试验。经验证得出,本方法检测氟雷拉纳中对映异构体的比例可行。同时本方法,也为推进 S-氟雷拉纳上市,建立检测 R-氟雷拉纳异构体的方法提供支持。

参考文献

- [1] 张岩,毛倩倩,路庭欢,等. 异唑啉类宠物驱虫药国内外研究进展及产品研发要点分析[J]. 中国兽药杂志, 2023, 57(1): 63
ZHANG Y, MAO QQ, LU TH, *et al.* Research progress of isoxazoline pet insecticides at domestic and abroad and analysis of key points of product development[J]. Chin J Vet Drug, 2023, 57(1):63
- [2] 景成德, 栾长福. 氟雷拉纳在小动物临床的应用[J]. 新农业, 2020, 50(9):59
JING CD, LUAN CF. Clinical application of flurellana in small animals[J]. Mod Agric, 2020, 50(9):59
- [3] THOMAS E, CHIQUET M, SANDER B, *et al.* Field efficacy and safety of fluralaner solution for administration in drinking water for the treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestations in commercial flocks in Europe[J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):457
- [4] PROHACZIK A, MENGE M, HUYGHE B, *et al.* Safety of fluralaner oral solution, a novel systemic antiparasitic treatment for chickens, in Laying after oral administration viadrinking water [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):363
- [5] HUYGHE B, LE GT, FLOCHLAY-SIGOGNAULT A. Safety of fluralaner oral solution, a novel systemic poultry red mite treatment, for chicken breeders, reproductive performances[J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):540

- [6] BRAUNEIS MD, ZOLLER H, WILLIAMS H, *et al.* The acaricidal peed of kill of orally administered fluralaner against poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) on laying hens and its impact on mite reproduction[J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1):594
- [7] WALTHER FM, ALLAN MJ, ROEPKE RK, *et al.* The effect of food on the pharmacokinetics of oral fluralaner in dogs[J]. *Parasit Vectors*, 2014, 7(1):84
- [8] ROHDICH N, ZSCHIESCHE E, WOLF O, *et al.* A randomized, blinded, controlled, multi - centered field study assessing the treatment of gastrointestinal nematode infections in cats with fluralaner plus moxidectin spot - on solution (Bravecto™ Plus) [J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11(1):589
- [9] KILPS, RAMIREZ D, ALLAN MJ, *et al.* pharmacokinetics of oral fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration[J]. *Parasit Vectors*, 2014, 7(1):85
- [10] TAENZLER J, GALE B, ZSCHIESCHE E, *et al.* The effect of water and shampooing on the efficacy of fluralaner spot - on solution against *Ixodes ricinus* and *Ctenocephalides felis* infestations in dogs[J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9(1):233
- [11] TOYOTA M, HIRAMA K, SUZUKI T, *et al.* Efficacy of orally administered fluralaner in dogs against laboratory challenge with *Haemaphysalis longicornis* ticks [J]. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1):43
- [12] 黄道友. 新型兽药 Fluralaner 的合成工艺研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2018
HUANG DY. Study on Synthetic Technology of A New Veterinary Drug Fluralaner [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2018
- [13] 冀经伦, 吴旭杰, 陈士慧, 等. 异唑啉类商品化杀虫剂的发展沿革与合成[J]. *现代农药*, 2021, 20(4):13
JI JL, WU XJ, CHEN SH, *et al.* Development and synthesis of isoxazoline commercial insecticides[J]. *Mod Agrochem*, 2021, 20(4):13
- [14] 张亮, 李亚玲, 李强, 等. 一种 S 构型 - 氟雷拉纳的制备方法: 中国, 202110824166.5 [P]. 2024 - 02 - 27
ZHANG L, LI YL, LI Q, *et al.* The Invention Relates to A Preparation Method of S - fluralaner; China, 202110824166.5 [P]. 2024 - 02 - 27
- [15] 江新华, 江洁滢, 李升, 等. 一种 S - 氟雷拉纳晶型及其制备方法: 中国, 202310786888.5 [P]. 2023 - 09 - 29
JIANG XH, JIANG JY, LI S, *et al.* The Invention Relates to S - fluralaner Crystal form and A Preparation Method thereof; China, 202310786888.5 [P]. 2023 - 09 - 29
- [16] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 671, 1219
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 671, 1219

(本文于 2024 年 3 月 25 日收到)