

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.02

HPLC 法测定猪血浆中帕托珠利的方法学建立

沈佳晨, 霍浩远, 全家兴, 李小龙, 卜仕金*

(扬州大学兽医学院/江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225000)

[收稿日期] 2019-03-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0009-05 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立了 HPLC 法测定猪血浆中帕托珠利含量的方法。色谱柱为安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相 0.2% 乙酸水溶液-乙腈(47:53), 柱温 35 $^{\circ}$ C, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 250 nm。在本方法条件下, 帕托珠利在 0.1~10 μ g/mL 浓度范围内线性关系良好($r>0.999$), 检测限(LOD)为 0.04 μ g/mL, 定量限(LOQ)为 0.1 μ g/mL, 批内和批间回收率均大于 90%, 批内和批间精密度 RSD 均小于 9%。本方法简单、准确、快速, 可用于测定猪血浆中帕托珠利的含量。

[关键词] 帕托珠利; 高效液相色谱法; 猪血浆

Method of Determination of Ponazuril in Pig Plasma by HPLC

SHEN Jia-chen, HUO Hao-yuan, QUAN Jia-xin, LI Xiao-long, BU Shi-jin*

(Veterinary College, Yang Zhou University, Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225000, China)

Corresponding author: BU Shi-jin, E-mail: sjbo@yzu.edu.cn

Abstract: The paper established an HPLC method for the determination of ponazuril in pig plasma. The column was Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); the mobile phase consisted of water(0.2% acetic acid)-acetonitrile(47:53); the column temperature was 35 $^{\circ}$ C; the flow rate was 1mL/min; the detection wavelength was 250 nm. Under the condition of this method, ponazuril has a good linear relationship in the range of 0.1~10 μ g/mL($r>0.999$); the detection limit(LOD) is 0.04 μ g/mL; the limit of quantitation(LOQ) is 0.1 μ g/mL; the intraland inter-assay recovery rates were both greater than 90%; the internal and inter-assay precision RSD were less than 9%. The method is simple, accurate and rapid. It can be used to determine the content of ponazuril in pig plasma.

Key words: ponazuril; HPLC; pig plasma

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 沈佳晨, 硕士研究生, 从事兽医药理学及毒理学研究。

通讯作者: 卜仕金。E-mail: sjbo@yzu.edu.cn

帕托珠利(Ponazuril),又名妥曲珠利砜(Toltrazuril sulfone),化学名为 1-甲基-3-[3-甲基-4-(4-三氟甲基砜基-1-苯氧基)-苯基]-[1,3,5]-三嗪-[2,4,6]-三酮,分子式 $C_{18}H_{14}F_3N_3O_6S$ 。帕托珠利属三嗪酮类药物,主要用于治疗原虫疾病,该药最早由德国 Bayer 公司开发,并于 2001 年经 FDA 批准在美国上市。帕托珠利对球虫的各个发育阶段都有效果,具有用量低,安全性高,无耐药性等特点^[1],凭借其强大的抗原虫效果以及相对低廉的价格,在其上市后就迅速占领美国市场^[2]。目前测定帕托珠利的方法主要有 HPLC^[2-4]法和 LC-MS^[5-7]法两种,研究采用的是 HPLC 法,旨在建立一种可以在猪血浆中准确快速测定帕托珠利含量方法,期为研究帕托珠利在猪体内的代谢动力学提供基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪:Agilent 1260,安捷伦公司;电子分析天平:感量 0.0001 g,德国赛多丽丝天平公司;超声仪:KS-250D,宁波科生仪器厂;超纯水设备:UPH-11-20T,成都超纯科技有限公司;氮吹仪:Organomation Associates 公司;台式高速离心机:Centrifuge 5810 R, Eppendorf 公司;微量移液器:10、200、1000 μ L, Eppendorf 公司。

帕托珠利对照品(含量 99.6%,批号:180502WS)购自湖北龙翔药业科技股份有限公司;甲醇,色谱纯,购自美国 TEDIA 公司;乙腈,色谱纯,购自美国 TEDIA 公司;乙酸,色谱纯,购自德国 CNW 公司;乙酸乙酯,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 提取方法 准确吸取 200 μ L 血浆于 2 mL 离心管中,加入 1 mL 乙酸乙酯涡旋 3 min, 12000 r/min 离心 10 min,将上清液移至 10 mL 离心管中,下层残渣用 0.5 mL 乙酸乙酯重复提取一次,合并上清液并于氮气下吹干。氮吹后的残渣用 200 μ L 流动相复溶, 12000 r/min 离心 10 min,取上清经 0.22 μ m 有机滤膜过滤,滤液供 HPLC 分析。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙

腈-0.2%乙酸水溶液(53:47, V/V);流速 1 mL/min;紫外检测波长 250 nm;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

1.2.3 试液的配制 标准储备液与质控储备液:准确称取约 10 mg 帕托珠利标准品于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容并稀释至刻度,浓度为 1 mg/mL,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。质控储备液于做稳定性试验当日配。工作液:准确吸取适量帕托珠利标准储备液,用流动相稀释成一定浓度的系列浓度的标准工作液,现配现用。

1.3 方法学验证

1.3.1 准确度与精密度的测定 按照生物样品定量分析指导原则,用质控储备液配制定量限、低、中、高四个血浆浓度添加水平,即 0.1、0.2、5、7.5 μ g/mL 四个血浆添加浓度。以 1.2.1 项的前处理方法进行处理后,按照 1.2.2 项的条件进行检测。每批每个浓度制备 5 个平行,连续 3 d。测定结果带入当天绘制的标曲中,计算回收率以及变异系数。

1.3.2 稳定性考察 按照生物样品定量分析指导原则,采用低和高浓度质控样品进行稳定性的考察。

1.3.2.1 储备液在冻存条件下的稳定性 用质控储备液配制浓度为 0.2、7.5 μ g/mL 的帕托珠利标准工作液,每个浓度 15 个平行,并分别于 0、30、60 d 上机分析。通过与第 0 天数据比较,考察储备液冻存期间(-20 $^{\circ}$ C)的稳定性。

1.3.2.2 血浆样品在冻存条件下的稳定性 用质控储备液配制浓度为 0.2、7.5 μ g/mL 的帕托珠利血浆添样品,每个浓度 15 个平行,并于 -20 $^{\circ}$ C 条件下冻存。分别在 0、30、60 d 对样品进行分析。通过与第 0 天数据比较,考察血浆样品冻存期间(-20 $^{\circ}$ C)的稳定性。

1.3.2.3 血浆样品反复冻融的稳定性 用质控储备液配制浓度为 0.2、7.5 μ g/mL 的帕托珠利血浆添样品,每个浓度 10 个平行。每个浓度的 5 个平行立刻处理分析,得到 0 时数据。其余样品在 -20 $^{\circ}$ C 冻存 1 d 后取出解冻,之后再次冷冻、解冻,反复 3 次循环处理,两次冻融时间间隔至少为 5 h。通过与 0 时数据比较,考察血样反复冻融的稳定性。

1.3.2.4 血浆样品在室温放置的稳定性 用质控

储备液配制浓度为 0.2、7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的帕托珠利血浆添样品,每个浓度 5 个平行,并立刻处理分析,得到 0 时数据,之后在室温(约 20 $^{\circ}\text{C}$)6 h 后进行样品分析。通过与 0 时数据比较,考察血样室温放置的稳定性。

2 结果与分析

2.1 色谱行为 由帕托珠利标准品、空白血浆、空白添加样品的分离图谱可知,空白血浆与杂质对帕托珠利出峰无明显干扰,帕托珠利出峰良好,保留时间在 9 min 左右(图 1)。

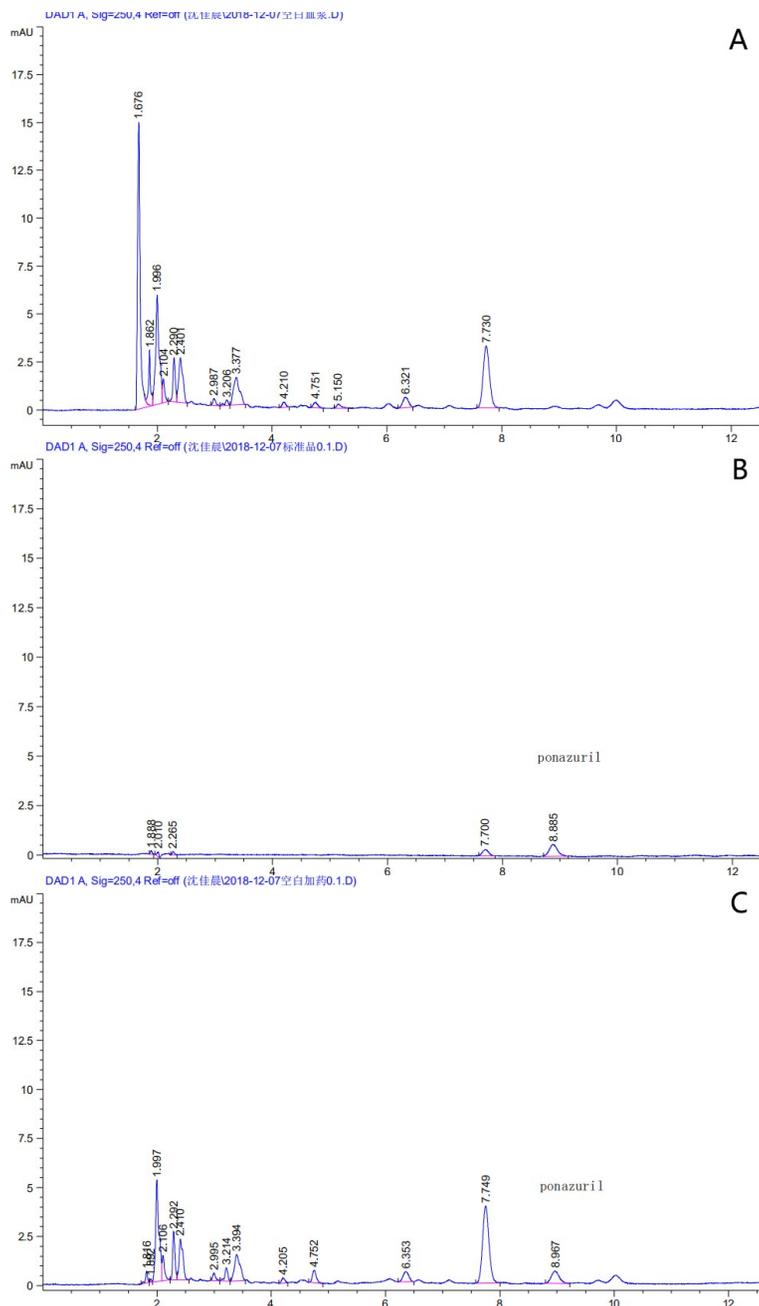


图 1 HPLC 色谱图(A、B、C 分别为空白血浆、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 帕托珠利标准品、空白血浆添加 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 帕托珠利标准品)

Fig 1 HPLC chromatograms (A, B, and C are respectively blank plasma, ponazuril standard at 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and spiked pig plasma at the level of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.2 标准曲线和线性范围 由表 1 所示帕托珠利在 0.10~10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,标准工作液中帕托珠利与峰面积呈良好的线性关系 ($r \geq 0.999$) (表 1)。以标准工作液药物浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制的标准曲线见图 2。

表 1 帕托珠利标准回归方程及相关系数

Tab 1 Linear regression equation and correlation coefficient of ponazuril

批次	线性范围 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	标准曲线回归方程	相关系数 r
1	0.10~10.00	$y = 52.120x + 0.0593$	0.9997
2	0.10~10.00	$y = 52.537x + 0.4502$	0.9997
3	0.10~10.00	$y = 53.443x - 0.3217$	0.9999

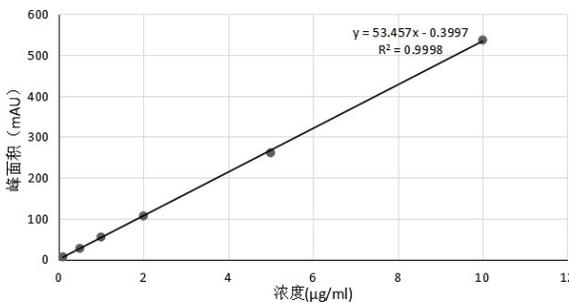


图 2 帕托珠利标准曲线图

Fig 2 Standard working cure of ponazuril

2.3 检测限和定量限 帕托珠利在猪血浆中的最低检测限为 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最低定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 准确度和精密度 猪血浆中帕托珠利测定方法准确度和精密度的测定结果见表 2。由表 2 可见,猪血浆样品在 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,批内和批间回收率均大于 90%,批内和批间变异系数均小于 9%,该方法符合生物样定量分析指导原则的要求且重复性良好。

2.5 稳定性 帕托珠利储备液稳定和血浆样品稳定性的考察结果分别见表 3 和表 4。结果显示,储备液冻存稳定 ($RSD < 4\%$),血浆样品冻存稳定 ($RSD < 8\%$),血浆样品反复冻融后稳定 ($RSD < 6\%$),血浆样品室温放置稳定 ($RSD < 4\%$),表明帕托珠利在整个实验过程中基本没有降解。

表 2 血浆样品中帕托珠利的相对回收率和精密度

Tab 2 The recovery of ponazuril and the precision determination in plasma

项目	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均回收率 $\bar{x} \pm \text{SD}/\%$	RSD/%
批内 (n=5)	0.1	104.97 \pm 4.15	4.04
	0.2	101.23 \pm 2.32	2.20
	5	90.76 \pm 1.77	1.92
	7.5	91.72 \pm 3.42	3.39
	0.1	97.45 \pm 7.93	8.13
批间 (n=15)	0.2	96.35 \pm 6.14	6.44
	5	92.66 \pm 3.47	3.74
	7.5	90.45 \pm 3.60	3.93

表 3 帕托珠利储备液在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 储存条件下的稳定性

Tab 3 The stability of ponazuril stock solutions stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$

项目	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积 $\bar{x} \pm \text{SD}$ /(mAU)	RSD/%
储备液冻存 稳定性 (n=15)	0.2	13.005 \pm 0.032	3.188
	7.5	414.913 \pm 6.648	1.602

表 4 帕托珠利血浆样品的稳定性

Tab 4 The stability of ponazuril in plasma

项目	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	实测浓度 $\bar{x} \pm \text{SD}$ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
血浆样品冻存 稳定性 (n=15)	0.2	0.198 \pm 0.014	7.162
	7.5	6.889 \pm 0.218	3.166
血浆样品冻融 稳定性 (n=10)	0.2	0.196 \pm 0.010	5.010
	7.5	6.879 \pm 0.030	2.954
血浆样品室温 稳定性 (n=5)	0.2	0.178 \pm 0.006	3.465
	7.5	6.613 \pm 0.219	3.304

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的优化 根据文献报道,本实验分别尝试了以甲醇-水、甲醇-0.2%乙酸水、乙腈-水、乙腈-0.2%乙酸水作为流动相。结果显示,以甲醇-水和甲醇-0.2%乙酸水系统作为流动相时,分离效果不理想,药物洗脱时间过长;而以乙腈-水体作为流动相时,主峰会拖尾现象,因此,选择

乙腈-0.2%乙酸水作为流动相。在本研究中发现,适当提高乙腈在流动相中的比例,可极大程度缩短帕托珠利的保留时间,当乙腈在流动相中的比例达到 57% 时,主峰可与杂峰完全分离。在柱温低于 35 ℃ 时,低浓度样品主峰峰形较差,由于柱温过高会减少色谱柱的使用寿命,故选择柱温 35 ℃,在此条件下,帕托珠利的出峰时间在 9 min 左右。由于在猪血浆样品中 20 min 左右会出现干扰杂峰,为了不影响下一个样品的检测,选择 13 min 作为一个样品的分析周期。

3.2 提取条件的优化 据文献报道,帕托珠利样品的提取剂选择主要有乙酸乙酯^[3]、乙腈^[8-10]、甲醇^[1]等,本试验分别对这 3 种提取剂进行了考察,结果发现,3 种提取剂的提取回收率均可达到 90% 左右,但乙腈和甲醇属于蛋白沉淀剂,提取后所含杂质较多,影响低浓度样品测定的准确性。而乙酸乙酯的提取属于液液萃取,相比于蛋白沉淀,提取后杂质明显减少,同时乙酸乙酯的挥发性强于其他提取剂,可明显缩短氮吹时间,提高工作效率。

研究所建立的猪血浆测定帕托珠利的方法操作简单,灵敏度高,血浆中帕托珠利的线性范围为 0.1~10 μg/mL,样品回收率高,平均回收率大于 90%,能够准确测定各个时间点的血浆药物浓度。在方法学论证和稳定性考察中,准确度、精密度和各个阶段的稳定性均符合生物样定量分析指导原则的要求,能够保证检测结果的准确性和重现性。

参考文献:

[1] 邱小兵. 妥曲珠利酮对猪球虫病的药效学及安全药理学研究[D]. 江西农业大学, 2013.
Qiu X B. Pharmacodynamics and safety pharmacology of toltrazuril on porcine coccidiosis[D]. Jiangxi Agricultural University, 2013.

[2] 王翔林, 王冠楠, 钱琛, 等. HPLC 法测定帕那珠利含量[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(8): 35-38.
Wang X L, Wang G N, Qian S, et al. Determination of Panazuril by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2012, 46

(8): 35-38.

[3] Zou M, Guo G, Zhao Y, et al. Detection, quantifications, and pharmacokinetics of ponazuril in healthy swine[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2014, 37(6): 598-602.

[4] Dirkol L, Yohn R, Garrett E F, et al. Quantifications and pharmacokinetics of toltrazuril sulfone (ponazuril) in cattle[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2009, 32(3): 280-288.

[5] Kim M S, Lim J H, Hwang Y H, et al. Plasma disposition of toltrazuril and its metabolites, toltrazuril sulfoxide and toltrazuril sulfone, in rabbits after oral administration.[J]. Veterinary Parasitology, 2010, 169(1): 51-56.

[6] Love D, Gibbons P, Fajt V, et al. Pharmacokinetics of single-dose oral ponazuril in weanling goats[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2016, 39(3): 4.

[7] Victor H, Magne Y, Oyvin O. Determination of flunixin and tiamulin hydrogen fumarate in meat and toltrazuril and the metabolite toletazurilsulfon in meat and eggs using LC/MS[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2003, 26(5): 791-801.

[8] 徐颖洁, 韩航如, 郭永刚, 等. 液质联用方法测定鸡血浆中妥曲珠利及其代谢产物[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(1): 127-130.
Chen Y J, Han H R, Guo Y G, et al. Determination of toltrazuril and its metabolites in chicken plasma by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2006, 29(1): 127-130.

[9] 宫小明, 孙军, 董静, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中的阿维菌素类、地克珠利、妥曲珠利及其代谢物残留[J]. 色谱, 2011, 29(3): 217-222.
Gong X M, Sun J, Dong J, et al. Determination of avermectins, diclazuril, toltrazuril and their metabolite residues in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chromatography, 2011, 29(3): 217-222.

[10] 卢朝成, 符华林, 张伟, 等. 妥曲珠利微晶体的制备及其在家兔体内的药动学[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(7): 149-153.
Lu C C, Fu H L, Zhang W, et al. Preparation of toltrazuril microcrystals and pharmacokinetics in rabbits[J]. Chinese Veterinary Journal, 2014, 34(7): 149-153.