

聂晶晶, 王文湘, 华成云, 等. 高效液相色谱法测定猪排泄物中帕托珠利 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(1): 34-41.
NIE Jingjing, WANG Wenxiang, HUA Chengyun, et al. Determination of ponazuril in pig excrement by high performance liquid chromatography[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(1): 34-41.

高效液相色谱法测定猪排泄物中帕托珠利

聂晶晶, 王文湘, 华成云, 梁立杰, 黄显会

(华南农业大学 兽医学院/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立高效液相色谱 (HPLC) 结合二极管阵列检测器 (PDA) 检测猪排泄物中帕托珠利的方法。【方法】尿液样品用 0.2%(φ) 乙酸酸化乙腈和二氯甲烷进行 2 次提取; 粪便样品经乙腈涡旋提取, 亲水-亲油平衡 (HLB) 固相萃取柱净化。流动相为 0.005 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (A)-乙腈 (B), 尿液和粪便样品的流动相比比例 $V(A):V(B)$ 分别为 55:45 和 56:44。检测波长为 255 nm, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 30 μL 。【结果】猪尿液中帕托珠利的检测限和定量限分别为 0.02 和 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 在 0.05~5.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系, 决定系数 (R^2) 为 0.999 8; 在 3 个添加剂量 (0.05、1.00 和 5.00 $\mu\text{g/mL}$) 下, 帕托珠利在猪尿液中的平均回收率为 93.49%~99.16%, 批内和批间相对标准偏差 (RSD) 为 0.97%~7.62%。猪粪便中帕托珠利的检测限和定量限分别为 0.10 和 0.25 $\mu\text{g/g}$, 在 0.25~100.00 $\mu\text{g/g}$ 范围内呈良好的线性关系, R^2 为 0.999 5; 在 3 个添加剂量 (0.25、25.00、100.00 $\mu\text{g/g}$) 下, 帕托珠利在猪粪便中的平均回收率为 89.55%~95.88%, 批内和批间 RSD 为 1.76%~3.63%。帕托珠利在尿液和粪便样品中的提取回收率均大于 89.50%, 批内和批间 RSD 均小于 8%。【结论】本研究方法对样品的前处理操作简单、灵敏度高, 可用于猪排泄物中帕托珠利的检测分析。

关键词: 帕托珠利; 高效液相色谱; 猪; 排泄物; 回收率; 精密度; 稳定性
中图分类号: S859.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)01-0034-08

Determination of ponazuril in pig excrement by high performance liquid chromatography

NIE Jingjing, WANG Wenxiang, HUA Chengyun, LIANG Lijie, HUANG Xianhui
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To establish a method of high performance liquid chromatography (HPLC) with a photodiode array detector (PDA) for the determination of ponazuril in pig feces and urine. 【Method】Urine samples were extracted twice with 0.2%(φ) acetic acetonitrile and dichloromethane. Feces samples were vortex-extracted by acetonitrile and purified by hydrophile-lipophile balance (HLB) solid phase extraction column. The mobile phase was 0.005 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (A)-acetonitrile (B), the mobile phase ratios of $V(A):V(B)$ for urine and feces samples were 55:45 and 56:44 respectively. The detection wavelength was 255 nm, the column temperature was 35 $^{\circ}\text{C}$ and the injection volume was 30 μL . 【Result】The detection limit and quantitative limit of ponazuril in urine were 0.02 and 0.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which showed a good linear relationship in the range of 0.05~5.00 $\mu\text{g/mL}$, and the determination coefficients (R^2) was

0.999 8. The average recovery rates ranged from 93.49% to 99.16% at three spiked levels of 0.05, 1.00 and 5.00 $\mu\text{g/mL}$, and the intra-batch and inter-batch relative standard deviations (RSDs) ranged from 0.97% to 7.62%. The detection limit and quantitative limit of ponazuril in feces were 0.10 and 0.25 $\mu\text{g/g}$, respectively, which showed a good linear relationship within the range of 0.25–100.00 $\mu\text{g/g}$, and R^2 was 0.999 5. The average recovery rates ranged from 89.55% to 95.88% at three spiked levels of 0.25, 25.00 and 100.00 $\mu\text{g/g}$, and the intra-batch and inter-batch RSDs ranged from 1.76% to 3.63%. The recovery rates of ponazuril in feces and urine were both higher than 89.50%, and the intra-batch and inter-batch RSDs were both lower than 8%.

【Conclusion】 This method has simple sample pretreatment and sensitive detection, and is suitable for the determination of ponazuril in pig excrement.

Key words: ponazuril; high performance liquid chromatography; pig; excrement; recovery rate; precision degree; stability

猪球虫病多发于 7~14 日龄的仔猪, 主要是由猪艾美耳球虫 *Eimeria* 和猪等孢球虫 *Isospora suis* 感染引起^[1]。目前防治猪球虫病的药物不多, 包括地克珠利和妥曲珠利等三嗪类广谱抗球虫药物。帕托珠利 (Ponazuril) 为妥曲珠利的主要代谢物^[2], 同时是妥曲珠利在动物体内发挥药效的重要活性成分, 在球虫的各个发育阶段都具有良好的驱虫效果, 且在安全性和疗效等方面均优于妥曲珠利^[3], 但尚未被批准用于食品动物球虫病的防治, 是研发中的新兽药。帕托珠利安全、低毒、高效抗虫的特点^[4]使其应用于防治食品动物球虫病的前景广阔, 未来有望成为新一代的猪球虫病防治药物。

欧盟的相关报告^[5-6]指出, 妥曲珠利及其主要代谢物帕托珠利在猪、大鼠等动物体内主要通过粪便排出体外。针对帕托珠利检测方法和应用高效液相色谱 (HPLC) 技术检测猪排泄物中帕托珠利的研究相对较少。目前, 测定帕托珠利的方法主要有 HPLC 法和液相色谱-串联质谱 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 法 2 种^[7-8]。有报道用 HPLC 法检测猪血浆中的帕托珠利^[9], 但猪血浆与猪排泄物的基质差异较大, 同样的提取方法满足不了猪排泄物中帕托珠利的检测要求。本研究通过对样品前处理方法及 HPLC 分析条件的优化, 建立了一种简单、灵敏、重复性好的测定猪排泄物中帕托珠利的方法, 并对其进行了方法学评价, 以期后续研究帕托珠利在仔猪体内的排出提供资料。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

DGU-20A5R 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), Multifuge X1R 高速冷冻型离心机 (美国 Thermo 公司), AG204 电子分析天平 (瑞士 Mettler

Toledo 公司), TWD-12 水浴氮吹仪 (杭州奥盛仪器有限公司)。

帕托珠利原料药: w 为 100.5%, 批号 180501A, 湖北龙翔药业科技股份有限公司; 帕托珠利混悬液: ρ 为 50 g/L, 批号 20 180 501, 湖北龙翔药业科技股份有限公司; Waters Oasis 亲水-亲油平衡 (Hydrophile-lipophile balance, HLB) 固相萃取柱: 60 mg/3 mL, 美国 Waters 公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯; 冰乙酸、二氯甲烷、磷酸二氢钾等均为国产分析纯。

1.2 主要溶液配制

帕托珠利标准储备液 (1 000 $\mu\text{g/mL}$): 精密称取帕托珠利的原料药 50.00 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度线, 摇匀即得, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

帕托珠利标准工作液: 准确吸取 0.10 mL 帕托珠利标准储备溶液, 依次用甲醇稀释成质量浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0、10.0、20.0、25.0、50.0、100.0、200.0、250.0、500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的帕托珠利系列标准工作液, 现配现用。

0.005 mol/L 磷酸二氢钾溶液: 准确称取 0.68 g 磷酸二氢钾, 用超纯水溶解并定容至 1 000 mL, 调 pH 至 5.00 ± 0.05 , 过 0.22 μm 的水系滤膜后, 超声待用。

1.3 色谱条件

色谱柱: Kinetex EVO C18(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.005 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 为 5.00 ± 0.05), B 相为乙腈, 尿液与粪便样品采取不同的流动相比比例, 分别为 $V(\text{A}):V(\text{B})=55:45$ 和 $V(\text{A}):V(\text{B})=56:44$; 流速: 1 mL/min; 定量检测波长: 255 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 30 μL 。

1.4 猪排泄物的采集及测定

1.4.1 试验动物和样品采集 3 头健康的鲁莱纯系仔猪置于代谢笼内单独饲养, 2 周龄左右, 平均体质

量为 (2.83±0.32) kg。试验开始前观察动物饮食、行为和体态特征等, 临床表现为健康。

3 头健康仔猪根据体质量给药, 按 20 mg/kg 剂量灌服 50 g/L 帕托珠利混悬液, 分别在给药前和给药后 0.5、1.0、1.5、2.5 和 3.5 d 通过代谢笼收集猪粪便和尿液, 往后每隔 24 h 采样 1 次, 采至给药后第 50.5 天, 记录每次采样的粪便质量及尿液体积, 取部分于 -20 ℃ 冰箱保存, 待测。给药前收集的空白样品用于帕托珠利检测的方法学研究。

1.4.2 尿液样品的前处理 准确移取 1 mL 尿液样品置于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 0.2%(φ) 乙酸酸化乙腈, 涡旋混匀 3 min, 离心 10 min(10 000 r/min、4 ℃); 收集上清液并加入 5 mL 二氯甲烷, 涡旋混匀 3 min, 离心 10 min(7 000 r/min、4 ℃); 取下层液体于 45 ℃ 条件下用氮气吹干, 以 1 mL 甲醇-水 (1:1, V/V) 复溶, 过 0.22 μm 滤膜, 供 HPLC 测定。

1.4.3 粪便样品的前处理 准确称取 1 g 粪便样品置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈涡旋 3 min, 以 300 r/min 振荡 20 min, 离心 15 min(10 000 r/min、4 ℃); 移取上清液 2 mL 并加 7 mL 水, 备用。HLB 固相萃取柱预先依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化后, 取备用液上柱, 用 3 mL 水和 3 mL 乙腈-水 (3:7, V/V) 淋洗后, 用 3 mL 乙腈洗脱; 收集洗脱液于 45 ℃ 条件下用氮气吹干, 以 1 mL 甲醇-水 (1:1, V/V) 复溶, 过 0.22 μm 滤膜, 供 HPLC 测定。

1.5 定量方法的确立

1.5.1 方法的特异性、检测限和定量限 取不同猪只的空白尿液和空白粪便样品, 分别按“1.4.2”和“1.4.3”方法处理并按“1.3”色谱条件进行测定, 比较空白尿液及空白粪便样品中的内源性化合物对目标药物帕托珠利的检测是否存在干扰。

采用空白尿液及空白粪便样品添加低浓度标准溶液, 分别按“1.4.2”和“1.4.3”方法处理后, 按“1.3”色谱条件进行检测, 以信噪比 ≥ 3 确定检测限 (Limit of detection), 以信噪比 ≥ 10 确定定量限 (Limit of quantification)。

1.5.2 标准曲线的建立 取 0.9 mL 空白尿液和 1 g 空白粪便各 6 份, 分别置于 15 mL 和 50 mL 离心管中, 依次加入 100 μL 帕托珠利系列标准工作液, 使得尿液样品中帕托珠利的质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、1.00、2.00、5.00 $\mu\text{g/mL}$; 粪便样品中帕托珠利的质量分数分别为 0.25、2.50、5.00、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/g}$ 。分别按照“1.4.2”和“1.4.3”方法处理并按“1.3”色谱条件进行测定, 以测得的帕托珠利色谱峰面积 (A) 为横坐标、药物浓度 (C) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得线性回归方程和

决定系数 (R^2)。

1.5.3 回收率与精密度 采用相应基质标准溶液单点校正法计算回收率, 在尿液和粪便里分别制得低、中、高 3 个水平的添加样品, 分别按照“1.4.2”和“1.4.3”方法处理并按“1.3”色谱条件进行加标回收试验, 做准确度分析。连续制备和考察 3 个不同分析批次, 以相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD) 评价方法的批内与批间精密度。尿液及粪便样品的回收率与精密度试验添加剂量及配制方法如下: 取 0.9 mL 空白尿液和 1 g 空白粪便, 分别加入 100 μL 不同质量浓度的帕托珠利标准工作液 (0.5、10.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 和 (2.5、250.0、1 000.0 $\mu\text{g/mL}$), 分别制得低 (0.05 $\mu\text{g/mL}$)、中 (1.00 $\mu\text{g/mL}$) 和高 (5.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个水平的尿液添加样品和低 (0.25 $\mu\text{g/g}$)、中 (25.00 $\mu\text{g/g}$) 和高 (100.00 $\mu\text{g/g}$) 3 个水平的粪便添加样品。

1.5.4 冷冻放置稳定性试验 参照“1.5.3”尿液及粪便样品的回收率与精密度试验添加剂量及配制方法, 分别制得低 (0.05 $\mu\text{g/mL}$)、中 (1.00 $\mu\text{g/mL}$) 和高 (5.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度水平的尿液添加样品和低 (0.25 $\mu\text{g/g}$)、中 (25.00 $\mu\text{g/g}$) 和高 (100.00 $\mu\text{g/g}$) 3 个质量分数水平的粪便添加样品。每个处理设 15 个平行样品, 置于 -20 ℃ 条件下, 分别于 0、30、60 d 后分 3 次取样, 每个处理每次取 5 个平行样品, 分别按照“1.4.2”和“1.4.3”方法处理, 按“1.3”色谱条件进行测定, 考察在 -20 ℃ 保存条件下尿液和粪便样品中帕托珠利的稳定性。

1.5.5 实际样品测定 为评估本研究方法的适用性, 利用本研究方法检测了 3 头仔猪内服帕托珠利后各个时间段的粪便和尿液样品中帕托珠利的平均排出量。在给药后的 0~50.5 d, 1.5 d 前每隔 0.5 d, 1.5 d 后每隔 1 d 收集 1 次 3 头仔猪的粪便和尿液样品, 检测帕托珠利在各个时间段样品中的含量。根据各时间段粪便和尿液的总质量及总体积求出各个时间段粪便和尿液中帕托珠利的平均排出量。平均排出量用平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 方法的特异性、检测限和定量限

2.1.1 特异性 在优化的色谱条件下, 色谱峰形较佳, 分离完全, 色谱图中目标化合物的保留时间处无杂质干扰 (图 1), 表明该方法的特异性较好。如图 1 所示, 粪便和尿液样品中帕托珠利的保留时间分别为 12.367 和 11.441 min。

2.1.2 检测限和定量限 尿液样品中帕托珠利的检测限为 0.02 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$; 粪便样

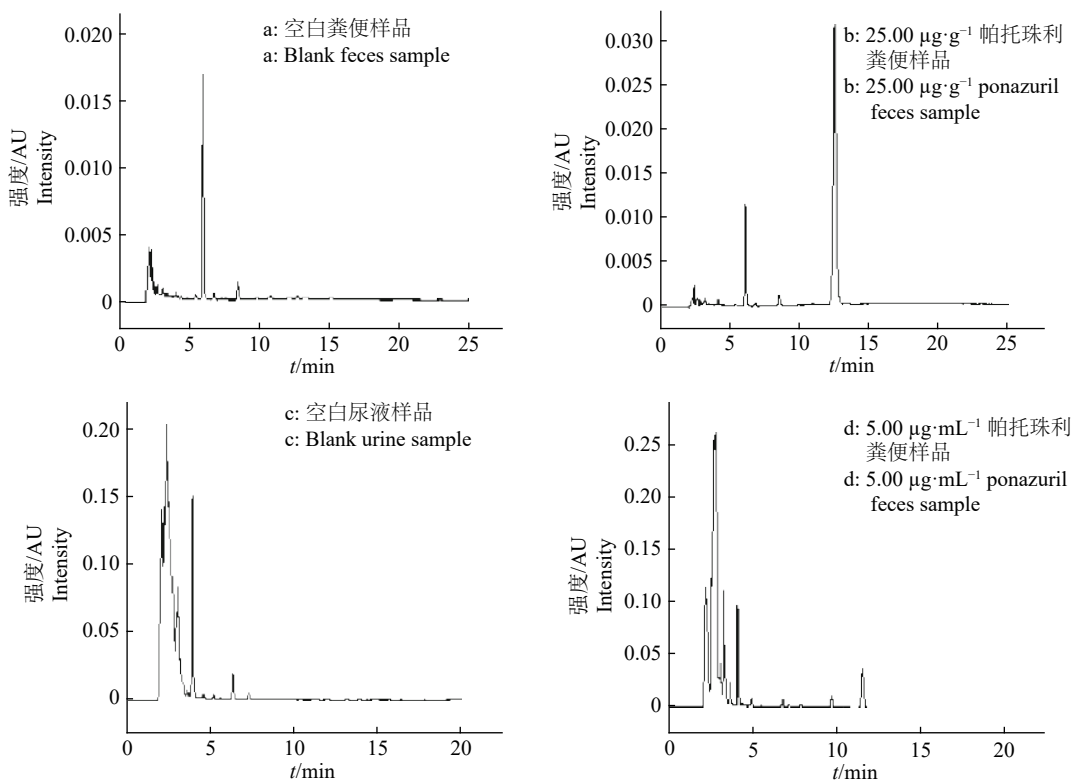


图 1 不同样品的高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatograms of different samples

品中帕托珠利的检测限为 0.10 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 0.25 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 标准曲线

尿液样品中帕托珠利在 0.05~5.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 线性回归方程为 $C=1.284\ 3\times 10^{-5}A-0.005\ 4$, R^2 为 0.999 8; 粪便样品中帕托珠利在 0.25~100.00 $\mu\text{g/g}$ 范围内线性关系良好, 线性回

归方程为 $C=1.288\ 9\times 10^{-5}A-0.023\ 1$, R^2 为 0.999 5。

2.3 回收率与精密度

帕托珠利在尿液和粪便样品中的添加回收率及 RSD 见表 1 和表 2。由表 1 可见, 帕托珠利在尿液低 (0.05 $\mu\text{g/mL}$)、中 (1.00 $\mu\text{g/mL}$) 和高 (5.00 $\mu\text{g/mL}$) 质量浓度样品中的平均回收率分别为 93.49%~97.56%、98.26%~98.78% 和

表 1 帕托珠利在尿液中的回收率与相对标准偏差 (RSD)

Table 1 Recovery rates and relative standard deviations (RSDs) of ponazuril in urine sample n = 3

$\rho(\text{帕托珠利})/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Ponazuril concentration	回收率/% Recovery rate			批内相对标准偏差/% Intra-batch RSD			批间相对标准偏差/%
	1	2	3	1	2	3	Inter-batch RSD
0.05	93.54	97.56	93.49	7.62	5.95	5.78	6.43
1.00	98.26	98.78	98.75	1.34	0.97	1.29	1.17
5.00	99.16	97.43	98.86	6.15	6.09	5.87	5.72

表 2 帕托珠利在粪便样品中的回收率与相对标准偏差

Table 2 Recovery rates and relative standard deviations (RSDs) of ponazuril in feces samples n = 3

$w(\text{帕托珠利})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$ Ponazuril concentration	回收率/% Recovery rate			批内相对标准偏差/% Intra-batch RSD			批间相对标准偏差/%
	1	2	3	1	2	3	Inter-batch RSD
0.25	95.88	89.55	90.65	1.76	2.30	2.00	3.63
25.00	91.95	93.57	94.00	2.29	2.46	2.34	2.40
100.00	93.87	95.24	94.50	2.77	2.97	3.17	2.82

97.43%~99.16%，批内和批间的 RSD 均低于 8%。由表 2 可见，帕托珠利在粪便低 (0.25 μg/g)、中 (25.00 μg/g) 和高 (100.00 μg/g) 质量分数样品中的平均回收率分别为 89.55%~95.88%、91.95%~94.00% 和 93.87%~95.24%，批内和批间的 RSD 均低于 4%。说明该方法重复性较好，通用性较强，可满足猪尿液及粪便样品中帕托珠利含量检测的要求。

2.4 冷冻放置稳定性试验

表 3 和表 4 的结果表明，尿液和粪便样品中的帕托珠利在 0、30 和 60 d 的冷冻放置下含量变化较稳定，试验后帕托珠利的实际含量与试验前的起始含量差别不大，表明在-20 ℃ 的保存条件下尿液和粪便样品中帕托珠利的稳定性较好，尿液和粪便样品中帕托珠利含量的 RSD 分别为 0.85%~6.93% 和 1.59%~7.66%。

表 3 尿液样品中帕托珠利的冷冻放置稳定性试验结果
Table 3 Result of cryopreservation stability experiment of ponazuril in urine sample n = 5

保存时间/d Preservation time	ρ (帕托珠利) _{起始} /(μg·mL ⁻¹) Initial ponazuril concentration	ρ (帕托珠利) _{实际} /(μg·mL ⁻¹) Actual ponazuril concentration						RSD/%
		1	2	3	4	5	$\bar{x}\pm S$	
0	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04±0.00	6.93
	1.00	0.99	1.00	0.97	1.00	0.99	0.99±0.01	1.48
	5.00	4.68	4.72	4.51	4.84	4.70	4.69±0.12	2.47
30	0.05	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04±0.00	2.61
	1.00	0.99	1.00	0.98	0.99	0.99	0.99±0.01	0.91
	5.00	4.71	4.77	4.54	4.87	4.72	4.72±0.12	2.48
60	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04±0.00	5.39
	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00±0.01	0.85
	5.00	4.70	4.77	4.53	4.86	4.70	4.71±0.12	2.51

表 4 粪便样品中帕托珠利的冷冻放置稳定性试验结果
Table 4 Result of cryopreservation stability experiment of ponazuril in feces sample n = 5

保存时间/d Preservation time	w (帕托珠利) _{起始} /(μg·g ⁻¹) Initial ponazuril concentration	w (帕托珠利) _{实际} /(μg·g ⁻¹) Actual ponazuril concentration						RSD/%
		1	2	3	4	5	$\bar{x}\pm S$	
0	0.25	0.21	0.24	0.22	0.22	0.22	0.22±0.01	6.29
	25.00	22.87	23.47	24.28	24.56	23.54	23.74±0.68	2.85
	100.00	93.50	89.04	97.27	99.24	95.00	94.81±3.89	4.11
30	0.25	0.21	0.22	0.23	0.21	0.23	0.22±0.01	3.44
	25.00	24.03	23.83	23.40	23.44	22.70	23.48±0.51	2.17
	100.00	94.23	87.96	94.32	84.57	94.84	91.18±4.65	5.10
60	0.25	0.21	0.22	0.23	0.24	0.21	0.23±0.01	4.94
	25.00	22.39	21.76	21.96	21.70	21.47	21.86±0.35	1.59
	100.00	97.38	97.03	83.50	83.98	94.73	91.33±7.00	7.66

2.5 实际样品测定

从表 5 可以看出，猪内服帕托珠利后，粪便中帕托珠利的排出高峰在给药后 1.0~1.5 d，平均排出量为 11.14 mg，在给药后 40.5 d 基本排出完毕；

尿液中帕托珠利的排出高峰在给药后 0.5~1.0 d，平均排出量为 0.033 mg，在给药后 12.5 d 基本排出完毕。由此可见，本方法适用于猪排泄物中帕托珠利的含量检测。

表 5 不同时间段粪便和尿液中帕托珠利的平均排出量¹⁾

采样时间/d Sampling time	粪便 Feces		尿液 Urine	
	平均排出量/mg	累积占比/%	平均排出量/mg	累积占比/%
	Average elimination amount	Accumulative ratio	Average elimination amount	Accumulative ratio
0~0.5	3.76±0.46	7.75	0.026±0.020	16.48
0.5~1.0	6.72±1.68	21.62	0.033±0.023	37.60
1.0~1.5	11.14±0.54	44.63	0.022±0.008	51.75
1.5~2.5	7.55±2.16	60.22	0.008±0.003	56.64
2.5~3.5	3.91±1.16	68.30	0.006±0.000	60.75
3.5~4.5	2.13±0.44	72.71	0.007±0.003	64.98
4.5~5.5	1.62±0.45	76.04	0.007±0.002	69.42
5.5~6.5	1.72±0.46	79.59	0.010±0.006	75.74
6.5~7.5	1.15±0.57	81.97	0.008±0.006	80.48
7.5~8.5	0.76±0.42	83.54	0.006±0.006	84.37
8.5~9.5	0.98±0.96	85.55	0.016±0.016	94.43
9.5~10.5	1.08±0.42	87.77	0.005±0.003	97.40
10.5~11.5	0.56±0.38	88.93	0.002±0.003	98.89
11.5~12.5	0.82±0.35	90.63	0.001±0.002	99.70
12.5~13.5	0.49±0.47	91.65	—	99.70
13.5~14.5	0.44±0.09	92.56	—	99.70
14.5~15.5	0.43±0.18	93.44	—	99.70
15.5~16.5	0.47±0.27	94.41	—	99.70
16.5~17.5	0.37±0.40	95.17	—	99.70
17.5~18.5	0.24±0.14	95.67	—	99.70
18.5~19.5	0.20±0.07	96.08	—	99.70
19.5~20.5	0.28±0.16	96.67	—	99.70
20.5~21.5	0.23±0.11	97.14	—	99.70
21.5~22.5	0.21±0.16	97.58	—	99.70
22.5~23.5	0.09±0.05	97.78	—	99.70
23.5~24.5	0.15±0.10	98.09	—	99.70
24.5~25.5	0.05±0.01	98.19	—	99.70
25.5~26.5	0.16±0.18	98.52	—	99.70
26.5~27.5	0.07±0.03	98.67	—	99.70
27.5~28.5	0.12±0.08	98.92	—	99.70
28.5~29.5	0.06±0.01	99.05	—	99.70
29.5~30.5	0.09±0.11	99.23	—	99.70
30.5~31.5	0.08±0.07	99.40	—	99.70
31.5~32.5	0.07±0.05	99.55	—	99.70
32.5~33.5	0.08±0.09	99.72	—	99.70
33.5~34.5	0.03±0.00	99.78	—	99.70
34.5~35.5	0.03±0.02	99.85	—	99.70
35.5~36.5	0.02±0.02	99.89	—	99.70
36.5~37.5	0.02±0.03	99.93	—	99.70
37.5~38.5	0.01±0.02	99.95	—	99.70
38.5~39.5	0.01±0.02	99.98	—	99.70
39.5~40.5	0.01±0.01	99.99	—	99.70
40.5~41.5	—	99.99	—	99.70

1)采样时间指给药后天数; “—” 表示未检出
1) Sampling time indicates days after administration; “—” represents not detectable

3 讨论与结论

3.1 色谱条件优化

三嗪类药物的分析测定多采用毛细管电泳法^[10]、HPLC-紫外检测法以及 LC/MS 法^[11-12]。本试验采用的 HPLC-光电二极管阵列 (Photo-diode array, PDA) 检测法相比于毛细管电泳法和 LC/MS 法, 具有更简便、稳定以及应用范围广的特点。流动相的选择参考相关文献 [4, 13-14], 水相多采用磷酸盐缓冲溶液以及不同配比的磷酸、甲酸或乙酸水溶液, 有机相则为乙腈或甲醇。对比发现乙腈对目标化合物的洗脱能力比甲醇更强且黏度较小, 在相同的流速下柱效更高, 柱压更低。采用磷酸二氢钾缓冲溶液与 0.1%(φ) 甲酸水溶液分别作为水相, 对比发现以磷酸二氢钾缓冲溶液为流动相时色谱峰更为尖锐且对称。另外, 采用相同流动相比例检测猪粪便和尿液中的帕托珠利时, 粪便样品色谱图中目标药物的保留时间处有杂质峰干扰, 优化流动相比例发现检测尿液和粪便样品中帕托珠利的磷酸二氢钾溶液和乙腈比例分别为 (55:45, V/V) 和 (56:44, V/V) 时, 保留时间适中, 干扰性杂质峰与主峰分离完全。

3.2 样品前处理方法优化

3.2.1 提取条件 帕托珠利属于弱极性物质, 易溶于乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷等有机溶剂, 略溶于甲醇, 几乎不溶于水^[15]。本试验分别考察了甲醇、乙酸乙酯、乙腈作为提取溶剂, 发现乙腈能更有效地沉淀蛋白。帕托珠利的酸度系数 (pKa) 约为 7.4^[16], 属于弱酸性物质, 理论上用酸化有机试剂提取弱酸性药物的效果优于有机试剂的提取效果。本试验分别考察了甲酸和乙酸酸化乙腈作为提取溶剂, 结果显示两者的提取效果均较好, 但考虑到甲酸挥发性较强, 且吸入危害较大, 因此最终选用 0.2%(φ) 乙酸酸化乙腈为提取溶剂。另外, 猪尿液中的水溶性物质较多, 而二氯甲烷不溶于水但能与乙腈互溶, 试验中利用二氯甲烷进行第 2 次提取后发现二氯甲烷能在充分提取尿液中帕托珠利的同时很好地去除干扰性杂质。

由于猪粪便和尿液中的基质差异较大, 同样的提取方法满足不了粪便样品的检测要求, 而固相萃取 (Solid phase extraction, SPE) 相对于液-液萃取 (Liquid-liquid extraction, LLE) 具有净化效果好、重现性好等优点^[17-19]。本试验利用 SPE 法有效净化提取了粪便样品中的药物。另外, 试验对比研究了乙酸乙酯、乙腈等提取溶剂, 发现乙酸乙酯和乙腈提

取效率均较高, 但乙酸乙酯的脂溶性太强, 复溶后溶液黏度较大且浑浊, 难以过柱, 影响后续净化, 而乙腈能有效沉淀蛋白, 亦能与水互溶, 能为后续利用 SPE 法净化样品提供方便。

3.2.2 净化条件 据查阅的文献资料 [20-22] 及帕托珠利的理化性质, 分别选用了混合型阴离子交换 (Mixed anion exchange, MAX) 和 HLB 小柱作为净化柱, 对比发现 MAX 小柱过柱程序较复杂, 样品前处理时间较长, 而 HLB 小柱的过柱方式较简便, 具有双亲性共聚物填料, 小柱干涸亦不影响净化结果, 能够使目标化合物的重复性较好, 回收率较高^[23]。考虑到淋洗液中乙腈与水的比例对回收率及净化效果的影响, 本研究分别考察了乙腈-水 (1:9、2:8、3:7、4:6, V/V) 作为淋洗液, 每个比例各 5 个平行样品, 对比发现乙腈体积占比为 10% 时回收率为 88.52%, RSD 为 3.24%; 乙腈体积占比为 20% 时, 回收率为 89.93%, RSD 为 4.09%; 乙腈体积占比为 30% 时, 回收率为 92.27%, RSD 为 2.52%; 乙腈体积占比为 40% 时, 回收率为 34.66%, RSD 为 3.56%。净化效果则随着乙腈体积占比的增加略有差异, 乙腈体积占比低于 30% 时, 杂质峰较多且响应值较高, 高于 30% 时回收率则会降低, 因此最终选用乙腈-水 (3:7, V/V) 作为淋洗液。

3.3 结论

本文建立了一种简单易操作、灵敏度高、精密度和重复性好的适用于检测猪排泄物中帕托珠利含量的 HPLC 法。粪便及尿液样品中帕托珠利的提取回收率均大于 89.50%, 批间和批内 RSD 均小于 8%, 同时在冷冻放置稳定性试验中帕托珠利的稳定性较好。该方法符合生物样品定量分析指导原则的要求, 可用于帕托珠利在猪排泄物中的含量测定及在猪体内的排出研究。

参考文献:

[1] 白成友, 范才良, 文红. 我国猪球虫病及其防制研究概述[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012(9): 6-7.
[2] MITCHELL M A. Ponazuril[J]. Journal of Exotic Pet Medicine, 2008, 17(3): 228-229.
[3] 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]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
[4] 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.
[5] The European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products, toltrazuril, summary report (1): EMEA/MRL/314/97-FINAL[R]. Amsterdam: European Medicines Agency, 1998.
[6] The European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products, toltrazuril (extension to pigs),

summary report (2): EMEA/MRL/620/99-FINAL[R]. Amsterdam: European Medicines Agency, 1999.

[7] 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.

[8] 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): 305-308.

[9] 沈佳晨, 霍浩远, 全家兴, 等. HPLC 法测定猪血浆中帕托珠利的方法学建立[J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(6): 9-13.

[10] 施祖灏, 陆俊贤, 葛庆联, 等. 高效毛细管电泳法同时检测地克珠利和妥曲珠利的含量[J]. *中国兽药杂志*, 2008, 42(9): 13-16.

[11] 施祖灏, 朱良强, 卢运站, 等. 鸡组织中地克珠利和妥曲珠利残留 HPLC 检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(1): 79-81.

[12] 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.

[13] 林仙军, 陆春波, 包爱情, 等. 高效液相色谱法测定鸡肌肉中地克珠利、妥曲珠利及其代谢物的残留量[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(3): 53-57.

[14] 杨海兰, 姚文旭, 李洒丽, 等. 帕托珠利和妥曲珠利在肉鸡体内残留消除的比较研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(3): 229-232.

[15] 宫小明, 杨丽君, 王洪涛, 等. 液相色谱-高分辨质谱测定动物源性食品中均三嗪类药物残留[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(28): 114-117.

[16] OLSEN J, BJÖRKLUND E, KROGH K A, et al. Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil and animal manure[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 755(22): 69-76.

[17] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器结合固相萃取法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 247-251.

[18] 赵莉, 谢显传, 占绣萍, 等. 高效液相色谱-荧光法同时检测蔬菜中阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和伊维菌素的多残留量[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(16): 3467-3472.

[19] 平华, 李杨, 李冰茹, 等. 基于分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定蔬菜中多种除草剂残留的方法[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(21): 4159-4169.

[20] 祁克宗, 施祖灏, 彭开松, 等. 基质固相分散萃取-高效液相色谱法检测鸡组织中均三嗪类药物残留[J]. *分析化学*, 2007, 35(11): 1601-1606.

[21] 范志影, 赵丙超, 刘庆生, 等. 液相色谱-质谱法测定饲料中的 3 种三嗪类抗球虫药[J]. *现代科学仪器*, 2016(5): 97-103.

[22] 杨迪, 宗听如, 刘杰, 等. 饲料中妥曲珠利高效液相色谱检测方法的建立[J]. *农业与生命科学版*, 2014, 35(4): 37-45.

[23] 万巧玲, 王良超, 江珊珊, 等. HLB 固相萃取小柱同时萃取水样中 10 种优先控制有机污染物[J]. *化学研究与应用*, 2018, 30(10): 1726-1732.

【责任编辑 李庆玲】