

高效液相色谱法测定血浆或组织中 吡嗪酮、氯霉素、噻乙醇及利血平的浓度

曾振灵 陈杖榴 董漓波

(兽医药理研究室)

摘要 本研究建立了测定吡嗪酮、氯霉素、噻乙醇及利血平浓度的反相高效液相色谱分析方法。以 ODS-C18 化学键合相 (5 μ m) 作为固定相, 乙酸萃取血浆中的吡嗪酮, 组织噻乙醇用乙酸乙酯-乙腈 (3:2, V/V) 抽提, 虾内氯霉素及组织利血平均用乙酸乙酯提取, 甲醇-水为流动相, 吡嗪酮、氯霉素、噻乙醇及利血平进行紫外检测的波长分别是 211、280、260 及 254nm, 最低检出浓度分别是 0.02 μ g/ml 血浆、0.02 μ g/g 虾肉、0.2 μ g/g 组织及 0.1 μ g/g 组织, 方法回收率分别是 98.07 \pm 3.24、90.12 \pm 4.71、71.23 \pm 5.49 及 92.14 \pm 5.68% (平均值 \pm 标准差)。这些方法简单、灵敏、专一, 已用于测定猪静注及内服吡嗪酮后的血浆药物浓度, 对虾饲喂“虾病宝 7 号”(含氯霉素) 后虾肉中氯霉素的残留, 鸡内服中毒剂量噻乙醇的组织浓度, 以及鸡内服利血平的组织浓度。

关键词 吡嗪酮; 氯霉素; 噻乙醇; 利血平; 高效液相色谱法

为了兽药使用的安全、合理、有效, 越来越要求了解和提供药物在畜禽的体内过程(吸收、分布、代谢、排泄)及组织残留情况。开展这些研究工作首先遇到和必须解决的问题是建立畜禽体内微量药物的分离、分析测定方法。高效液相色谱(HPLC)法具有专一、快速、分离效果良好及分析结果的精确性、准确性都较高等特点。因此, 许多物在畜禽体内(体液和组织)的微量浓度都可以用 HPLC 进行定量测定, 这对于兽药的临床应用、药物动力学、组织残留研究等工作具有实际意义。

本研究室近年来建立了多种检测体内血浆或组织药物浓度的 HPLC 法。其中已报道的有测定血浆丙硫咪唑及其两种代谢物的浓度^[1]和血浆噻孢霉素浓度的方法^[2]。本研究目的是利用紫外检测器, 探讨灵敏而简便的反相 HPLC 测定吡嗪酮、氯霉素、噻乙醇及利血平的浓度, 并用这些方法对猪内服及静注吡嗪酮的血浆浓度、对虾饲喂“虾病宝 7 号”(含氯霉素) 后虾肉中氯霉素的残留、鸡内服中毒剂量噻乙醇的组织浓度以及鸡内服利血平的组织浓度进行定量测定。

1 实验与结果

1.1 仪器与试剂

美国 Beckman-344 型高效液相色谱仪, 165 型可变双波长检测器, Kipp & Zonen BD 41 型记录仪, THZ-84 型台式恒温振荡器, 上海跃进医疗器械厂生产; XW-80 型旋涡混合器, 上海第一医学院仪器厂制造; 800 型离心沉淀器, 上海手术器械厂产品; JC-3 型超声处理

机,通化市超声设备厂出品。

吡嗪酮粉(批号 871115)及 5%吡嗪酮注射液(批号 861014)均为上海第六制药厂生产;“虾病宝 7 号”为广州白云山兽药厂产品,唑乙醇粉(批号 890603)为广东京南兽药厂生产;利血平从日本进口。吡嗪酮对照品(批号 046—8601)由中国药品生物制品检定所提供;氯霉素标准品(批号 890322)、唑乙醇对照品(批号 881)均由中国兽药监察所提供;利血平对照品为利血平的干燥品。甲醇、乙醚、乙酸乙酯、乙腈、氢氧化钠、无水硫酸钠、硫酸铵及磷酸二氢钾等试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

Altex Ultrasphere 不锈钢色谱柱,柱长 25 cm(吡嗪酮的测定用 15 cm 的柱),内径 4.6 mm,固定相为 ODS—C18 化学键合相(5 μm)。其他条件见表 1。

表 1 四种药物的 HPLC 检测条件

条 件	吡嗪酮	氯霉素	唑乙醇	利血平
紫外检测波长 (nm)	211	280	260	254
流动相 (V/V)	甲醇/水 (80/20)	甲醇/水 (50/50)	甲醇/水 (15/85)	甲醇/冰乙酸/水 (300/40/5)
流速 (ml/min)	0.8	1.0	1.0	1.0
记录仪纸速 (mm/min)	5	5	2	2
柱 温	室温	室温	室温	室温
标准液色谱峰保留时间 (min)	3.2	5.3	7.8	22.1
内 标	无	磺胺二甲嘧啶**	无	无

* 见图 1

** 色谱峰保留时间为 3.3 min

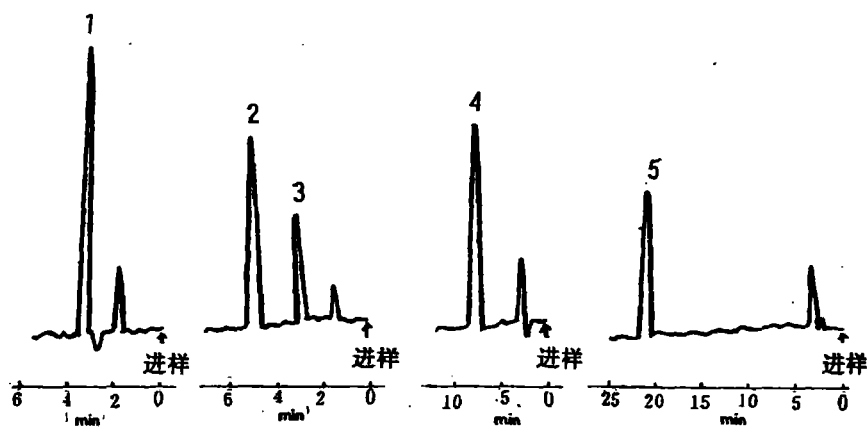


图 1 四种药物的高效液相色谱图

(1. 吡嗪酮; 2. 氯霉素; 3. 内标(磺胺二甲嘧啶); 4. 唑乙醇; 5. 利血平)

1.3 萃取四种药物的方法

1.3.1 血浆中吡嗪酮的萃取 参考徐佩佩等^[4]的方法作适当修改。取 2 μm 血浆置于 15 ml 具塞试管内,加 1 mol/L NaOH 溶液 2 滴,无水 Na₂SO₄ 结晶少许,充分振摇,加乙醚 5 ml,台式振荡器上振荡 20 min,分离乙醚层。共提取 2 次。提取乙醚液在 40~60℃ 氮气吹干,于残渣中加入 100 μl 甲醇溶解,旋涡混合器上混合 2 min,进样 10 μl 作 HPLC 分析。

1.3.2 虾肉中氯霉素的提取 取剥壳虾肉 100 g, 加入等量蒸馏水, 捣碎机搅成匀浆。称取匀浆 4 g (含虾肉 2 g) 置 15 ml 具塞试管内, 加入内标磺胺二甲嘧啶 10 μ l (4 μ g), 混合均匀, 静置 10 min。加乙酸乙酯 5 ml, 滴入 1 mol/L NaOH 1 滴, 振荡 20 min, 离心 20 min (4000 r/min), 分离上清液至另一有盖试管。重复提取一次。提取液加入适量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 振荡 15 min, 离心 15 min, 分离乙酸乙酯层, 用 N_2 流在 60~80 $^\circ\text{C}$ 砂浴上吹干, -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测。测定时间用 100 μ l 甲醇溶解后, 10 μ l 注 HPLC 进行检测。

1.3.3 组织中噻乙醇的萃取 参考朱柱振等^[2]的方法作适当修改。取 1.0 g 组织 (肝、肾、肌肉、肌胃、脂肪) 置于一玻璃瓶内, 加入 4.0 ml 1 mol/L KH_2PO_4 溶液, 用超声处理机打成匀浆, 称取 2.5 g 匀浆 (相当于组织 0.5 g) 于 15 ml 螺口试管中, 加 1 ml 饱和硫酸溶液, 台式振荡器上振荡 10 min, 离心 15 min (4000 r/min)。将上清液吸至 15 ml 螺口试管中, 加入提取液 (乙腈: 乙酸乙酯=3:2, V/V) 5 ml, 振荡 20 min, 离心 10 min, 吸出有机相于另一 15 ml 螺口试管中, 余液重复提取一次, 合并有机相, 加入 0.2 mol/L NaOH 溶液 1 ml, 振荡 10 min, 静置 10 min, 吸出有机相于离心管中, 在 60~80 $^\circ\text{C}$ 砂浴上, 氮气流吹干, -20 $^\circ\text{C}$ 保存直至测定。测定时用 100 μ l 甲醇溶解后, 10 μ l 注 HPLC 进行检测。

1.3.4 组织中利血平的萃取 取 1.0 g 组织 (肝、肾、肌肉) 置于 1 小玻璃瓶内, 加入 4.0 ml 磷酸盐缓冲液 (pH7.4), 用超声处理机打成匀浆, 称取 2.5 g 匀浆 (相当于组织 0.5 g) 于 15 ml 具塞试管内, 加乙酸乙酯 5 ml, 振荡 20 min 后取出, 离心 10 min (4000 r/min)。吸乙酸乙酯层置于另一试管, 再加 5 ml 乙酸乙酯于第一支试管, 重复提取一次, 吸出乙酸乙酯层, 与原来的乙酸乙酯合并。在 60~80 $^\circ\text{C}$ 砂浴上氮气流缓慢蒸发乙酸乙酯, 使体积大约为 1.5 ml, 转移到 5 ml 的离心管内。原来的试管用 2 ml 乙酸乙酯冲洗, 冲洗液加到离心管内, 用氮气流将乙酸乙酯吹干。离心管内的残留物用 100 μ l 流动相重新溶解, 旋涡混合器上混合 2 min, 吸取 10 μ l 作 HPLC 分析。

1.4 标准曲线的制备

1.4.1 血浆吡嗪酮标准曲线的制备 以猪空白血浆稀释吡嗪酮对照品为 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度, 按“1.3.1”抽提药物, 作 HPLC 分析。将吡嗪酮的色谱峰高与浓度作直线回归, 制备标准曲线 ($r=0.9999$)。检出限为 4.0 ng, 最低检出血药浓度为 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.4.2 虾肉氯霉素标准曲线的制备 以空白虾肉匀浆稀释氯霉素标准品为 10, 2, 1, 0.4, 0.2, 0.1, 0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿虾肉的浓度, 按“1.3.2”萃取氯霉素, 作 HPLC 分析, 将氯霉素的色谱峰面积与内标峰面积之比与浓度作直线回归, 制备标准曲线 ($r=0.9989$)。检出限为 4.0 ng, 最低检出浓度为 0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿虾肉。

1.4.3 组织噻乙醇标准曲线的制备 以空白组织匀浆 (肝、肾、肌肉、肌胃及脂肪) 稀释噻乙醇对照品为 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿组织的浓度, 按“1.3.3”萃取噻乙醇, 作 HPLC 分析, 将噻乙醇的色谱峰高与浓度作直线回归, 制备标准曲线 ($r=0.9961\sim 0.9987$)。检出限为 10.0 ng, 最低检出浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿组织。

1.4.4 组织利血平标准曲线的制备 以空白组织匀浆 (肝、肾、肌肉) 稀释利血平对照品为 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿组织的浓度, 按“1.3.4”萃胜利血平, 作 HPLC 分析。将利血平的色谱峰高与浓度作直线回归, 制备标准曲线 ($r=0.9976\sim 0.9992$)。检出限为 5.0 ng, 最低检出浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 湿组织。

1.5 四种药物的回收率测定 计算公式为

药物萃取后残留物 HPLC 峰高/溶于甲醇或流动相的药物峰高 $\times 100\%$

1.5.1 吡嗪酮的回收率 按“1.4.1”制备血浆吡嗪酮的系列浓度,并作 HPLC 分析。同时还将吡嗪酮对照品直接溶解在甲醇内,使浓度为 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 及 51.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 进样 10 μl 作 HPLC 分析。吡嗪酮的回收率是 $98.07 \pm 3.24\%$ (平均值 \pm 标准差)。

1.5.2 氯霉素的回收率 按“1.4.2”制备虾肉氯霉素的系列浓度,并作 HPLC 分析。同时还将氯霉素标准品直接溶解在甲醇内,使浓度为 200, 40, 20, 8, 4, 2, 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 进样 10 μl 作 HPLC 分析。氯霉素的回收率为 $90.12 \pm 4.71\%$ 。

1.5.3 噻乙醇的回收率 按“1.4.3”制备组织噻乙醇的系列浓度,并作 HPLC 分析。同时还将噻乙醇对照品直接溶解在甲醇内,使浓度为 32, 16, 8, 4, 2, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 进样 10 μl 作 HPLC 分析。噻乙醇的回收率为 $71.23 \pm 5.49\%$ 。

1.5.4 利血平的回收率 按“1.4.4”制备组织利血平的系列浓度,并作 HPLC 分析。同时还将利血平的对照品直接溶解在甲醇内,使浓度为 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 进样 10 μl 作 HPLC 分析。利血平的回收率为 $92.14 \pm 5.68\%$ 。

2 应用与讨论

上述四种药物的高效液相色谱测定法,具有许多相似之处。都是采用反相 ODS—C18 柱、紫外检测器,流动相为甲醇—水,以有机溶剂提取药物,具有方法简单、灵敏、专一的特点。经过一系列的应用测定,表明这些方法是可行的。

与有关文献比较^[4,5,7,10],作者建立的测定吡嗪酮血药浓度的 HPLC 法具有一定特点:1. 用紫外检测器代替荧光检测器进行检测;2. 灵敏度较高,检出限达到 4.0 ng,最低检出血浆药物浓度 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$;3. 将吡嗪酮对照品及试药分别溶解在甲醇进行紫外扫描,测得吡嗪酮的最大吸收峰是在 211 nm 处,故选择 UV—211nm 作为检测波长;4. 在流动相的选择上,以价廉易得的甲醇取代国内外常用的乙腈、四氢呋喃、乙酸乙酯、正丁醇-氯仿-乙酸乙酯—10%氨水等,既保证了满意的色谱分离效果,又节省了分析费用。本法已应用于测定猪静脉注射及内服吡嗪酮后的血浆药物浓度。结果表明,猪内服吡嗪酮后原药的血浆药物浓度很低,极显著低于静脉注射后的血浆药物浓度。人与其他动物内服吡嗪酮后亦发现相似的结果^[1,4,6,7,16]。

要测出微量氯霉素,必须具有一个灵敏而专一的方法。常采用的有微生物法^[15]、比色法^[12]、放射免疫测定法^[11]、气相色谱法^[13]及高效液相色谱法^[10,14]等。微生物法及比色法由于专一性差、灵敏度低的原因,目前已较少应用。放射免疫测定法在样品低浓度时专一性较差,操作较麻烦。气相色谱法样品预处理比较复杂,分析前须进行衍生化。而高效液相色谱法具有快速、灵敏、专一的优点。虾肉中氯霉素的高效液相色谱测定法国内外文献未见报道,作者建立的本法灵敏度较高,最低检出浓度可达 0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ 虾肉,同时采用内标,结果准确,完全可以达到虾肉中氯霉素的微量残留测定。已用本法测定了对虾饲喂“虾病宝 7 号”(含氯霉素)后虾肉中氯霉素的残留。结果表明,对虾连续饲喂“虾病宝 7 号”10 天后,虾肉中氯霉素的残留量为 0.08 $\mu\text{g}/\text{g}$,而停喂“虾病宝 7 号”24 小时后,虾肉中残留的氯霉素已在检测限以下 ($< 0.02 \mu\text{g}/\text{g}$ 虾肉)。

噻乙醇在猪体组织的 HPLC 测定法已有报道^[17]。但本法的色谱条件作了较大的改动,使组织中噻乙醇能与杂质峰较好分离,又不影响测定。并把组织药物萃取液由乙腈-乙酸乙酯

混合液代替乙腈,能有效地提高回收率。已用本法进行了下述测定:1.鸡多剂量内服给药后(30 mg/kg,每天2次,连用3天)噻乙醇在肝、肾、肌肉及脂肪的组织浓度;2.内服中毒剂量(120 mg/kg)的噻乙醇在鸡肝、肾、肌肉、肌胃和脂肪的浓度;3.鸡噻乙醇中毒的诊断;4.鸡、鸭饲料中噻乙醇的含量;5.噻乙醇预混剂中噻乙醇的含量。

组织中利血平的HPLC测定法国内尚未见报道。利血平在兽医临床主要用作禽的抗应激添加剂^[9]。作者建立本法,主要是为了初步了解利血平在鸡体组织的残留情况。按3 mg/kg的剂量连续内服利血平(每天一次,连用3天),最后一次用药后2,4,8,12,16,24,32,40 h剖杀鸡,取出肝、肾、肌肉三种组织,测定组织中利血平的含量。结果表明,最后一次给药后16 h组织中已测不到利血平($<0.1 \mu\text{g/g}$ 组织)。作为测定组织药物残留方法来说,本法灵敏度不是很理想,最低检出浓度为 $0.1 \mu\text{g/g}$ 组织,而且利血平色谱峰的保留时间太长。因此,利血平的HPLC测定条件仍有必要进一步完善或改进。

致谢 本文承蒙冯洪辉教授审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典二部 临床用药须知(1980年). 北京: 中国医药科技出版社, 1990. 489~490
- 2 朱柱振等. 噻乙醇在鸡体内的药动学和组织浓度研究. 畜牧兽医学报, 1993, 24 (2)
- 3 陈杖榴等. 噻孢霉素钠在猪体内的代谢动力学分析. 华南农业大学学报, 1986, 7 (4): 1~4
- 4 徐佩佩等. 高效液相法测定家兔用吡嗪酮后的血药浓度及药代动力学参数. 药学学报, 1983, 18 (6): 401~405
- 5 徐佩佩等. 吡嗪酮血药浓度高效液相色谱测定方法的改进. 中国临床药理学杂志, 1985, 1 (3): 216~219
- 6 黄一心等. 高效抗虫新药—吡嗪酮. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 8~59
- 7 程大敦等. 反相高效液相法测定吡嗪酮血药浓度的方法学研究. 现代应用药学, 1988, 5 (4): 5~7
- 8 曾深灵等. 反相高效液相色谱法测定血浆中丙硫咪唑及其两种代谢产物的浓度. 药物分析杂志, 1990, 10 (4): 202~205
- 9 董清波编. 家禽常用药物手册. 北京: 金盾出版社, 1989. 150~151
- 10 Edward H A. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk: eggs and tissues from food-producing animals. J Assoc Off Anal Chem. 1985. 68 (5): 990~999
- 11 Campbell G S. et al. Radioimmunoassay of chloramphenicol residues in muscle, milk and eggs. Antimicrob Agen Chem. 1984. 25: 205~209
- 12 Pilloud M. Pharmacokinetics, plasma protein binding and dosage of chloramphenicol in cattle and horses. Res Vet Sci. 1973. 15 (2): 231~238
- 13 Resnick G L. et al. Determination of serum chloramphenicol utilizing gas-liquid chromatography and electron capture spectrometry. Anal Chem. 1966. 38 (4): 582~585
- 14 Robert L T. et al. High-performance liquid chromatographic assay for chloramphenicol in biological fluids. Clin Chem. 1978. 24: 778~781
- 15 Sobath L D. et al. Measurement of three antibiotics (penicillin; cephalothin and chloramphenicol) when present together in mixtures. Appl Microbiol. 1968. 16 (4): 877~881
- 16 Steiner K. et al. The fate of praziquantel in the organism. I. pharmacokinetics in animals. Eur J Drug Metab Pharmacok. 1976. 1 (2): 85~95
- 17 Tomoko Nagata, et al. Determination of olaquinox residues in swine tissues by liquid chromatography. J Assoc

Off Anal Chem, 1987, 70 (4): 706~707

18 Xiao S H, et al. Quantitative determination of praziquantel in serum by HPLC. J Chromatogr Biomed Appl, 1983, 275 (1): 127~132

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC (HPLC) DETERMINATION OF PRAZIQUANTEL, CHLORAMPHENICOL, OLAQUINDOX AND RESERPINE IN PLASMA OR TISSUES

Zeng Zenling Chen Zhangliu Dong Libo

(Department of Veterinary Medicine)

Abstract The simple and sensitive reversed-phase high performance liquid chromatographic methods were described for the quantitative determination of praziquantel, chloramphenicol, olaquinodox and reserpine in plasma or tissues. A reversed-phase ODS-C18 (5 μ m) column fitted with a UV detector was used for analysis of the four drugs. The wavelengths of detector which was used for the determination of praziquantel, chloramphenicol, olaquinodox and reserpine were 211, 280, 260 and 254nm, respectively. Praziquantel in plasma was extracted with ether. Olaquinodox in tissues (liver, kidney, muscle, gizzard and fat) was extracted with ethyl acetate-acetonitrile (3:2, V/V). Chloramphenicol in prawn meat and reserpine in tissues (liver, kidney and muscle) were extracted with ethyl acetate. The mobile phases were different ratio of methanol-water. Assay linearity was demonstrated in the range of 0.02~2.56 μ g praziquantel/ml of plasma ($r=0.9999$), 0.02~10 μ g chloramphenicol/g of prawn meat ($r=0.9989$), 0.2~6.4 μ g olaquinodox/g of five tissues ($r=0.9961\sim0.9987$), and 0.1~6.4 μ g reserpine/g of three tissues ($r=0.9976\sim0.9992$). The minimum detectable limits of praziquantel, chloramphenicol, olaquinodox and reserpine were 4.0, 4.0, 10.0 and 5.0 ng, respectively. Praziquantel was detectable in 2 ml of plasma to a limit of 0.02 μ g/ml. Chloramphenicol was detectable in 2 g of prawn meat to a limit of 0.02 μ g/g. Olaquinodox was detectable in 0.5 g of each tissue to a limit of 0.2 μ g/g. Reserpine was detectable in 0.5 g of each tissue to a limit of 0.1 μ g/g. The drug recoveries of the extracted procedure of Praziquantel, chloramphenicol, olaquinodox and reserpine were 98.07 ± 3.24 , 90.12 ± 4.71 , 71.23 ± 5.49 and $92.14\pm 5.68\%$ (Mean \pm SD), respectively. These methods were used to determine the plasma level of praziquantel in pigs after oral and intravenous administration, residues of chloramphenicol in prawn meat after "Xia-bing-Bao No 7" was orally administered to prawn, the five tissue concentrations of olaquinodox in chickens following oral single administration of toxic dosage and multiple oral administration of treatment dosage of the drug, and the three tissue concentrations of reserpine in chickens after multiple oral administration.

Key words Praziquantel; Chloramphenicol; Olaquinodox; Reserpine; HPLC; Plasma or tissue concentration