

# HPLC法检测水牛血浆中吡喹酮的研究

孙 雨<sup>1</sup>, 范育松<sup>2</sup>, 范建华<sup>3</sup>, 王柄樟<sup>1</sup>, 卜仕金<sup>1</sup>

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 安徽省巢湖市居巢区散兵镇人民政府, 安徽巢湖 238052;

3. 中国农业科学院家禽研究所, 江苏扬州 225009)

[收稿日期] 2009 - 06 - 06 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280(2010)03 - 0009 - 04 [中图分类号] S859. 83

**[摘要]** 建立了一种简便、灵敏、可重复的高效液相色谱法检测水牛血浆中吡喹酮 (Praziquantel, PZQ) 的含量。吡喹酮在  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.0 mm, 5  $\mu$ m) 柱中可以很好地与杂质峰分离开。其保留时间、紫外检测波长、流动相、流速、色谱柱温度分别为 10.6 min, 220 nm, 甲醇-水 (70:30, V/V)、0.8 mL/min 和 40  $^{\circ}$ C。水牛血浆样品 (0.5 mL) 经乙酸乙酯 (6 mL) 两步提取后, 采用旋转蒸发器蒸干, 1 mL 流动相溶解定容, 取上清滤液 20  $\mu$ L 进样做 HPLC 分析。吡喹酮的血浆药物浓度在 0.0625 ~ 8 mg/L 范围内, 呈现良好的线性关系, 相关系数  $r > 0.999$ 。在 0.0625、1、16 mg/L 的 3 个药物浓度水平下, 吡喹酮的平均回收率均在 90% 以上。日内和日间变异系数小于 5%。PZQ 的 LOD 可达 0.01 mg/L, LOQ 为 0.03 mg/L。该方法的专属性强、灵敏度高, 适用于水牛血浆中 PZQ 的药动学检测。

**[关键词]** 吡喹酮; 高效液相色谱; 水牛

## A High - performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Praziquantel in Water Buffalo Plasma

SUN Yu<sup>1</sup>, FAN Yu - song<sup>2</sup>, FAN Jian - hua<sup>3</sup>, WANG Bing - zhang<sup>1</sup>, BU Shi - jin<sup>1</sup>

(1. Veterinary Medicine of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009; 2. People's Government of Juchao District Sanbing Town,

Chaohu, Anhui 238052; 3. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou, Jiangsu 225009; China)

**Abstract:** A simple, sensitive and reproducible method based on a reversed - phase chromatography was developed for the determination of praziquantel in water buffalo plasma. Praziquantel was separated from the impurities on a  $C_{18}$  column (250 mm  $\times$  4.0 mm, 5  $\mu$ m), with retention times of 10.6 min. Ultraviolet detection was set at 220 nm. The mobile phase consisted of methanol and distilled water (70:30, V/V), running through the column at a flow rate of 0.8 mL/min. The chromatographic analysis was operated at 40  $^{\circ}$ C. Sample preparation (0.5 mL plasma) was done by a single step liquid - liquid extraction with ethyl acetate. Calibration curves in plasma at the concentrations (0.0625 ~ 8 mg/L) were all linear with correlation coefficients higher than 0.999. At the fortified levels of 0.0625, 1, 16 mg/L, the mean recoveries of PZQ ranged from 90% to 120%. The precision of the method based on within - day repeatability and reproducibility (day - to - day variation) was below 5%. Limit of detection (LOD) was 0.01 mg/L. LOQ was 0.03 mg/L. The method was applicable to pharmacokinetics detection of PZQ in water buffalo plasma.

**Key words:** praziquantel; HPLC; water buffalo

基金项目: 中国农业科学院上海兽医研究所资助项目

作者简介: 孙 雨 (1983年 - ), 硕士研究生, 主要从事兽医药理学方面研究。E - mail: sy19830908@163.com

通讯作者: 卜仕金。

吡喹酮 (Praziquantel, PZQ)系吡嗪并异喹啉化合物,20世纪70年代初即用以驱除绦虫,继而又发现其具有很好的抗血吸虫作用,并于20世纪70年代末试用于临床治疗血吸虫病<sup>[1-4]</sup>。吡喹酮是目前治疗家畜血吸虫病的首选药物,也是大面积防治血吸虫病的主要药物。目前国内市场上批准使用的吡喹酮制剂是吡喹酮片剂,鉴于吡喹酮口服途径给药存在明显的肝脏首过效应,临床使用不方便,以及静脉注射给药又具有较强毒副反应等缺点<sup>[2]</sup>,所以研制吡喹酮新制剂,提高其生物利用度具有十分重要意义。20%吡喹酮注射液是上海兽医寄生虫研究所研制的一种吡喹酮新制剂,拟用于动物寄生虫病的防治。受研究单位的委托,本实验开展了该注射剂在水牛体内的药代动力学研究,目的是提供数据以阐明该吡喹酮注射液在健康成年水牛体内的血药浓度-时间曲线,为将来进一步评价其临床药效提供依据。

关于PZQ的代谢动力学研究,已经有人、家鼠、家兔、绒山羊以及黄牛体内药代动力学的研究,在水牛体内的药代动力学研究尚未见报道。在以往的文献中,关于在血浆中提取吡喹酮的过程比较繁琐,本实验目的在于简化提取血浆中吡喹酮的方法,并且提高其回收率和改善提取的精密度,并为进一步研究吡喹酮在水牛体内的药代动力学打下基础。

## 1 材料与方 法

1.1 试药与试剂 吡喹酮标准品,含量99.1%,购自德国Dr Ehrenstorfer公司,批号80821;受试药物为吡喹酮注射剂,含量20%,批号20080416,由上海兽医研究所提供;甲醇、乙酸乙酯,均为HPLC级,天津科密欧化学试剂厂;水为自制超纯水。

1.2 实验动物 江苏江都地区成年健康水牛4头,平均体重(420±30)kg,经过7d观察并进行临床观察,均为健康水牛,无用药史,编号,给药前禁食12h,自由饮水,给药2h后自由采食,按10mg/kg的给药量肌注给药。

1.3 主要仪器 SHMADZU高效液相色谱仪,配LC-10ATVP泵、SPD-10ATVP紫外检测器;HW-2000型色谱工作站2.10版,千谱软件公司;BP110S电子分析天平,德国赛多利斯天平公司;RE-52型旋转蒸发仪,上海青浦沪西仪器厂;KQ-250B型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.4 标准工作液的配制 准确称取吡喹酮标准品160mg,置于100mL棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,即为1600μg/mL吡喹酮标准工作液。

1.5 色谱条件 Phenomenix™ TM VP-ODS C<sub>18</sub> (5.0μm, 250mm×4.0mm)色谱柱;流动相为甲醇-水=70:30(V/V);检测波长220nm;柱温40℃;流速0.8mL/min;进样量20μL;紫外检测灵敏度0.020AUFS。

1.6 水牛血浆样品的预处理 试验动物在给药前采血记为0h,分别在肌注给药后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24h,通过颈静脉插管采血,每次采集血样约5mL。血样用肝素抗凝,3000r/min离心10min,分离血浆。血浆样品置于-20℃冰箱保存。将采集后保存的血浆样品经自然(室温)解冻后,准确吸取0.5mL于10mL刻度离心管,加入3mL乙酸乙酯去蛋白,旋涡振荡5min后5000r/min离心10min,吸取上清液于25mL鸡心瓶中。在离心管中加入3mL乙酸乙酯,重复去蛋白一次,合并上清液,45℃旋转蒸干后,用1mL流动相溶解,涡旋2min,转入1.5mL指形管,16000r/min高速离心15min,上清液经0.45μm滤头过滤,用于HPLC分析。

1.7 标准曲线的绘制 用水牛空白血浆配制吡喹酮溶液,使其药物质量浓度为8.4、2.1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03mg/L。按1.6项下的血浆样品预处理方法进行处理后,进样做HPLC分析。以血浆药物浓度水平为因变量,各浓度水平的平均峰面积为自变量,做线性回归,得出标准曲线的回归方程和相关系数,并绘制标准曲线。每个浓度重复5次。

1.8 数据处理 水牛肌注给药后的实测血浆药物浓度-时间数据,采用3P97药代动力学软件简化系统计算程序,使用微机自动进行处理。

### 1.9 实验方法验证

1.9.1 回收率测定 加入一定浓度的吡喹酮标准工作液于水牛血浆中,制得吡喹酮浓度为0.0625、1、16mg/L的系列浓度,经1.6项下的方法处理后,取上清滤液20μL进样做HPLC分析。再用对应浓度的吡喹酮标准液(0.03125、0.5、8mg/L)做HPLC分析,用下面公式计算各浓度的添加回收率。每一浓度做5次重复。回收率的计算公式为:回收率=A/AS×100%。式中A为样品溶液中吡喹酮的峰面积,AS为相应标准液中吡喹酮的峰面积。

1.9.2 精密度测定 制得水牛血浆中低、中、高吡

喹酮浓度分别为 0.062 5、1、16 mg/L, 经 1.6 项下的方法处理后, 求出日间及日内变异系数。

1.9.3 最低检测限的确定 取信噪比 3 时的浓度为最低检测限, 最低定量限根据标准曲线确定 (S/N 一般要 10)。

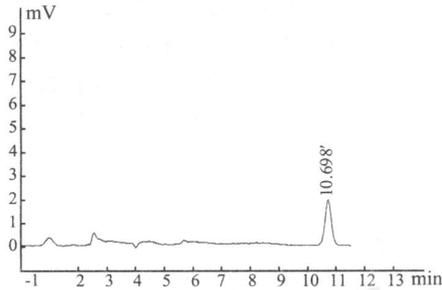


图1 吡嗪酮标准样(1 mg/L)

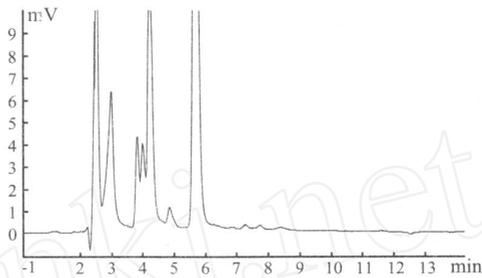


图2 空白血浆

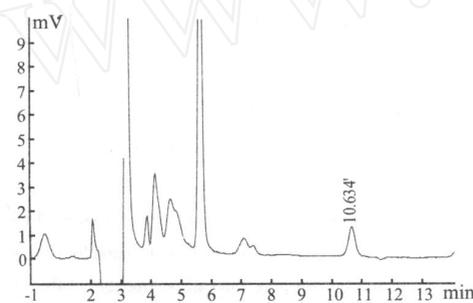


图3 空白血浆 + PZQ(0.5 mg/L)

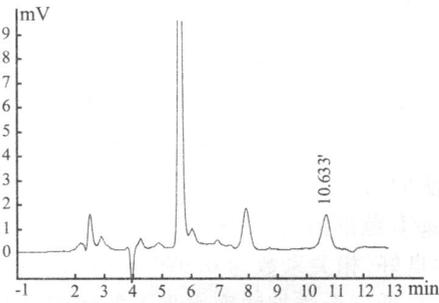


图4 肌注给药 0.5 h 后的血浆

## 2.2 检测限、定量限及线性关系

2.2.1 检测限 吡嗪酮在水牛血浆中的最低检测限浓度为 0.01 mg/L, 最低定量限为 0.03 mg/L。

2.2.2 线性关系 相对标准曲线方程为:  $Y = 13705X - 169.8$ , 线性范围为 0.062 5 ~ 8 mg/L, 式中  $Y$  为峰面积值,  $X$  为所测血药浓度,  $r = 0.9999$ , 说明变异系数小, 线性关系较好。标准曲线如图 5 所示。

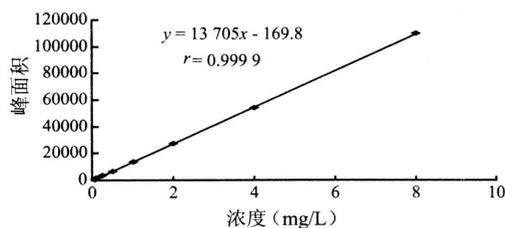


图5 空白血浆不同吡嗪酮添加浓度标准曲线

2.3 肌注药物的药动学特征 血药浓度时间数据采用中国药理学学会数学专业委员会编制的 3P97 药

## 2 结果

2.1 分离效果 由空白血浆、吡嗪酮溶液、吡嗪酮血浆样品的色谱峰的分离图谱可知, 吡嗪酮的色谱峰分离效果良好, 空白血清及其他杂质对其无影响, 保留时间为  $(10.6 \pm 0.2)$  min (图 1 ~ 图 4)。

代动力学程序拟合符合一级吸收一室开放模型, 即血药浓度和时间关系可用下列方程式表达。  $C = A(e^{-K_e T} - e^{-K_a T})$ , 式中  $C$  为血药浓度,  $T$  为时间,  $K_e$  为消除速率常数,  $K_a$  为吸收速率常数。

2.4 肌注吡嗪酮的平均药时曲线 结果如图 6 所示。

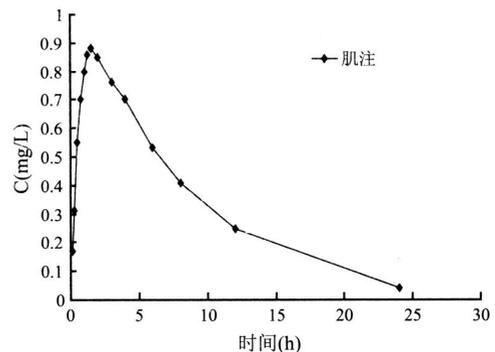


图6 水牛肌注 PZQ 后药时曲线

2.5 水牛血浆中吡嗪酮测定方法回收率 结果如表 1 所示。

表 1 血浆中吡喹酮提取回收率

添加浓度 (mg/L)	回收率					$\bar{x} \pm SD$	CV (%)	
	1	2	3	4	5			
0.0625	98.11	97.79	93.10	93.70	94.69	95.48	$\pm 2.33$	2.44
1	93.28	93.57	97.22	91.29	94.25	93.92	$\pm 2.15$	2.29
16	93.33	92.21	93.51	90.12	93.50	92.53	$\pm 1.46$	1.58

2.6 血浆中吡喹酮测定方法精密度 结果如表 2 所示。

表 2 血浆样品精密度测定 ( $n=5$ )

变异系数	添加浓度 (mg/L)	实测浓度 (mg/L)					CV (%)
		1	2	3	4	5	
日内变异系数	0.0625	0.059	0.062	0.065	0.060	0.061	1.64
	1	0.928	0.900	0.937	0.915	0.922	1.52
	16	14.900	15.031	14.905	15.110	14.891	0.65
日间变异系数	0.0625	0.059	0.061	0.058	0.060	0.061	1.67
	1	0.889	0.950	0.953	0.925	0.933	2.80
	16	15.140	14.900	15.049	15.133	14.823	0.95

### 3 讨论

在本研究建立的检测条件下,生物样品中的杂质峰干扰少,溶剂峰与药物峰能达到良好分离。实验采用乙酸乙酯去蛋白效果好,样品预处理过程简单易可靠,方法回收率高。血浆样品中药物浓度在 0.03~16 mg/L 范围内,药物浓度与检测器响应值之间相关性良好,相关系数为 0.999 9。血浆中吡喹酮在高、中、低三个添加浓度水平下的回收率均在 90%以上,日内和日间变异系数分别为小于 2%和 5%。本实验建立的血浆吡喹酮检测方法,最低检测限 (LOD)和定量限 (LOQ)分别为 0.01、0.03 mg/L,符合药物动力学及药物定量分析对 LOQ 的要求。

目前在国外已有 Heiko 等使用毛细管电泳-质谱联用的方法对人及动物体内的 PZQ 代谢物进行了定性分析<sup>[5]</sup>。在药动学方面,国外对 PZQ 在人体内的代谢研究较多,例如 Ghoneim 等使用电化学方法对人血浆中的 PZQ 进行了分析<sup>[6-7]</sup>; Wanee 等利用 HPLC 法对 PZQ 在人体内的药动学分布进行了研究<sup>[8]</sup>;但使用 HPLC 方法对反刍动物肌注 PZQ 后药物在体内分布的研究并不多。在国内已有使用 HPLC 方法测定黄牛及绒山羊体内的 PZQ 的药动学及生物利用度的报道<sup>[9-10]</sup>。但国内

外尚无利用 HPLC 法检测 PZQ 在水牛体内的药动学及生物利用度的报道。目前国内已有扬州大学兽医学院药理实验室对 PZQ 在水牛体内的药动学分析及生物利用度进行了研究(待发表)。该实验建立了运用高效液相色谱仪测定水牛血浆中吡喹酮的方法,并且验证了该方法的可行性,为下一步继续研究 PZQ 在水牛体内的药动学分析及生物利用度打下了一个良好的基础。关于 PZQ 在水牛体内的药动学及其生物利用度分析的研究还有待于进一步探索。

### 参考文献:

- [1] 沈建忠. 兽医药理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 196 - 197.
- [2] 操继越, 刘恩勇, 赵俊龙, 等. 黄牛静注、肌注和内服吡喹酮的药动学与生物利用度 [J]. 中国兽医学报, 2001, 11(6): 612 - 614.
- [3] 闫继业. 畜禽药物手册 [M]. 北京: 金盾出版社, 1997: 191 - 192.
- [4] 肖树华. 吡喹酮抗血吸虫作用的研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 12(6): 492 - 502.
- [5] Heiko Meier, Gottfried Blaschke. Capillary Electrophoresis - mass Spectrometry, Liquid Chromatography - mass Spectrometry and Nano-electrospray - mass Spectrometry of Praziquantel Metabolites [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 748: 221 - 231.
- [6] Ghoneim M M, Mabrouk M M, Tawfik A. Direct Determination of Praziquantel in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma by Cathodic Adsorptive Stripping Differential - pulse Voltammetry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 7: 1311 - 1318.
- [7] Patzschke K, Putter J, Weqner L A, et al. A high - performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Praziquantel in Plasma [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 1979, 4: 149 - 155.
- [8] Wanee, Ridditid W, Wongnawa M, et al. A High - performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Praziquantel in Plasma [J]. Pharmaceut Biomed Anal, 2002, 28: 181 - 186.
- [9] 曾振灵, 陈杖榴, 冯淇辉, 等. 吡喹酮在猪体内的生物利用度及药物动力学研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1993, 24(2): 170 - 174.
- [10] 贾冬舒, 韩继福, 马成林, 等. 吡喹酮在绒山羊体内的药动学研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(2): 84 - 88.