

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.10.07

# 鸡血浆中磺胺氯吡嗪钠和甲氧苄啶含量 HPLC 检测方法的建立

卓国荣<sup>1,2</sup>, 聂巧<sup>1</sup>, 王东亮<sup>1</sup>, 陈鸿雨<sup>1</sup>, 秦琪<sup>1</sup>, 卜仕金<sup>1,3\*</sup>, 张明珠<sup>2</sup>, 杨海峰<sup>2</sup>, 孙晨明<sup>2</sup>

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300;

3. 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 225009)

[收稿日期] 2019-08-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 10-0040-15 [中图分类号] S859.796

**[摘要]** 建立了鸡血浆中磺胺氯吡嗪钠和甲氧苄啶含量测定的 HPLC 方法。对鸡血浆中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶采用乙腈提取和净化, 梯度洗脱, 高效液相色谱紫外检测法测定, 外标法定量。流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾水溶液。紫外测定时采用双波长检测: 磺胺氯吡嗪检测波长为 268 nm, 甲氧苄啶检测波长为 240 nm。空白血浆添加磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶分别在 0.1~70.0 μg/mL 和 0.05~5.00 μg/mL 范围内线性关系良好 ( $R^2$  均大于 0.9999), 磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的检测限分别为 0.05 μg/mL 和 0.025 μg/mL, 定量限分别为 0.1 μg/mL 和 0.05 μg/mL。空白血浆添加磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶在各自线性范围内, 批内变异系数分别小于 6.84% 和 7.55%, 批间系数分别小于 5.23% 和 6.81%。本研究建立的鸡血浆中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的提取和净化方法, 适用于鸡血浆中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶含量的单个或同时测定。

**[关键词]** 磺胺氯吡嗪钠; 甲氧苄啶; 肉鸡; 高效液相色谱; 血浆

## Establishment of a HPLC Method for the Detection of the Amounts of Sulfachlorpyrazine Sodium and Trimethoprim in Broiler Chicken Plasma

ZHUO Guo-rong<sup>1,2</sup>, NIE Qiao<sup>1</sup>, WANG Dong-liang<sup>1</sup>, CHEN Hong-yu<sup>1</sup>, QIN Qi<sup>1</sup>, PU Shi-jin<sup>1,3\*</sup>, ZHANG Ming-zhu<sup>2</sup>, YANG Hai-feng<sup>2</sup>, SUN Chen-ming<sup>2</sup>

(1. Veterinary Medicine College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu 22300, China;

3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Corresponding author: PU Shi-jin, E-mail: pushijin@aliyun.com

**Abstract:** In order to establish a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the detection of

**基金项目:** 2017 年江苏高校“青蓝工程”优秀教学团队项目 (苏教师 (2017) 15 号); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 现代农业产业技术体系专项资金资助项目

**作者简介:** 卓国荣, 博士研究生, 副教授, 从事兽医临床药理研究。

**通讯作者:** 卜仕金。E-mail: pushijin@aliyun.com

the amounts of sulfachloropyrazine sodium and trimethoprim in broiler's plasma, the plasma sample containing sulfachloropyrazine sodium and trimethoprim was firstly extracted and purified by acetonitrile, and then underwent the procedure of gradient elution, before being measured using high performance liquid chromatography ultraviolet detection method, lastly quantified through external standard method. The isocratic mobile phase was a aqueous solution made of a mixture of methyl alcohol and 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate. Dual-wavelength detection was used for ultraviolet detection; the detective UV wavelength of sulfachloropyrazine was 268 nm, and that of trimethoprim was 240 nm. The linear relationship was good when blank plasma containing the amounts of sulfachloropyrazine and trimethoprim in the range of 0.1 ~ 70.0  $\mu\text{g/mL}$  and 0.05 ~ 5.00  $\mu\text{g/mL}$  respectively ( $R^2 > 0.9999$ ). The detection limits of sulfachloropyrazine and trimethoprim were 0.05  $\mu\text{g/mL}$  and 0.025  $\mu\text{g/mL}$ , and the quantitative limits were 0.1  $\mu\text{g/mL}$  and 0.05  $\mu\text{g/mL}$  respectively. In the blank plasma, sulfamopyrazine and trimethoprim were added within their linear ranges, the intra-batch variation coefficients were less than 6.84% and 7.54% respectively, and the inter-batch coefficients were less than 5.27% and 6.80% respectively. This research provides a method for the extraction and purification of sulfachloropyrazine and trimethoprim in broiler chicken plasma, and it is applicable for both single and simultaneous detection of sulfachloropyrazine and trimethoprim in broiler chicken plasma.

**Key words:** sulfachloropyrazine sodium; trimethoprim; broiler chicken; HPLC; plasma

磺胺氯吡嗪钠 (SPZ) 属于磺胺类抗菌药, 常用于鸡球虫病的治疗<sup>[1-2]</sup>, 也用于球虫病爆发时继发的细菌病 (禽伤寒、禽霍乱) 防治<sup>[3]</sup>; 甲氧苄啶 (TMP) 是目前国内常用的磺胺抗菌增效剂, 属于二氨基嘧啶类化学合成抗菌药, 与磺胺类药物合用可使磺胺类药物抗菌抗菌活性大大增强<sup>[4]</sup>, 从而可以解决目前临床中磺胺氯吡嗪钠单方应用时逐渐增加的耐药性问题。本试验建立鸡血浆中磺胺氯吡嗪-甲氧苄啶含量测定的 HPLC 法, 对开展磺胺氯吡嗪-甲氧苄啶可溶性粉在鸡体内的药动学和生物利用度研究奠定基础。

## 1 材料

1.1 对照品 磺胺氯吡嗪钠 (分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2\text{ClNaS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 对照品: 含量为 99.0% (以磺胺氯吡嗪钠计), 0.1 g/棕色丝口玻璃瓶, 批号 40908, 购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。使用前无需干燥处理。甲氧苄啶 (分子式  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$ ) 对照品: 含量为 99.9% (以甲氧苄啶计), 100 mg/安剖瓶, 批号 100031-201405, 购自中国食品药品检定研究院。使用前无需干燥处理。

1.2 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯, 购自美国 TEDIA

公司。磷酸二氢钾为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.3 试液的配制

1.3.1 0.02 mol/L 磷酸二氢钾水溶液 准确称取 2.7218 g 磷酸二氢钾, 用 1000 mL 超纯水定容并混匀, 即制得 0.02 mol/L 磷酸二氢钾水溶液。

1.3.2 20% 甲醇溶液 将甲醇和超纯水按 20:80 (V/V) 比例混匀, 经 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤, 超声脱气 20 min 即可。现配现用。

1.3.3 磺胺氯吡嗪储备液 精密称取磺胺氯吡嗪钠对照品约 28.9 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 即配成浓度为 1000  $\mu\text{g/mL}$  的磺胺氯吡嗪标准储备液。置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

1.3.4 甲氧苄啶储备液 精密称取甲氧苄啶对照品约 25.0 mg 于 25 mL 量瓶中, 用乙腈溶解定容并超声助溶, 即配成浓度为 1000  $\mu\text{g/mL}$  的甲氧苄啶标准储备液。置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

1.3.5 混合标准工作液 分别准确吸取适量磺胺氯吡嗪储备液和甲氧苄啶标准储备液, 用 20% 甲醇溶液稀释使磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的浓度分别为 1.5、20、50、100、200、700  $\mu\text{g/mL}$  和 0.5、1.0、5.0、

10.0、25.0、50.0、100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。现配现用。

1.4 血浆样品制备 试验采用黄羽肉鸡,购自中国农业科学院家禽研究所,出壳后饲养在严格消毒的鸡笼内,至 35 日龄时从翅下静脉采血,血样置于肝素浸润并烘干的离心管内,3500 r/min,离心 10 min,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻备用。

1.5 仪器及设备 高效液相色谱仪,Agilent 1260 型高效液相色谱仪,配有紫外检测器和色谱工作站,Agilent 公司;色谱柱,Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),Agilent 公司;UPH-11-20T 型优普超纯水制造系统,成都超纯科技有限公司;N-EVAPTM112 型干浴氮吹仪,美国 Organomation 公司;电子分析天平,感量 0.0001 g,德国塞多利斯天平公司;PB-10 型 PH 计,德国塞多利斯天平公司;KS-250D 超声仪,宁波科生仪器厂;WH-1 微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器有限公司;5810-R 型高速冷冻离心机,德国 eppendorf 股份公司;可调微量移液器,10 ~ 100、20 ~ 200、100 ~ 1000  $\mu\text{L}$ ,德国 eppendorf 股份公司;10 mL 指形管,扬子化工玻璃仪器有限公司;1.5 mL 指形管,美国 Axygen 公司。

## 2 方法

2.1 血浆样品前处理 准确吸取室温下解冻后的血浆样品 200  $\mu\text{L}$  置于 1.5 mL 指形管中,加入 1 mL 乙腈涡旋振荡 3 min 后,离心 10 min (4  $^{\circ}\text{C}$ , 14000 r/min),将上清液移至 10 mL 指形管中。残渣加 1 mL 乙腈涡旋振荡 3 min,离心 10 min (4  $^{\circ}\text{C}$ , 14000 r/min),合并上清液。取上清液于 40  $^{\circ}\text{C}$  干浴氮气吹干后,加入 20% 甲醇溶液 200  $\mu\text{L}$  溶解,涡旋振荡 3 min。将复溶后的溶液移至 1.5 mL 指形管内,离心 10 min (4  $^{\circ}\text{C}$ , 14000 r/min),取上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤,滤液供 HPLC 分析。

2.2 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:A 相,甲醇;B 相,0.02 mol/L 磷酸二氢钾水溶液(表 1);流速:1.0 mL/min;柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:20  $\mu\text{L}$ ;紫外检测波长:0 ~ 13.5 min,  $\lambda_1 = 240\text{ nm}$ (甲氧苄啶);13.5 ~ 21 min,  $\lambda_2 = 268\text{ nm}$ (磺胺氯吡嗪)。

2.3 标准曲线和线性范围 分别准确吸取 180  $\mu\text{L}$  室温解冻的空白血浆于 7 支 1.5 mL 指形管中,并依次分别加入对应浓度的磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶混合标准工作液 20  $\mu\text{L}$ ,涡旋 30 s 混匀,使磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的浓度分别为 0.1、0.5、2.5、10、20、70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。即制得以上系列磺胺氯吡嗪、甲氧苄啶空白血浆添加浓度。将上述样品按照 2.1 项下的血浆样品处理方法处理后,进行 HPLC 分析。外标法定量,以磺胺氯吡嗪(As)和甲氧苄啶(As)对各自的血药浓度(C)分别进行线性回归,得回归方程。共作 3 次平行试验。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions of mobile phase

Time/min	A/%	B/%
0.00	20	80
0.50	20	80
10.00	35	65
18.00	35	65
20.00	20	80
21.00	20	80

2.4 定量限(LOQ)和检测限(LOD) 分别将含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.5、1.0、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.25、0.50、1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  混合标准工作液 20  $\mu\text{L}$  加入 180  $\mu\text{L}$  空白血浆中,涡旋混匀后制得血浆样品中分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的浓度为 0.05、0.10、0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.025、0.050、0.100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每个浓度制备 5 个平行样品。依据 2.1 项下的血浆样品处理方法处理,上清液供 HPLC 分析,测得各样品的峰高与噪音(基线峰高)。取信噪比  $S/N \geq 3$  时浓度为检测限(LOD);取信噪比  $S/N \geq 10$ ,且结合精密度和准确度试验结果确定定量限(LOQ)。

2.5 回收率 取 1.5 mL 指形管数支,按照 2.3 项标准曲线制备方法制备分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.1、2.0、70.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加样品及一条随行

标准曲线,每个浓度制备 5 个平行样品。按 2.1 项下的血浆样品预处理方法处理后,取上清液 20  $\mu\text{L}$  作 HPLC 分析。分别将测得磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的峰面积 ( $A_s$ ),代入当天的各自的标准曲线求得实测浓度。实测浓度与添加浓度之比值乘以百分数即为相对回收率。

**2.6 精密度** 取 1.5 mL 指形管数支,按照 2.3 项标准曲线制备方法制备分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.1、2.0、70.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加样品及一条随行标准曲线,每批每个浓度制备 5 份平行样品,连续 3 d,共作三个批次。按 2.1 项下血浆样品处理方法操作。分别将测得磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的峰面积 ( $A_s$ ),代入当天的各自的标准曲线得到实测浓度,据此分别计算批内和批间变异系数。

## 2.7 稳定性

**2.7.1 储备液的稳定性** 按 1.3.5 项混合标准工作液制备方法,制备含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶分别为 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的三个浓度混合标准工作液,每个浓度制备 5 个平行。制备后立刻对样品进行分析,得到第 0 时数据。之后将两种储备液分别于冻存(约  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) 30、60、90 d 后按上述方法配制并进行样品分析。通过与 0 时测定的数据比较考察储备液贮存期间的稳定性。

**2.7.2 样品室温放置下的稳定性** 按照 2.3 项下标准曲线制备方法制备分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加样品,每个浓度制备 5 个平行样品。按 2.1 项下的血浆样品预处理方法处理后,立刻取上清液 20  $\mu\text{L}$  作 HPLC 分析,得到第 0 时数据;之后在室温(约  $22\text{ }^\circ\text{C}$ ) 下分别放置 2、6、8 h 后进行样品分析。通过与 0 时测定的数据比较,考察样品室温放置时磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的稳定性。

**2.7.3 样品反复冻融下的稳定性** 按照 2.3 项下标准曲线制备方法制备分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00

$\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加样品,每个浓度制备 5 个平行样品。按 2.1 项下的血浆样品预处理方法处理后,立刻取上清液 20  $\mu\text{L}$  作 HPLC 分析,得到第 0 时数据;在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  下至少储存一天后取出解冻,之后再次冷冻、解冻,反复共进行 3 次冻融循环处理。两次冻融间隔时间至少为 5 h。通过与 0 时测定的数据比较,考察反复冻融下样品中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的稳定性。

**2.7.4 样品冻存期间的稳定性** 按照 2.3 项下标准曲线制备方法制备分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加样品,每个浓度制备 5 个平行样品。按 2.1 项下的血浆样品预处理方法处理后,立刻取上清液 20  $\mu\text{L}$  作 HPLC 分析,得到第 0 时数据;之后分别于冻存(约  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) 10、20、40 d 后进行样品分析。通过与 0 时测定的数据比较,考察样品贮存期间的稳定性。

## 2.8 干扰性

**2.8.1 混合标准工作液的干扰性** 按 1.3.5 项下混合标准工作液制备方法,制备 2 mL 含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶分别为 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的三个浓度混合标准工作液;准确吸取适量磺胺氯吡嗪标准储备液,用 20% 甲醇溶液稀释使磺胺氯吡嗪的浓度分别为 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;准确吸取适量甲氧苄啶标准储备液,用 20% 甲醇溶液稀释使甲氧苄啶的浓度分别为 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每个浓度制备 5 个平行。

上述标准工作液制备后取 20  $\mu\text{L}$  于 2.2 项下色谱条件下作 HPLC 分析。通过相同浓度的混合标准品与单一磺胺氯吡嗪或甲氧苄啶标准品测定的数据比较,考察混合标准工作液中同时存在磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶时,对彼此测定结果的干扰性影响。

**2.8.2 空白血浆添加样品的干扰性** 按照 2.3 项下标准曲线制备方法制备分别含磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加磺胺氯吡嗪-甲氧苄啶样品;取 20  $\mu\text{L}$  经 20% 甲醇溶液稀释至 1、

2、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的磺胺氯吡嗪标准工作液,添加至 180  $\mu\text{L}$  空白血浆中,制备 0.1、2.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加磺胺氯吡嗪样品;取 20  $\mu\text{L}$  经 20% 甲醇溶液稀释至 0.5、5.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的甲氧苄啶标准工作液,添加至 180  $\mu\text{L}$  空白血浆中,制备 0.05、0.50、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的空白血浆添加甲氧苄啶样品。每个浓度制备 5 个平行样品。

将上述样品按 2.1 项下的血浆样品预处理方法处理后,取上清液 20  $\mu\text{L}$  于 2.2 项下色谱条件下作 HPLC 分析。通过血浆添加相同浓度的混合标

准品与单一磺胺氯吡嗪或甲氧苄啶测定的数据比较,考察样品中同时存在磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶时对彼此测定结果的干扰性影响。

### 3 结果与分析

3.1 磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶血浆样品测定的色谱图 磺胺氯吡嗪标准品和甲氧苄啶混合标准品、空白血浆及空白血浆添加甲氧苄啶混合标准品色谱分析图分别见图 1 ~ 图 5。在本试验建立的色谱条件下,磺胺氯吡嗪出峰时间在 14.9 min 左右,甲氧苄啶出峰时间在 9.1 min 左右,且待测组分与溶剂峰及血浆中其他基质组分能完全分开。

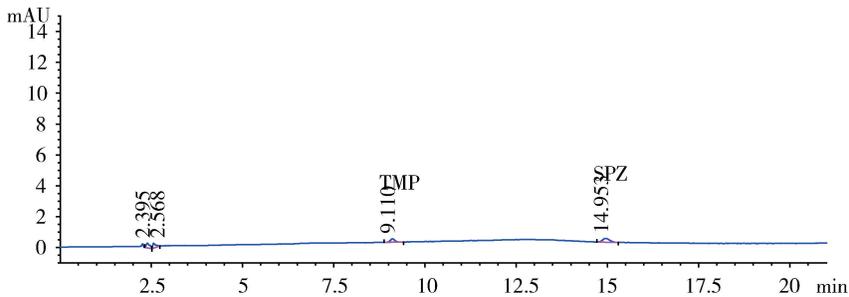


图 1 磺胺氯吡嗪(0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和甲氧苄啶(0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )混合标准品色谱图

Fig 1 Chromatogram of Standard Mixtures of SPZ (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and TMP (0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

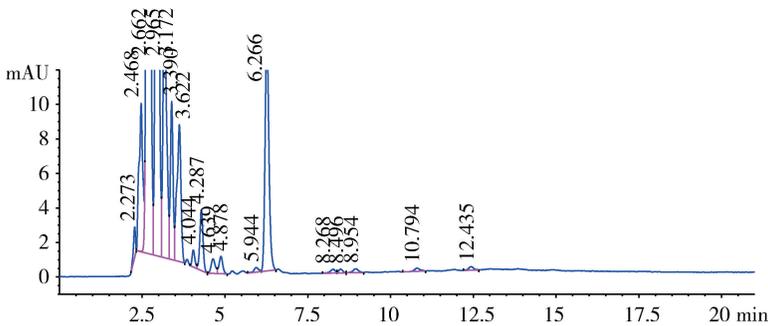


图 2 空白血浆色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank plasma

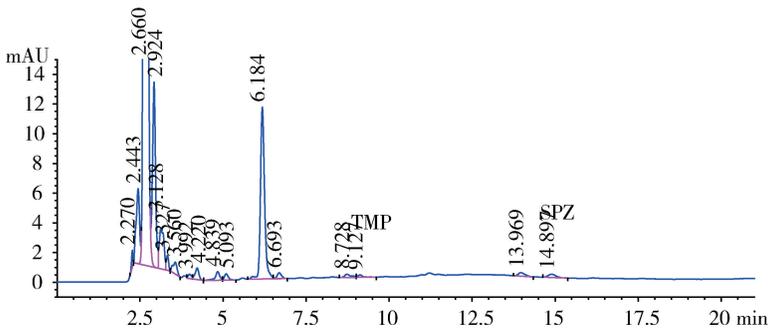


图 3 空白血浆添加磺胺氯吡嗪(0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和甲氧苄啶(0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )样品色谱图

Fig 3 Chromatogram of blank plasma added with SPZ (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and TMP (0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

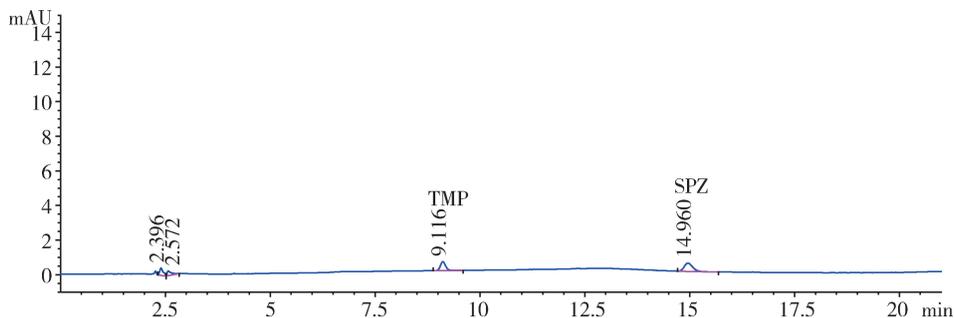


图 4 磺胺氯吡嗪(0.1 µg/mL)和甲氧苄啶(0.05 µg/mL)混合标准品色谱图

Fig 4 Chromatogram of Standard Mixtures of SPZ(0.1 µg/mL) and TMP (0.05 µg/mL)

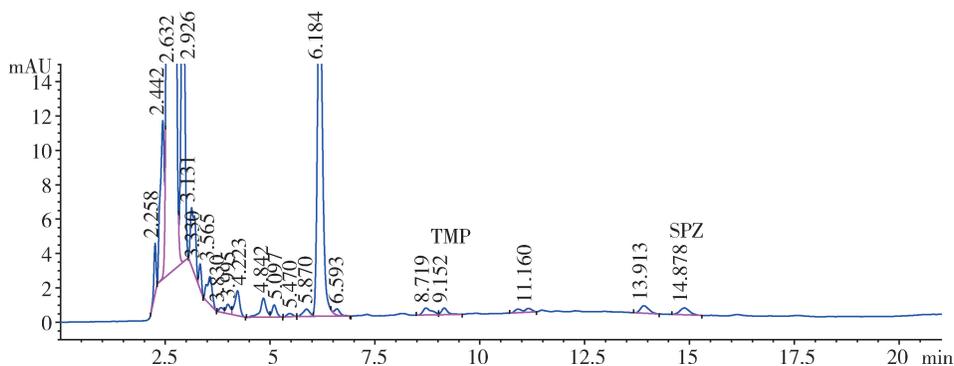


图 5 空白血浆添加磺胺氯吡嗪(0.1 µg/mL)和甲氧苄啶(0.05 µg/mL)样品色谱图

Fig 5 Chromatogram of blank Plasma added with SPZ(0.1 µg/mL) and TMP (0.05 µg/mL)

3.2 标准曲线及线性范围

3.2.1 磺胺氯吡嗪标准曲线及线性范围 磺胺氯吡嗪的血浆药物浓度在 0.1 ~ 70.00 µg/mL 范围内,血浆药物浓度与峰面积比值呈良好的线性关系 ( $R^2 = 1.0000$ )。结果见表 2。以血药浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制的标准曲线见图 6。

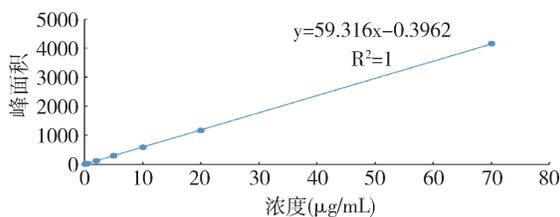


图 6 磺胺氯吡嗪标准曲线图

Fig 6 Standard working curve of SPZ

表 2 磺胺氯吡嗪标准曲线回归方程及相关系数

Tab 2 Linear regression equation and correlation coefficient of SPZ

批次	线性范围 /(µg · mL <sup>-1</sup> )	标准曲线 回归方程	相关系数 (R <sup>2</sup> )
1	0.1 ~ 70.0	As = 59.316C - 0.39621	1.0000
2	0.1 ~ 70.0	As = 58.740C + 0.49201	1.0000
3	0.1 ~ 70.0	As = 59.218C - 0.11558	1.0000

3.2.2 甲氧苄啶标准曲线及线性范围 甲氧苄啶的血浆药物浓度在 0.05 ~ 5.00 µg/mL 范围内,血浆药物浓度与峰面积比值呈良好的线性关系 ( $R^2 =$

0.9999)。结果见表 3。以血药浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制的标准曲线见图 7。

表 3 甲氧苄啶标准曲线回归方程及相关系数

Tab 3 Linear regression equation and correlation coefficient of TMP

批次	线性范围 /(µg · mL <sup>-1</sup> )	标准曲线 回归方程	相关系数 (R <sup>2</sup> )
1	0.05 ~ 5.00	As = 66.807C - 0.07871	1.0000
2	0.05 ~ 5.00	As = 67.559C - 0.57538	0.9999
3	0.05 ~ 5.00	As = 66.688C + 0.39484	0.9999

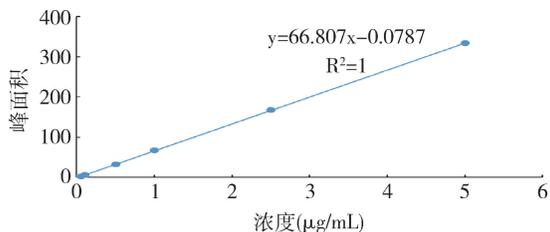


图 7 甲氧苄啶标准曲线图

Fig 7 Standard working curve of TMP

3.3 检测限和定量限 取信噪比  $S/N \geq 3$  时的浓度为最低检测限,信噪比  $S/N \geq 10$  时的浓度为定量

限。根据检测得,该方法磺胺氯吡嗪的检测限为  $0.05 \mu\text{g/mL}$ ,定量限为  $0.1 \mu\text{g/mL}$ ;甲氧苄啶的检测限为  $0.025 \mu\text{g/mL}$ ,定量限为  $0.05 \mu\text{g/mL}$ 。

3.4 回收率 在空白血浆添加样品中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的回收率测定结果分别见表 4 和表 5。由表 4 可见,磺胺氯吡嗪空白血浆添加水平在  $0.1 \sim 70.0 \mu\text{g/mL}$  时,回收率在  $92\% \sim 104\%$  之间;由表 5 可见,甲氧苄啶空白血浆添加水平在  $0.05 \sim 5.00 \mu\text{g/mL}$  时,回收率在  $91\% \sim 96\%$  之间。

表 4 空白血浆添加磺胺氯吡嗪样品相对回收率 (%) (n = 5)

Tab 4 Relative recoveries of SPZ in blank plasma (%) (n = 5)

添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	平行 5 批样品实测回收率/%					$\bar{x} \pm SD$	RSD/%
	1	2	3	4	5		
0.1	97.10	101.89	97.41	101.81	87.89	$97.220 \pm 5.702$	5.865
2.0	90.86	91.56	92.36	96.47	90.27	$92.304 \pm 2.455$	2.660
70.0	102.93	103.60	104.13	100.79	107.86	$103.861 \pm 2.572$	2.476

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均回收率; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

表 5 空白血浆添加甲氧苄啶样品相对回收率 (%) (n = 5)

Tab 5 Relative recoveries of TMP in blank plasma (%) (n = 5)

添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	平行 5 批样品实测回收率/%					$\bar{x} \pm SD$	RSD/%
	1	2	3	4	5		
0.05	98.18	100.93	97.37	94.35	84.11	$94.989 \pm 6.519$	6.863
0.50	91.01	91.87	92.02	95.06	89.61	$91.914 \pm 2.001$	2.177
5.00	97.56	97.37	97.97	96.49	90.15	$95.908 \pm 3.266$	3.405

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均回收率; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

3.5 精密度 在空白血浆添加样品中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的批内和批间精密度测定结果分别见表 6 和表 7。由表 6 可见,磺胺氯吡嗪空白血浆添加水平在  $0.1 \sim 70.0 \mu\text{g/mL}$  时,批内和批间变异系数分别小于  $6.61\%$  和  $5.18\%$ ;由表 7 可见,甲氧苄啶空白血浆添加水平在  $0.05 \sim 5.00 \mu\text{g/mL}$  时,批

内和批间变异系数分别小于  $6.89\%$  和  $6.84\%$ 。

### 3.6 稳定性

3.6.1 储备液存储期间的稳定性 磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶储备液稳定性试验结果分别见表 8 和表 9。结果表明,磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶储备液于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下冻存能够保持稳定达 90 d。

表 6 空白血浆添加磺胺氯吡嗪精密测定结果

Tab 6 Precision determination of SPZ in blank plasma

变异系数	添加浓度 /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平行 5 批样品实测浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					RSD/%
		1	2	3	4	5	
批内(n=5)	0.1	0.097	0.095	0.094	0.096	0.082	6.616
	2.0	1.746	1.785	1.699	1.768	1.718	2.020
	70.0	73.610	71.960	69.570	71.016	68.821	2.684
批间(n=15)	0.1	0.096	0.106	0.098	0.103	0.095	5.175
		0.101	0.097	0.090	0.098	0.092	
	2.0	0.107	0.106	0.102	0.104	0.101	4.702
		1.838	1.969	1.917	1.923	1.684	
		1.729	1.817	1.801	1.803	1.920	
	70.0	1.917	1.955	1.740	1.867	1.821	4.128
		74.429	72.159	69.285	74.369	71.856	
68.516		66.016	74.856	72.382	69.359		
		73.369	70.865	67.181	67.282	73.790	

n. 样本数; RSD. 变异系数.

表 7 空白血浆添加甲氧苄啶精密测定结果

Tab 7 Precision determination of TMP in blank plasma

变异系数	添加浓度 /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平行 5 批样品实测浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					RSD/%
		1	2	3	4	5	
批内(n=5)	0.05	0.046	0.051	0.047	0.047	0.042	6.887
	0.50	0.430	0.445	0.421	0.441	0.433	2.147
	5.00	4.421	4.538	4.572	4.483	4.473	1.308
批间(n=15)	0.05	0.054	0.051	0.048	0.048	0.045	6.837
		0.058	0.051	0.049	0.051	0.048	
	0.50	0.048	0.047	0.047	0.047	0.046	5.238
		0.457	0.487	0.474	0.475	0.416	
		0.439	0.444	0.436	0.439	0.479	
	5.00	0.485	0.492	0.428	0.473	0.450	4.098
		4.845	4.610	4.810	4.618	4.707	
4.503		4.464	4.321	4.405	4.354		
		4.521	4.456	4.754	4.870	4.835	

表 8 磺胺氯吡嗪储备液在  $-20^{\circ}\text{C}$  贮存条件下的稳定性测定结果 ( $n=20$ )Tab 8 The stability of SPZ stock solutions stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $n=20$ )

添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	储存时间/ /d	平行 5 批样品实测浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					$\bar{x} \pm SD(\text{mAU})$	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.1	0	0.095	0.103	0.095	0.102	0.111	$0.108 \pm 0.012$	10.785
	30	0.098	0.090	0.092	0.095	0.096		
	60	0.119	0.119	0.112	0.123	0.121		
	90	0.112	0.113	0.116	0.124	0.120		
2.0	0	2.048	2.207	2.039	2.125	2.187	$2.048 \pm 0.094$	4.573
	30	1.946	1.932	1.922	2.042	1.889		
	60	2.197	2.067	2.057	2.018	1.918		
	90	2.099	2.131	2.059	2.058	2.018		
20.0	0	21.574	21.672	21.633	20.492	21.637	$21.619 \pm 1.672$	7.736
	30	19.126	19.395	19.943	19.023	18.399		
	60	23.052	22.698	22.434	22.257	22.110		
	90	23.801	23.736	22.839	23.340	23.221		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

表 9 甲氧苄啶储备液在  $-20^{\circ}\text{C}$  贮存条件下的稳定性测定结果 ( $n=20$ )Tab 9 The stability of TMP stock solutions stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $n=20$ )

添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	储存时间/ d	平行 5 批样品实测浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					$\bar{x} \pm SD(\text{mAU})$	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.05	0	0.046	0.044	0.044	0.040	0.046	$0.047 \pm 0.005$	9.972
	30	0.045	0.041	0.041	0.044	0.042		
	60	0.049	0.053	0.050	0.050	0.053		
	90	0.046	0.053	0.056	0.044	0.045		
0.50	0	0.447	0.478	0.469	0.435	0.483	$0.457 \pm 0.021$	4.453
	30	0.448	0.429	0.451	0.436	0.414		
	60	0.497	0.463	0.467	0.456	0.437		
	90	0.465	0.478	0.479	0.462	0.453		
5.00	0	5.064	5.105	4.983	4.755	5.087	$5.013 \pm 0.340$	6.776
	30	5.374	4.475	5.189	4.322	4.212		
	60	5.156	5.102	4.994	4.938	4.915		
	90	5.403	5.332	5.396	5.243	5.212		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

3.6.2 室温放置下的稳定性 室温放置下样品的稳定性测定结果分别见表 10 和表 11。结果表明,

鸡血浆样品在室温条件(约  $22^{\circ}\text{C}$ )下放置时磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶均可保持稳定达 8 h。

表 10 空白血浆添加样品放置室温 (+22 °C) 下磺胺氯吡嗪的稳定性测定结果 (n = 20)

Tab 10 The stability of SPZ in blank plasma at room temperature ( +22°C) ( n =20)

添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	储存时间/ h	平行 5 批样品实测浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.1	0	0.106	0.105	0.101	0.096	0.107	0.099 ± 0.005	5.301
	2	0.107	0.100	0.098	0.098	0.102		
	6	0.097	0.098	0.100	0.093	0.095		
	8	0.097	0.092	0.097	0.086	0.099		
2.0	0	1.707	1.867	1.714	2.026	1.729	1.768 ± 0.136	7.705
	2	1.658	1.871	1.749	2.012	1.690		
	6	1.616	1.862	1.705	1.945	1.637		
	8	1.576	1.835	1.679	1.891	1.593		
20.0	0	21.465	21.582	20.991	21.550	21.909	20.261 ± 1.195	5.900
	2	20.977	21.142	20.228	20.986	21.408		
	6	20.445	19.483	20.215	20.035	19.987		
	8	18.706	18.308	19.164	18.622	18.020		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

表 11 空白血浆添加样品放置室温 (+22 °C) 下甲氧苄啶的稳定性测定结果 (n = 20)

Tab 11 The stability of TMP in blank plasma at room temperature ( +22°C) ( n =20)

添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	储存时间/ h	平行 5 批样品实测浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.05	0	0.055	0.050	0.049	0.048	0.051	0.050 ± 0.002	4.399
	2	0.053	0.051	0.052	0.048	0.051		
	6	0.050	0.049	0.050	0.050	0.050		
	8	0.050	0.047	0.046	0.046	0.050		
0.5	0	0.492	0.509	0.475	0.507	0.455	0.473 ± 0.023	4.786
	2	0.478	0.487	0.484	0.498	0.446		
	6	0.467	0.481	0.472	0.484	0.434		
	8	0.454	0.473	0.464	0.473	0.421		
5.0	0	5.012	5.026	4.877	5.013	5.109	4.728 ± 0.283	5.993
	2	4.882	4.938	4.787	4.887	4.983		
	6	4.780	4.553	4.701	4.669	4.661		
	8	4.368	4.292	4.472	4.337	4.193		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

3.6.3 反复冻融下的稳定性 血浆样品反复冻融条件下的稳定性测定结果见表 12 和表 13。结果表

明,鸡血浆样品经三个循环冻融后其磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶仍能保持较好的稳定性。

表 12 空白血浆添加样品经三个冻融循环 (+22 °C / -20 °C) 后磺胺氯吡嗪的稳定性测定结果 (n = 20)

Tab 12 The stability of SPZ in blank plasma after three freeze - thaw cycles( +22 °C/ -20 °C) (n = 20)

添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	循环冻融次数	平行 5 批样品实测浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.1	0	0.105	0.108	0.102	0.109	0.111	0.103 ± 0.007	6.460
	1 次后	0.099	0.086	0.103	0.110	0.093		
	2 次后	0.104	0.102	0.102	0.110	0.107		
	3 次后	0.103	0.096	0.102	0.109	0.093		
2.0	0	1.988	1.969	2.015	1.916	1.882	1.896 ± 0.066	3.492
	1 次后	1.954	1.941	1.923	1.815	1.973		
	2 次后	1.913	1.862	1.818	1.842	1.924		
	3 次后	1.882	1.833	1.841	1.772	1.849		
20.0	0	19.019	18.570	18.911	18.797	18.721	18.619 ± 0.553	2.971
	1 次后	18.403	19.375	18.614	19.060	19.193		
	2 次后	17.592	19.020	18.315	18.908	19.209		
	3 次后	17.165	18.476	17.920	18.487	18.634		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

表 13 空白血浆添加样品经三个冻融循环 (+22 °C / -20 °C) 后甲氧苄啶的稳定性测定结果 (n = 20)

Tab 13 The stability of TMP in blank plasma after three freeze - thaw cycles ( +22 °C/ -20 °C) (n = 20)

添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	6 循环冻融次数	平行 5 批样品实测浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD%
		1	2	3	4	5		
0.05	冻融前	0.058	0.057	0.054	0.059	0.055	0.053 ± 0.004	8.049
	1 次后	0.056	0.051	0.054	0.059	0.052		
	2 次后	0.052	0.052	0.051	0.052	0.056		
	3 次后	0.051	0.048	0.047	0.050	0.042		
0.50	冻融前	0.494	0.484	0.495	0.482	0.473	0.473 ± 0.024	5.063
	1 次后	0.483	0.485	0.503	0.498	0.528		
	2 次后	0.465	0.454	0.442	0.457	0.471		
	3 次后	0.456	0.448	0.445	0.437	0.455		
5.00	冻融前	4.709	4.663	4.791	4.702	4.645	4.655 ± 0.136	2.926
	1 次后	4.641	4.835	4.707	4.809	4.740		
	2 次后	4.375	4.713	4.595	4.727	4.771		
	3 次后	4.296	4.608	4.490	4.648	4.641		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

3.6.4 样品存储期间的稳定性 样品存储期间稳定性测定结果见表 14 和表 15。结果表明,血浆样

品于 -20 °C 条件下冻存时磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶能够保持稳定达 40 d。

表 14 空白血浆添加样品在 -20 °C 冻存条件下磺胺氯吡嗪的稳定性测定结果 (n = 20)

Tab 14 The stability of SPZ in blank plasma after storing at -20 °C (n = 20)

添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	储存时间/ d	平行 5 批样品实测浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.1	0	0.101	0.091	0.088	0.090	0.096	0.096 ± 0.006	6.673
	10	0.088	0.095	0.100	0.097	0.096		
	20	0.094	0.102	0.086	0.096	0.103		
	40	0.111	0.096	0.108	0.096	0.095		
2.0	0	1.972	2.089	1.939	2.016	2.054	1.957 ± 0.068	3.470
	10	1.953	2.039	1.949	1.934	1.976		
	20	1.910	2.004	1.989	1.916	1.962		
	40	1.982	1.795	1.902	1.878	1.881		
20.0	0	21.441	19.696	19.890	21.157	19.011	19.620 ± 0.810	4.131
	10	20.257	19.079	19.292	19.841	20.178		
	20	19.961	18.971	20.280	19.045	19.748		
	40	18.434	18.602	18.545	19.823	19.144		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

表 15 空白血浆添加样品在 -20 °C 冻存条件下甲氧苄啶的稳定性测定结果 (n = 20)

Tab 15 The stability of TMP in blank plasma after storing at -20 °C (n = 20)

添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	储存时间/ d	平行 5 批样品实测浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.05	0	0.056	0.054	0.050	0.052	0.054	0.053 ± 0.003	5.155
	10	0.052	0.055	0.050	0.056	0.057		
	20	0.054	0.053	0.052	0.053	0.051		
	40	0.054	0.048	0.046	0.054	0.053		
0.50	0	0.483	0.512	0.477	0.500	0.507	0.483 ± 0.017	3.457
	10	0.491	0.504	0.476	0.480	0.492		
	20	0.462	0.493	0.494	0.475	0.482		
	40	0.480	0.448	0.467	0.462	0.467		
5.00	0	5.062	4.687	4.718	5.040	4.514	4.667 ± 0.190	4.067
	10	4.809	4.565	4.596	4.766	4.779		
	20	4.727	4.532	4.855	4.537	4.682		
	40	4.371	4.429	4.413	4.721	4.528		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

### 3.7 干扰性

3.7.1 混合标准工作液的干扰性 混合标准工作液的干扰性试验测定结果见表 16。结果表明,磺胺

氯吡嗪和甲氧苄啶在 2.2 项的色谱条件下测定两者之间不会产生相互干扰。

表 16 磺胺氯吡嗪标准工作液与甲氧苄啶标准工作液之间的干扰性试验测定结果 (n = 10)

Tab 16 Interference test results between standard working fluid of SPZ and standard working fluid of TMP (n = 10)

药物	添加药物及浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	出峰时间 (min)/ 实测浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	平行 5 批样品					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD /%
			1	2	3	4	5		
磺胺氯吡嗪	磺胺氯吡嗪 (20)	出峰时间	14.859	14.848	14.843	14.837	14.835	22.416 $\pm$ 0.370	1.652
		实测浓度	22.378	21.899	22.128	22.460	21.848		
	磺胺氯吡嗪 (20) 甲氧苄啶 (5)	出峰时间	14.855	14.854	14.916	14.891	14.883		
		实测浓度	22.807	22.925	22.785	22.515	22.421		
甲氧苄啶	甲氧苄啶 (5)	出峰时间	9.124	9.142	9.138	9.131	9.153	5.346 $\pm$ 0.235	4.398
		实测浓度	5.369	5.255	5.261	5.159	5.261		
	磺胺氯吡嗪 (20) 甲氧苄啶 (5)	出峰时间	9.101	9.096	9.130	9.120	9.114		
		实测浓度	5.095	5.222	5.808	5.727	5.301		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

3.7.2 空白血浆添加样品的干扰性 空白血浆添加磺胺氯吡嗪与甲氧苄啶样品,两者之间的干扰性

试验测定结果见表 17。结果表明,两者之间的出峰时间及实测浓度均不会产生相互干扰现象。

表 17 空白血浆添加磺胺氯吡嗪与甲氧苄啶样品的出峰时间干扰性试验测定结果 (n = 10)

Tab 17 The results of interferential test of peak time of SPZ and TMP in blank plasma (n = 10)

药物	添加药物 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	出峰时间 (min)/ 实测浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	平行 5 批样品					$\bar{x} \pm SD$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD /%
			1	2	3	4	5		
磺胺氯吡嗪	磺胺氯吡嗪 (20)	出峰时间	14.827	14.807	14.839	14.863	14.862	18.946 $\pm$ 0.570	3.008
		实测浓度	19.239	18.706	18.120	19.319	18.651		
	磺胺氯吡嗪 (20) 甲氧苄啶 (5)	出峰时间	14.872	14.852	14.846	14.844	14.853		
		实测浓度	19.749	19.639	19.178	18.712	18.148		
甲氧苄啶	甲氧苄啶 (5)	出峰时间	9.174	9.157	9.158	9.147	9.139	5.029 $\pm$ 0.188	3.745
		实测浓度	4.860	4.855	5.344	5.053	5.199		
	磺胺氯吡嗪 (20) 甲氧苄啶 (5)	出峰时间	9.157	9.147	9.140	9.135	9.134		
		实测浓度	5.190	5.126	5.025	4.891	4.751		

n. 样本数;  $\bar{x}$ . 平均浓度; SD. 标准差; RSD. 变异系数.

## 4 讨论

4.1 确定磺胺氯吡嗪的紫外检测波长 分别将 0.5、1、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的磺胺氯吡嗪标准工作液 20  $\mu\text{L}$  加入 180  $\mu\text{L}$  空白血浆中,涡旋混匀后分别制得 0.05、0.1、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个磺胺氯吡嗪空白添加血浆浓度。依据 2.1 项下的血浆样品处理方法处理后,设置 DAD 为 200~400 nm 全波长扫描(步进值为 2 nm),按 2.2 项下的色谱条件进行 HPLC 光谱

分析。每个浓度重复 3 次,确定磺胺氯吡嗪最大紫外吸收波长和最佳检测波长。

在 2.2 项建立的色谱条件下,磺胺氯吡嗪最大紫外吸收波长为 268 nm,且仅在此检测波长下磺胺氯吡嗪检测限能够达到 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,故本试验采用 268 nm 为磺胺氯吡嗪的紫外检测波长。

4.2 确定甲氧苄啶的紫外检测波长 分别将 0.25、0.5、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的甲氧苄啶标准工作液 20  $\mu\text{L}$

加入 180  $\mu\text{L}$  空白血浆中,涡旋混匀后分别制得 0.025、0.05、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个甲氧苄啶空白添加血浆浓度。依据 2.1 项下的血浆样品处理方法处理后,设置 DAD 为 200 ~ 400 nm 全波长扫描(步进值为 2 nm),按 2.2 项下的色谱条件进行 HPLC 光谱分析。每个浓度重复 3 次,确定甲氧苄啶最大紫外吸收波长和最佳检测波长。在 2.2 项建立的色谱条件下,甲氧苄啶最大紫外吸收波长为 200 nm,但在该条件下经过检测器的其他物质也有很大吸收,综合考虑选择 240 nm 作为甲氧苄啶的检测波长,且在此检测波长下甲氧苄啶检测限能够达到 0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,故本试验采用 240 nm 为甲氧苄啶的紫外检测波长。

#### 4.3 血浆中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的提取方法

研究表明在对血样进行处理时主要使用乙腈<sup>[5-7]</sup>、乙酸乙酯<sup>[8]</sup>、无水乙醇<sup>[9]</sup>、10% 高氯酸<sup>[10]</sup>。在血浆中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的提取方法研究中,试验先后用 1 mL 纯甲醇、1 mL 乙腈、1 mL 乙腈 - 异丙醇(4 : 1)、1 mL 乙腈 - 甲醇(4 : 1)4 种方法萃取药物,发现甲醇提取时杂质干扰严重,其余三种方法两种药物回收率均在 80% 以上,纯乙腈提取较其他组回收率高且杂质较少。又继续比较了以 1 mL 乙腈提取一次和提取两次,发现两次提取时两种药物的回收率均较一次提取回收率高且均无杂质干扰药峰,故选择提取方法为用 1 mL 乙腈提取两次。

#### 4.4 血浆中磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶含量的测定方法

在本试验建立的测定磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶色谱条件下,以安捷伦 1260 进行 DAD 全波长扫描,发现磺胺氯吡嗪在 268 nm 紫外检测波长处有最大吸收,甲氧苄啶最大紫外吸收波长为 200 nm,但在该条件下经过检测器的其他物质也有很大吸收,综合考虑选择 240 nm 作为甲氧苄啶的检测波长。研究发现当柱温为室温或 30  $^{\circ}\text{C}$  时,杂峰干扰甲氧苄啶药物峰,当温度为 35  $^{\circ}\text{C}$  时,甲氧苄啶药峰与杂峰完全分离。研究表明流动相用甲醇和水时,药物保留时间不稳定,当流动相中加入磷酸二氢钾时药物保留时间稳定,将有机相换成乙腈时基线向下漂移。多次试验发现用流动相溶解氮吹后的残

渣会导致磺胺氯吡嗪析出,而更换纯甲醇会导致磺胺氯吡嗪出现前沿峰、甲氧苄啶裂峰,将其更换为甲醇和水的混合溶液时药物峰面积和保留时间稳定。比较甲醇和水体积比分别为 80 : 20、70 : 30、50 : 50、30 : 70、20 : 80 对药物检测灵敏度的影响,研究表明甲醇和水的体积比为 20 : 80 时对两种药物的检测灵敏度均最高,因此,选用甲醇水(20 : 80, V/V)溶解氮吹后的残渣。参考孙晨明<sup>[5]</sup>的研究,本实验采用梯度洗脱有效改善峰形且缩短两药物出峰时间差,同时采用双波长检测降低甲氧苄啶的检测限和定量限,提高灵敏度。当前色谱条件下,磺胺氯吡嗪出峰时间为 14.9 min 左右,甲氧苄啶出峰时间为 9.1 min 左右,待测药物磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶均能够在图谱上呈现较好的峰形,与其他杂质峰分离开,并且能够准确定量。

## 5 结 论

在本试验所建立的 HPLC 条件下,空白血浆添加磺胺氯吡嗪、甲氧苄啶分别在 0.1 ~ 70.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05 ~ 5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,药物浓度与检测器响应值之间相关性良好( $R^2 = 0.9999$ );回收率分别在 92% ~ 103% 和 91% ~ 96% 之间;批内系数分别小于 6.62% 和 5.18%,批间系数分别小于 6.89% 和 6.84%。该方法磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的检测限分别为 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,定量限分别为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

本试验所建立的反相高效液相色谱 - 紫外检测法,分析成本低,操作便捷,检测迅速,方法的灵敏度、准确性和重现性均能满足磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶的单独或同时血药浓度检测需求,能够为进一步的磺胺氯吡嗪和甲氧苄啶药动力学研究和生物利用度研究提供依据,从而对临床合理用药和抗球虫药物新制剂的研发提供指导。

## 参考文献:

- [1] 索勋,李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京: 中国农业出版社,1998.
- Suo X, Li G Q. Chicken Coccidiosis [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998.

- [2] 常晓辉,薛飞群,张丽芳. 鸡球虫病药物防治的研究现状[J]. 中国动物传染病学报,2011,19(5):71-75.  
Chang X H, Xue F Q, Zhang L F. Research status of drug control chicken coccidiosis [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2011, 19 (5): 71 - 75.
- [3] 朱模忠. 兽药手册[M]. 北京:化学工业出版社,2008.  
Zhu M Z. Veterinary Medicine Manual [M]. Beijing: Chemical and Chemical Press, 2008.
- [4] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2009.  
Chen Zh G. Veterinary Pharmacology [M]. 3 Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2009.
- [5] 孙晨明. 磺胺氯吡嗪钠—二甲氧苄啶混悬液在鸡的抗球虫药效及药动学研究[D]. 扬州:扬州大学,2012.  
Sun Ch M. The anticoccidial efficacy and pharmacokinetics of sulfachlorpyrazine sodium - dimethoprim suspensions in broiler chickens [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012.
- [6] 唐姝,陈娟,高建龙,等. 饲料中磺胺氯吡嗪钠含量的高效液相色谱检测方法的建立[J]. 南京农业大学学报,2012,2:105-109.  
Tang S, Chen J, Gao J L, *et al.* Establishment of a high performance liquid chromatography method for the determination of sulfachlorpyrazine sodium in feed [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 2:105 - 109.
- [7] 肖文华,郝增坤,孙成明,等. 两种磺胺氯吡嗪钠溶液剂灌服给药在鸡体中的比较药动学研究[J]. 中国兽药杂志,2013,8:26-28.  
Xiao W H, Hao Z K, Sun C M, *et al.* Comparative pharmacokinetics of two sulfachlorpyrazine sodium solutions in broiler chickens [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 8: 26 - 28.
- [8] Sentepe I, Eraslan G. Pharmacokinetics of sulfaclozine in broiler chickens [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 48(1):448-451.
- [9] 孙波,周洪英,吴洪丽,等. 甲氧苄啶在家蚕体内的药代动力学研究[J]. 蚕业科学,2014,1:59-63.  
Sun B, Zhou H Y, Wu H L, *et al.* Pharmacokinetics of trimethoprim in silkworm [J]. Sericulture Science, 2014, 1:59 - 63.
- [10] 夏登宁,夏艳姣,尹佳,等. HPLC 同时测定血浆中头孢氨苄和甲氧苄啶的浓度[J]. 中国抗生素杂志,2008,11:682-700.  
Xia D N, Xia Y B, Yin J, *et al.* Simultaneous determination of Cefalexin and trimethoprim in plasma by HPLC [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2008, 11:682 - 700.

(编辑:侯向辉)