

RP/HPLC 测定吡虫啉血药浓度及其 大鼠灌胃药代动力学评价

龚小见^{1,2,3}, 苏敏^{1,2,3}, 赵超^{1,2,3}, 周欣^{1,2,3*}

(1. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州师范大学 贵州省药物质量控制及评价技术工程实验室, 贵州 贵阳 550001; 3. 贵州师范大学 天然药物
质量控制研究中心, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 建立了大鼠血浆中吡虫啉的反相高效液相色谱(RP/HPLC)分析方法, 并用于吡虫啉在大鼠体内的代谢动力学行为及特征研究。血浆样品经甲醇萃取, 反相 HPLC 法测定血浆中的吡虫啉浓度。色谱柱为 Agilent ZORBAX C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(30:70), 进样量 20 μL, 检测波长 245 nm, 流速 1.0 mL/min。在最佳条件下, 吡虫啉的线性范围为 0.5~100 mg · L⁻¹ (r² = 0.999 8), 检出限为 10 μg · L⁻¹, 平均加标回收率为 74.7%。大鼠单剂量灌胃给予 68.1 mg · kg⁻¹ 吡虫啉, 分别测定给药后不同时间下血浆中吡虫啉的浓度, 并计算代谢动力学参数。灌胃给药后吡虫啉的 C_{max} 为 23.557 mg/L, t_{max} 为 7.333 h, t_{1/2α} 为 4.472 h, AUC_(0-∞) 为 276.727 mg · h/L。代谢动力学结果显示, 吡虫啉在大鼠体内呈二隔室模型分布, 以一级药代动力学方式消除。该方法简便可靠, 能够满足血浆中吡虫啉测定及药代动力学研究的要求。

关键词: 吡虫啉; 药代动力学; 反相高效液相色谱(RP/HPLC)

中图分类号: O657.7; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2018)12-1500-04

Determination of Imidacloprid in Rats' Plasma by RP/HPLC and Its Pharmacokinetics in Rats Receiving Intra-gastric Administration

GONG Xiao-jian^{1,2,3}, SU Min^{1,2,3}, ZHAO Chao^{1,2,3}, ZHOU Xin^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Engineering Laboratory for Quality Control & Evaluation Technology of Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 3. The Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: A reversed phase high performance liquid chromatographic (RP/HPLC) method was established for the determination of imidacloprid in rat plasma, which was used to investigate the imidacloprid's pharmacokinetics in rats by intra-gastric administration. The plasma sample was extracted with methanol, then determined by RP/HPLC. The sample was separated on a C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-water (30:70) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and detected at a wavelength of 245 nm. The imidacloprid concentration in plasma was detected at predetermined time intervals after SD rats were intra-gastrically given a single dose of lutein suspension at 68.1 mg · kg⁻¹, then the concentration time curve was plotted and the pharmacokinetic parameters were calculated. The main parameters for intra-gastric administration were follows: C_{max} = 23.557 mg/L, t_{max} = 7.333 h, t_{1/2α} = 4.472 h, AUC_(0-∞) = 276.727 mg · h/L. There was a linear relationship for imidacloprid (r² = 0.999 8) in the concentration range of 0.5 - 100 mg · L⁻¹ with a detection limit of 10 μg · L⁻¹. The average recovery for the analyte was 74.7%. The pharmacokinetic results in rats showed that imidacloprid was distributed in two compartment models in rats, and eliminated by the first-order pharmacokinetics. The method was simple and reliable, and could satisfy the requirements for the detection of imidacloprid and its pharmacokinetic study in rat plasma.

收稿日期: 2018-04-23; 修回日期: 2018-07-12

基金项目: 贵州省高层次创新人才培养项目(黔科合人才(2015)4033号)

* 通讯作者: 周欣, 教授, 研究方向: 中药质量评价与新药研究, E-mail: alic9800@sina.com

Key words: imidacloprid; pharmacokinetics; reversed phase high performance liquid chromatography (RP/HPLC)

近年来, 各类食品安全事件频发, 威胁人们健康和社会稳定。农产品生产过程中农药的使用会导致其残留在农作物体内, 当农药富集到一定量后将会影响人体健康^[1]。吡虫啉(Imidacloprid)是20世纪80年代由德国和日本农药公司共同开发的一种内吸、高效、残效期长的农用优良新烟碱类杀虫剂, 化学名为1-(6-氯-3-吡啶基甲基)-N-硝基咪唑啉-2-亚胺, 分子式为 $C_9H_{10}ClN_5O_2$ 。其化学性质稳定, 广泛用于种子、叶面和土壤中多种害虫的防治^[2-3]。吡虫啉会使人产生嗜睡、心悸、呕吐、头晕和定向障碍, 严重者导致心率过缓及心肺骤停^[4], 并具有基因毒性和免疫毒性等严重的毒副作用^[5-6]。因此, 分析吡虫啉在动物体内的代谢过程和代谢动力学参数可为合理安全用药提供科学依据。

目前关于吡虫啉在果蔬以及土壤中的残留检测报道较多, 分析方法主要包括高效液相色谱法^[7-10]、高效液相色谱-质谱联用法^[11-14]和气相色谱-质谱联用法^[15], 但对吡虫啉在动物体内的代谢过程研究较少。本文对SD雄性大鼠灌胃 $68.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 吡虫啉(10% LD_{50} 值)^[16], 采用甲醇直接沉淀蛋白质的方法处理血浆样品, 建立了HPLC测定大鼠血浆中吡虫啉含量的方法。同时采用药代动力学软件(DAS 2.0软件)对吡虫啉灌胃给药后大鼠的平均血药浓度~时间数据进行分析, 初步掌握了吡虫啉在动物体内的变化规律。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

DIONEX Ultimate 3000型高效液相色谱仪(包括四元泵处理器、自动进样器、RS柱温箱、二极管阵列检测器以及Chromleon 7.2色谱工作站), TGL-16M型离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司), XS105DU型十万分之一电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), EYELAMG-2200型氮气吹干仪(日本东京理化器械株式会社)。

吡虫啉标准品(纯度98%, 贵州迪大科技有限责任公司); 肝素钠(贵州迪大科技有限责任公司), 以蒸馏水配制成1000 IU/mL; 甲醇(色谱纯, Tedia公司); 甲醇(分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 生理盐水(贵州科伦药业有限公司); 实验用水为自制蒸馏水。

雄性SD大鼠(长沙市天勤生物有限公司), 体重为150~250 g, SPF级, 许可证号: SCXK(湘)2015-0011。

1.2 仪器工作条件

色谱柱为Agilent ZORBAX C_{18} 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(30:70), 进样量20 μL , 检测波长245 nm, 流速1.0 mL/min, 柱温为室温。

1.3 实验方法

1.3.1 对照品溶液的配制 精密称取2.0 mg吡虫啉标准品, 用适量甲醇溶解并定容至10 mL, 配成0.2 g/L的储备液, 使用时以甲醇稀释至所需质量浓度。

1.3.2 供试品的制备 取100 μL 血浆样品置于1.5 mL离心管中, 加入400 μL 甲醇, 涡旋1.0 min充分混匀, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以13 000 r/min离心10 min, 取上清液于1.5 mL空白离心管中, 以40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 残留物加入100 μL 甲醇, 涡旋振荡混合30 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以13 000 r/min离心10 min, 取上清液20 μL 进样。空白血浆按上述方法处理。

1.3.3 吡虫啉的代谢动力学试验 随机选取6只健康雄性SD大鼠, 实验前12 h禁食不禁水, 灌胃给药 $68.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 吡虫啉, 在给药前5 min和给药后0.5、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、12.0、15.0、18.0、20.0、24.0 h, 经眼眶取血0.5 mL, 用肝素钠抗凝的离心管采集血样, 血样在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以13 000 r/min离心10 min, 分离血浆置于空白离心管中, 于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

2 结果与讨论

2.1 蛋白沉淀剂的选择

分别考察了甲醇、乙醇、乙腈、丙酮作为蛋白沉淀剂的效果,发现丙酮作蛋白沉淀剂时对色谱峰有干扰,且操作繁琐;乙醇、乙腈为蛋白沉淀剂时的平均回收率低于甲醇,甲醇为蛋白沉淀剂的平均回收率为 74.7%,因此选择甲醇作为蛋白沉淀剂。

2.2 流动相的选择

考察了甲醇-水和乙腈-水体系为流动相时的分离效果,结果表明,两种流动相均能将吡虫啉与基质干扰峰分开。考虑到成本及环保等因素,最终选择甲醇-水作为流动相,其最优体积比为 30:70。

2.3 方法专属性

取空白血浆,按照“1.3.2”方法处理,精密取 20 μL 进样,得空白血浆的 HPLC 图;取空白血浆,精密加入 100 μL 质量浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吡虫啉对照品,采用上述方法处理,得加标血浆样品的 HPLC 图。由图可知,血浆中的内源性物质不干扰吡虫啉的测定,被测物的色谱峰形良好(图 1)。

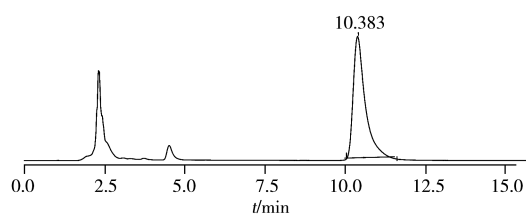


图 1 空白加标血浆($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the blank spiked($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) plasma

2.4 线性范围、检出限及定量下限

取 SD 大鼠空白血浆 8 份,每份 100 μL ,分别加入标准系列对照品溶液,涡旋 1.0 min,按照“1.3.2”方法操作,配成吡虫啉质量浓度为 0.5、2.5、10、20、40、80、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液,精密吸取 20 μL 进样分析。以吡虫啉的质量浓度(X , $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,对应峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。吡虫啉在 0.5~100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.3226X-0.2288$ ($r^2=0.9998$)。以目标化合物与其附近基线噪音的比值(S/N)确定检出限($S/N=3$)及定量下限($S/N=10$),得血浆样品中吡虫啉的检出限为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量下限在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内。

2.5 提取回收率

精密取 SD 大鼠空白血浆 100 μL ,配制吡虫啉质量浓度为 10、15、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每个质量浓度样品各 3 份,按照“1.3.2”方法处理;同法配制吡虫啉质量浓度为 10、15、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,每个质量浓度各 3 份,过 0.45 μm 滤膜后取 20 μL 进样。以空白加标血浆样品与标准溶液的色谱峰面积比值计算回收率,得吡虫啉的平均回收率为 74.7%。

2.6 精密度

精密吸取空白血浆 100 μL ,加入不同质量浓度的吡虫啉对照品溶液 100 μL ,分别配制成 10、15、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个水平的质控样品,按照“1.3.2”方法处理,分别连续进样 3 次计算日内相对标准偏差(RSD);连续测定 3 d,计算日间 RSD。结果表明,样品的日内 RSD 不大于 5.4%,日间 RSD 不大于 6.2%,符合生物样品分析方法指导原则的规定。

2.7 稳定性试验

配制 100 μL 质量浓度分别为 10、15、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吡虫啉加样血浆各 9 份,3 份在室温下放置 24 h 后按照“1.3.2”方法处理和分析,考察样品在室温下的稳定性;3 份于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻,取出融解,反复冻融 3 次后同法处理和分析,考察样品的 3 次冻融稳定性;3 份于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻半个月后取出自然解冻,同法处理和分析,考察样品的长期稳定性。所得结果的 RSD 为 3.7%~9.6%,表明样品的稳定性较好。

2.8 吡虫啉在大鼠体内的药代动力学研究

按照“1.3.3”方法取 100 μL 血浆样品,采用“1.3.2”方法处理后进行测定。所得结果采用药代动力学软件(DAS 2.0 版软件)进行数据处理,绘制动力学曲线(图 2),药代动力学参数见表 1。

结果表明,分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)小于消除半衰期($t_{1/2\beta}$),说明吡虫啉在大鼠体内分布较快,主要以消除为主;达峰时间(t_{\max})为7.333 h,达峰血药浓度(C_{\max})为23.557 mg/L,药时曲线下面积($AUC_{(0-t)}$)为276.727 mg·h/L,表观分布容积(V_d)为842.796 L/kg,清除率(CL)为137.991 L/(h·kg⁻¹),这些数据说明吡虫啉在大鼠体内吸收慢,达峰时间长,血药浓度高,体内分布广,消除速率快;K21 大于 K12,表明吡虫啉从周边室向中央室转运的速率大于从中央室向周边室转运的速率,说明吡虫啉主要分布在血液和血流丰富组织中。综上所述,吡虫啉在大鼠体内呈二隔室模型分布,以一级药代动力学方式消除。

3 结论

本文建立了测定大鼠血浆中吡虫啉含量的 RP/HPLC 方法,该方法前处理简单、回收率较高、稳定性好、操作简便,可用于生物样品中吡虫啉含量的测定。采用所建立的方法研究了 SD 大鼠灌胃给药量为 68.1 mg·kg⁻¹ (10% LD₅₀) 吡虫啉的药代动力学行为,测定了不同时间下血浆中吡虫啉的浓度,并拟合计算了给药后大鼠体内的药代动力学参数,为吡虫啉的合理安全用药提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Wang S Y, Liu Y J, Zhou H X, Zhang A S, Li L L, Men X Y, Zhang S C, Yu Y. *Acta Agric. Jiangxi*(王圣印, 刘永杰, 周红仙, 张安盛, 李丽莉, 门兴元, 张思聪, 于毅. 江西农业学报), **2012**, 24(3): 76-79.
- [2] Chen Y. *Mod. Agric. Sci. Technol.* (陈宇. 现代农业科技), **2017**, (2): 94-97.
- [3] Fan Y J, Shi X Y, Gao X W. *Chin. J. Pestic. Sci.* (范银君, 史雪岩, 高希武. 农药学报), **2012**, 14(6): 587-596.
- [4] Ding F, Han B Y, Liu W, Zhang L, Sun Y. *J. Fluoresc.*, **2010**, 20(3): 753-762.
- [5] Costa C, Silvari V, Melchini A, Catania S, Heffron J J, Trovato A, De Pasquale R. *Mutation Res.*, **2009**, 672(1): 40-44.
- [6] Gawade L, Dadarkar S S, Husain R, Gatne M. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 51(1): 61-70.
- [7] Wang D D, Ding M X. *Agrochemicals*(王丹丹, 丁明祥. 农药), **2010**, 49(8): 576-577, 584.
- [8] Liu W J, Wan Y, Pang X A, Zhang L L. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (刘文杰, 万英, 庞新安, 张利莉. 理化检验-化学分册), **2008**, 44(7): 673-674, 677.
- [9] Wu G, Wu Y H, Bao X X, Zhu X Y. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (吴刚, 吴云华, 鲍晓霞, 朱晓雨. 理化检验-化学分册), **2005**, 41(10): 65-66.
- [10] Liu W J, Wan Y, Pang X A, Zhang L L. *J. Instrum. Anal.* (刘文杰, 万英, 庞新安, 张利莉. 分析测试学报), **2007**, 26(1): 133-135.
- [11] Li J Y, Guo X Y, He J, Wu W Z, Kong D Y, Shan Z J, Chen Q B. *J. Instrum. Anal.* (李菊颖, 郭欣妍, 何健, 吴文铸, 孔德洋, 单正军, 陈全博. 分析测试学报), **2017**, 36(6): 783-787.
- [12] Yi X B, Liang Y S, Huang X Q, Sun H Z, Jiang C, Liu S Q. *J. Instrum. Anal.* (易锡斌, 梁玉树, 黄晓琴, 孙慧珍, 江楚, 刘世琦. 分析测试学报), **2017**, 34(7): 829-835.
- [13] Zhang H C, Ai L F, Guo C H, Zhang J W, Ge S H, Dou C Y, Liu H L. *J. Instrum. Anal.* (张海超, 艾连峰, 郭春海, 张婧雯, 葛世辉, 窦彩云, 刘慧玲. 分析测试学报), **2014**, 33(3): 295-300.
- [14] Zhu L, Wang C, Chen H P, Zhang Y B, Zhou S J, Wang G Q, Liu X. *Chin. J. Anal. Chem.* (诸力, 王晨, 陈红平, 张颖彬, 周苏娟, 王国庆, 刘新. 分析化学), **2017**, 45(4): 529-536.
- [15] Liu Y B, Liu H S, Wang H F. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (刘永波, 刘海山, 王红芳. 理化检验-化学分册), **2007**, 43(1): 23-25.
- [16] Yan W, Zhang Z B, Hu J F, Xia Z L. *J. Environ. Occup. Med.* (闫文, 张忠彬, 胡俊峰, 夏昭林. 环境与职业医学), **2003**, 20(6): 431-435.

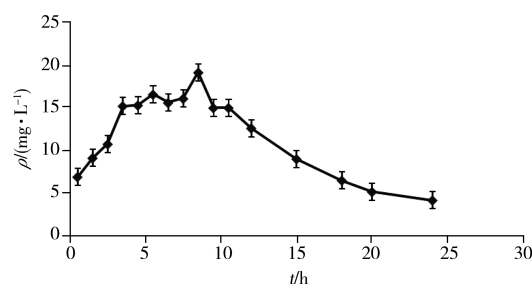


图2 吡虫啉的血药浓度~时间曲线

Fig. 2 Concentration - time curve of imidacloprid in plasma

表1 吡虫啉的药代动力学参数

Table 1 The pharmacokinetic parameters of imidacloprid

Parameter	Unit	Value (mean ± SD)
$t_{1/2\alpha}$	h	4.472 ± 1.251
$t_{1/2\beta}$	h	19.173 ± 25.465
t_{\max}	h	7.333 ± 3.189
C_{\max}	mg/L	23.557 ± 3.219
$AUC_{(0-t)}$	mg·h/L	276.727 ± 33.896
V_d	L/kg	842.796 ± 544.485
CL	L/(h·kg ⁻¹)	137.991 ± 26.966
K10	1/h	0.369 ± 0.387
K12	1/h	0.037 ± 0.056
K21	1/h	0.101 ± 0.059