

杨海峰, 金礼琴, 李勇军, 等. HPLC 法测定吡喹酮注射液中吡喹酮的含量[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 239-240.

HPLC 法测定吡喹酮注射液中吡喹酮的含量

杨海峰^{1,2}, 金礼琴², 李勇军², 卜仕金¹, 陶建平¹

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

摘要:建立了吡喹酮注射液中吡喹酮含量测定的高效液相色谱法(HPLC)。色谱条件:Diamonsil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 25 ℃, 流动相为乙腈-水(60:40), 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 210 nm, 进样量 20 μL。结果显示, 吡喹酮在 6.037~90.55 g/L 范围内线性关系良好($r=0.9994$), 平均回收率为 99.24%, RSD 为 0.769%。结果表明, 所建立的 HPLC 法快速简便、准确可靠, 可用于吡喹酮注射液中吡喹酮含量的测定。

关键词:吡喹酮; HPLC; 测定

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0239-02

吡喹酮(praziquantel)系吡嗪并异喹啉化合物, 是 20 世纪 70 年代中期研制的一种新型抗寄生虫药物, 具有广谱抗血吸虫和抗绦虫作用, 1993 年世界卫生组织(WHO)将其推荐为血吸虫病病原学治疗首选药物^[1-3]。目前, 我国批准用于防治家畜血吸虫病的吡喹酮制剂有吡喹酮片、吡喹酮粉 2 种^[4-5], 但吡喹酮内服给药时吸收不规则, 首过效应强, 生物利用度低、药效维持时间短, 从而给临床治疗效果带来严重影响。因此, 提高生物利用度和延长有效血药浓度维持时间的吡喹酮新制剂开发成为近年来国内外防治血吸虫病的研究热点^[6]。30%吡喹酮混悬注射液是上海兽医研究所与江苏倍康药业联合开发的一种吡喹酮新制剂, 拟用于水牛血吸虫病的治疗。本试验采用一种快速简便、专属性强、灵敏度高、重复性好的反相高效液相色谱法测定吡喹酮注射液中有有效成分吡喹酮的含量, 用于该注射液的质量控制^[7]。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

LC-10Avp 高效液相色谱仪(日本岛津公司); ASI201 自动进样器(大连依利特公司); 色谱工作站(浙江智达公司); UV-2250 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); BS224S 电子天平(北京赛多利斯公司)。吡喹酮标准品, 含量 99.1%, 购自中国药品生物制品检定所; 30%吡喹酮混悬注射液 3 批, 批号 110419、110423、110427, 江苏倍康药业有限公司试制; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 美国 TEDEA 公司产品。

1.2 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温:25 ℃, 流动相:乙腈-水(60:40), 流速:1.0 mL/min, 紫外检测波长:210 nm, 进样量:20 μL。

1.3 溶液的制备

1.3.1 标准品工作液的制备 取吡喹酮标准品 60.37 mg,

加无水乙醇定容至 100 mL, 得浓度为 603.7 g/L 的标准品储备液。使用前用流动相稀释成系列浓度的标准品工作液。

1.3.2 供试品溶液的制备 吡喹酮混悬注射液摇匀, 用移液管精确量取 2 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 用无水乙醇 50 mL, 分 5 次洗涤移液管内壁, 洗液并入容量瓶中, 摇匀, 置水浴中超声 10 min, 加无水乙醇缓慢稀释至刻度, 摇匀。精确量取 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

1.3.3 阴性对照液的制备 按处方比例精确称取吡喹酮混悬注射液中除吡喹酮原料药外的其他成分, 同吡喹酮注射液工艺制备, 再按供试品溶液的制备方法处理, 即获得阴性对照液。

1.3.4 标准曲线的制备 精确量取标准品储备液适量加到流动相中, 得浓度分别为 6.037、12.074、30.185、60.37、90.555 g/L 的标准品工作液, 取 20 μL 进样测定, 以峰面积(A)对吡喹酮浓度(C)进行线性回归, 计算线性回归方程。

1.4 精密度试验

取吡喹酮标准品工作液, 连续重复进样 6 次, 进样量 20 μL, 依法测定峰面积, 观察其峰面积测量值的相对标准偏差。

1.5 稳定性试验

分别在供试品溶液制备 0、4、8、12、24 h 后, 精确量取 20 μL, 依法测定峰面积, 考察其稳定性。

1.6 加样回收率试验

精确取吡喹酮对照品和辅料适量, 按处方制成吡喹酮注射液的模拟样品, 然后制备高、中、低 3 种浓度共 9 份供试品溶液, 测定吡喹酮浓度, 与加入值进行比较, 计算加样回收率。

1.7 样品含量测定

取 6 批样品制成供试品溶液, 分别精确量取 20 μL, 依法测定。

2 结果与分析

2.1 色谱行为

阴性对照液、标准品溶液和供试品溶液的色谱图见图 1, 吡喹酮分离度良好, 峰形尖锐, 保留时间 6.7~6.8 min, 阴性对照液和供试品溶液中的其他组分对吡喹酮的测定无干扰, 方法专属性良好。

收稿日期:2013-04-17

作者简介:杨海峰(1981—), 男, 讲师, 主要从事兽医药理与毒理学研究。E-mail: yhf8142@sina.com。

通信作者:李勇军, 副教授, 研究方向为新兽药开发。E-mail: yf6011@hotmail.com。

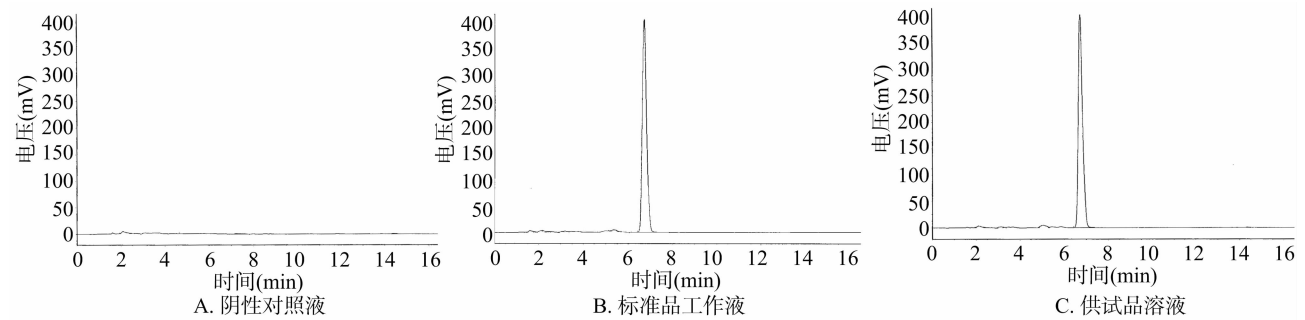


图1 HPLC色谱

2.2 标准曲线

以峰面积(A)对吡喹酮浓度(C)进行线性回归,得回归方程为 $A = 93\ 016C + 135\ 817$ ($r = 0.999\ 4$),线性范围 $6.037 \sim 90.55\ \text{g/L}$ 。

2.3 精密度测定

精密度试验结果见表1。 RSD 为 0.149% ($n = 6$),表明仪器精密度符合要求。

表1 精密度试验结果

次数	峰面积
1	5 674 837.0
2	5 679 889.0
3	5 671 618.0
4	5 682 240.0
5	5 687 187.0
6	5 694 874.5
平均值	5 681 774.25

2.4 稳定性测定

稳定性试验结果见表2。测定液室温放置 24 h,与零时比较含量无显著变化, RSD 为 0.13% ,表明样品溶液在本试验条件下,至少可以稳定 24 h。

表2 稳定性试验结果

时间(h)	峰面积
0	5 690 434.0
4	5 692 707.0
8	5 681 591.0
12	5 674 766.5
24	5 683 592.5
平均值	5 684 618.0

2.5 加样回收率测定

加样回收率试验结果见表3,平均回收率为 99.24% , RSD 为 0.769% 。

2.6 样品含量测定

3 批次吡喹酮注射液含量测定结果见表4,测得吡喹酮注射液的平均含量为标示量的 100.26% ,符合兽药质量标准编写细则的要求。

3 讨论

吡喹酮标准品溶液经紫外可见分光光度计扫描,在 $264\ \text{nm}$ 与 $272\ \text{nm}$ 的波长处有最大吸收峰,起初选择 $264\ \text{nm}$ 作为检测波长。在色谱条件优化时发现,当选择 $210\ \text{nm}$ 作为检测波长时,检测的灵敏度显著提高,故最终将检测波长定为 $210\ \text{nm}$ 。为避免吡喹酮和注射液中辅料的色谱行为相互干扰,筛选了甲醇-水、乙腈-水等流动相,并根据色谱分离效

表3 回收率试验结果

编号	加入量(g/mL)	测得值(g/mL)	回收率(%)
1	52.06	52.01	99.91
2	51.60	50.61	98.09
3	51.35	50.76	98.85
4	60.24	60.42	100.30
5	61.14	60.81	99.45
6	61.96	61.10	98.62
7	71.01	69.90	98.43
8	71.51	71.41	99.86
9	71.82	71.55	99.62
平均			99.24

表4 吡喹酮注射液含量测定结果

批号	标示量的百分含量(%)
110419	100.4
110419	100.6
110423	100.2
110423	100.5
110427	99.8
110427	100.1
平均	100.26

果调整流动相组分的体积比,最终确定流动相为乙腈-水($60:40$)。在此色谱条件下,吡喹酮与杂质分离效果良好,回收率、精密度、稳定性等试验结果进一步验证了试验所建立的方法专属性良好。本试验采用 HPLC-外标法测定吡喹酮注射液中吡喹酮的含量,方法具有快速简便、专属性强、灵敏度高、重复性好的特点,可在 30% 吡喹酮注射液的质量控制实践中应用。

参考文献:

[1] 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,2007,25(6):492-502.
[2] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社,2010:327-328.
[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南:化学药品卷[M]. 2010版. 北京:中国农业出版社,2010:166-167.
[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:一部[M]. 北京:中国农业出版社,2010:108.
[5] 农业部兽药评审中心. 兽药国家标准汇编——兽药地方标准上升国家标准:第一册[M]. 北京:中国农业出版社,2010:52.
[6] 邹永华,丁劲松,马宁. 提高吡喹酮疗效的新制剂技术研究进展[J]. 中南药学,2011,9(1):42-45.
[7] 中国兽药典委员会办公室. 中国兽药典工作手册[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:24-39.