

# 兽用吡喹酮-聚乳酸-羟基乙酸缓释植入棒 含量测定及释放度考察

马丽霞,刘阳,王传栋,王勤

(山东省医疗器械研究所,山东省医用高分子材料重点实验室,济南 250100)

[收稿日期] 2012-11-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0042-04 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 建立了吡喹酮-聚乳酸-羟基乙酸(吡喹酮-PLGA)缓释植入棒含量测定的 HPLC 法,并对其释放度进行了考察。以甲醇-水(100:40, V/V)为流动相,采用 Grace C18 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1.0 mL/min,紫外检测波长 263 nm,在此试验条件下,吡喹酮在 10~200 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好,  $r=0.9999$ ; 平均回收率为 99.48%,  $RSD$  为 0.53% ( $n=9$ )。三批样品的含量分别为 98.96%、98.67% 和 98.81%, 该方法简单、快捷、辅料无干扰、准确度高,适于吡喹酮-PLGA 植入棒的含量测定。吡喹酮-PLGA 植入棒以骨架溶蚀释放机制缓慢释放,释药期可达三周,释放度高于 300 μg/d。

**[关键词]** 吡喹酮; PLGA; 缓释植入棒; 含量测定; HPLC; 释放度

## Determination and Release Rate of Veterinary Sustained-release Praziquantel-PLGA Implants

MA Li-xia, LIU Yang, WANG Chuan-dong, WANG Qin

(Shandong Provincial Key Laboratory of Biomedical Polymers, Shandong Institute of Medical Instruments, Jinan 250100)

**Abstract:** The paper established an HPLC method for determination of the praziquantel-PLGA implants, and investigate release rate. The diamonsil C18 column was used, the mobile phase consisted of methanol and ultrafiltrated water (100:40,  $v/v$ ), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was at 263 nm. Praziquantel has a good linearity at the range of 10~200 μg/mL ( $r=0.9999$ ), and the average recovery was 99.48% with  $RSD$  0.53% ( $n=9$ ). The determinations of three lots samples are 98.96%, 98.67% and 98.81%, respectively. Praziquantel can be slowly released from the implant to three weeks and release rate is more than 300 μg/d. The method is simple, rapid and accurate without excipients interference, and suitable for the determination of the praziquantel-PLGA implants. Praziquantel can be slowly released with the frame-erosion mechanism.

**Key words:** praziquantel; PLGA; sustained-release implant; determination; HPLC; release rate

吡喹酮(Praziquantel)是 Seubert 等人<sup>[1]</sup>于 1977 年研制成功的广谱抗蠕虫药,对血吸虫、包虫、绦虫等均有杀灭作用。该药因其疗效高、副作用小、安

全度高等优点<sup>[2]</sup>,一直是世界上治疗多种寄生虫病的首选药物。中国兽药典已收载片剂为临床治疗用药剂型<sup>[3]</sup>,但这种剂型由于肝首过效应,生物利

用度较低。另外, 由于治疗周期较长, 定期给兽类服用, 不易操作, 且难以落实, 尤其是在农牧区。有研究者曾研究了吡嗪酮硅胶棒<sup>[4]</sup>, 经手术植入皮下或经穿刺导入皮下, 解决了片剂的上述缺陷, 但硅胶为非降解材料, 最终将留存于兽类体内, 影响畜产品的食用。为了解决药物残留问题, 保证畜产品的食用安全, 研究小组以可生物降解的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)为药物载体<sup>[5]</sup>, 设计和研制了一种兽用吡嗪酮缓释植入棒。该植入棒在体内可降解吸收, 降解产物可参与人体的新陈代谢, 最终形成二氧化碳和水被排出体外, 体内无残留。目前, 吡嗪酮-PLGA 植入棒含量测定方法及以 PLGA 为载体的吡嗪酮缓释药棒的释放情况未见报道, 为了有效控制产品质量, 依据吡嗪酮和 PLGA 的特性, 建立了含量测定的 HPLC 法, 并对释放度进行了考察, 为安全用药提供参考依据。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪: Waters2489 检测器, Waters515 泵, Empower Pro 工作站, 美国 waters 公司; UV-2501 紫外-可见分光光度计: 日本 Shimadzu 公司; 电子天平: 德国 Sartorius 公司; 超纯水机: 成都唐氏康宁科技有限公司。

1.2 试剂 PLGA: 自制,  $M_w = 2.0 \times 10^4$ ; 吡嗪酮缓释植入棒: 自制, 规格: 15 mg/支, 样品批号为 20120911, 20120912, 20120913; 吡嗪酮原料药: 浙江海正药业, 批号为 080515; 吡嗪酮对照品: 批号为 100046-200504, 中国食品药品检定研究院; 甲醇: 色谱纯, 天津赛弗瑞; 三氯甲烷: 色谱纯, 美国 JT. Baker 公司; 超纯水: 自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液 精密称取吡嗪酮对照品适量, 以甲醇为溶剂, 配制浓度为 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准贮备液, 取标准贮备液适量, 稀释成 10、50、100、150、200 和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  等系列浓度的标准溶液, 滤过, 备用。

2.1.2 供试品溶液 取植入棒 1 支, 切碎, 精密称重, 置 100 mL 量瓶, 加三氯甲烷 1 mL 使完全溶解, 甲醇定容, 摇匀。经 4000 r/min 离心 20 min<sup>[6]</sup>, 取上清液滤过, 备用。

2.1.3 辅料溶液 取 PLGA 辅料 1 支, 制备方法同供试品溶液。

2.2 波长选择 取 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准溶液在 200~400 nm 波长范围内扫描。结果如图 1 所示。可见吡嗪酮在 263 nm 和 272 nm 波长处各有一个最大吸收, 263 nm 较 272 nm 波长处吸收值大, 为减小测试误差, 选择 263 nm 为 HPLC 检测波长。

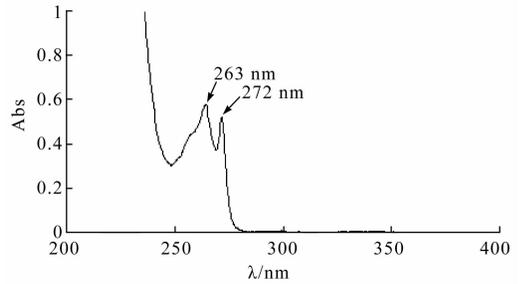


图 1 吡嗪酮紫外吸收曲线

2.3 色谱条件 色谱柱为 Grace C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇-水(100:40, V/V); 检测波长 263 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

2.4 专属性试验 分别取甲醇溶剂、辅料溶液、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准溶液与供试品溶液, 照 2.3 项下的色谱条件进样分析, 结果如图 2 所示。可见吡嗪酮对照品和供试品在 9 min 附近出峰, 而辅料对吡嗪酮的测定无干扰。

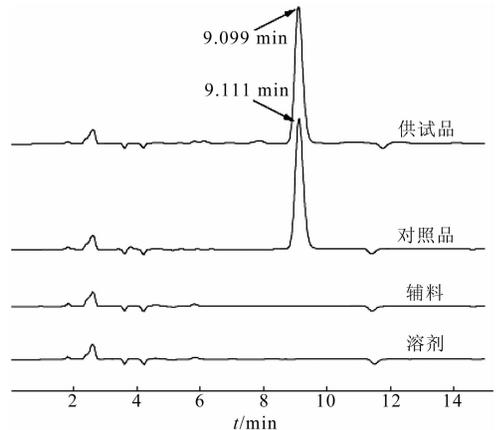


图 2 吡嗪酮溶液及辅料溶液高效液相色谱图

2.5 线性关系考察 分别取 2.1.1 项下 5 个系列浓度的标准溶液, 照 2.3 项下的色谱条件进样测定, 以峰面积  $A$  与浓度  $C$  进行线性回归, 得回归方程  $A = 1535.3C + 3023.8$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ )。结果表

明吡啶酮在 10~200 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 取 100、150、200 μg/mL 标准溶液,照 2.3 项下的色谱条件,分别连续测定 5 次,三

种标准溶液峰面积的 RSD 值分别为 0.12%、0.16% 和 0.14% (如表 1 所示),表明进样精密度良好。

表 1 精密度试验结果

| 样品浓度/<br>(μg · mL <sup>-1</sup> ) | 峰面积/μAU · s |        |        |        |        | RSD/% |
|-----------------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-------|
|                                   | 1           | 2      | 3      | 4      | 5      |       |
| 100                               | 156557      | 157012 | 156891 | 157009 | 157103 | 0.12  |
| 150                               | 233323      | 233727 | 233301 | 232613 | 232906 | 0.16  |
| 200                               | 310184      | 309991 | 309574 | 309453 | 310664 | 0.14  |

2.7 稳定性试验 取批号为 20120911 供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8h 取样,照 2.3 项下的色谱条件,测定 8 h 内供试品溶液峰面积的 RSD 值为

0.39% (如表 2 所示),表明供试品溶液室温下放置 8 h 稳定性良好。

表 2 稳定性试验结果

| 样品批号     | 峰面积/μAU · s |        |        |        |        | RSD/% |
|----------|-------------|--------|--------|--------|--------|-------|
|          | 0 h         | 2 h    | 4 h    | 6 h    | 8 h    |       |
| 20120911 | 230881      | 231026 | 229992 | 228501 | 230150 | 0.39  |

2.8 定量限试验 取 10 μg/mL 标准溶液不断稀释,取稀释液,照 2.3 项下的色谱条件进样测试,按信噪比 S/N = 10 计算定量限,结果测得定量限为 0.1 μg/mL。

2.9 重复性试验 取批号为 20120911 样品 6 支,按 2.1.2 法制备供试品溶液。照 2.3 项下的色谱条件进样测定,外标法计算含量,测得平均含量为 98.89%,RSD 值为 0.44%,表明本方法的重复性良好。

2.10 回收率试验 精密称取植入棒标示量的 80%、100% 和 120% 的原料药各三份,置 100 mL 量瓶,分别加入 1 支植入棒所需的辅料,加入 1 mL 三氯甲烷使其完全溶解,甲醇定容。溶液分别经 4000 r/min 离心 20 min,取上清液滤过,取 20 μL,注入色谱仪,照 2.3 项下的色谱条件测定,按外标法计算,结果如表 3 所示。平均回收率为 99.48%,RSD 值为 0.53% (n=9)。表明该方法回收率较好,准确度高。

表 3 回收率试验结果

| 标示量的倍数 | 取样量/g  | 测试量/g    | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
|--------|--------|----------|--------|---------|-------|
| 80     | 0.0121 | 0.011999 | 99.17  | 99.48   | 0.53  |
|        | 0.0124 | 0.012356 | 99.65  |         |       |
|        | 0.0123 | 0.012087 | 98.27  |         |       |
| 100    | 0.0149 | 0.014854 | 99.69  |         |       |
|        | 0.0151 | 0.015089 | 99.93  |         |       |
|        | 0.0154 | 0.015402 | 100.01 |         |       |
|        | 0.0181 | 0.018048 | 99.71  |         |       |
| 120    | 0.0178 | 0.017706 | 99.47  |         |       |
|        | 0.0182 | 0.018094 | 99.42  |         |       |

2.11 含量测定 取批号为 20120911、20120912、20120913 供试品溶液,照 2.3 项下的色谱条件测定,按外标法计算。测得批号为 20120911、20120912 和 20120913 的含量分别为 98.96%、98.67% 和 98.81%。

2.12 释放度考察 取批号为 20120911 的植入棒 6 支,分别置入 30 mL 超纯水中<sup>[7]</sup>,37 °C ± 1 °C 恒温下于 80 r/min 的摇床中振摇,24 h 更换一次释放液。取释放液,滤过,照 2.3 项下的色谱条件测定,按外标法计算。释放曲线如图 3 所示,可见吡啶酮植入棒使药物缓慢释放出来,释药期可达 21 d,每日释放量大于 300 μg,释放后期出现药物突释现象。累积释放度曲线(图 4)显示,21 d 时累积释放度达 96%。

### 3 讨论

3.1 吡啶酮为疏水药物,不溶于水,可溶于有机溶剂,而 PLGA 不溶于甲醇。在吡啶酮-PLGA 缓释植入棒含量测定中选择用少量三氯甲烷先将植入棒完全溶解,再加甲醇将 PLGA 沉淀的方法处理样

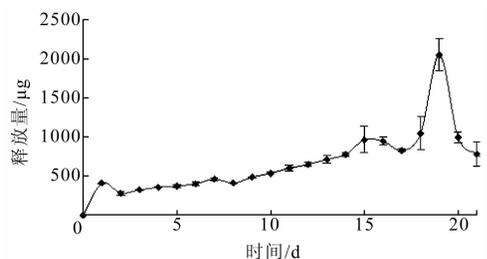


图 3 吡啶酮植入棒释放曲线

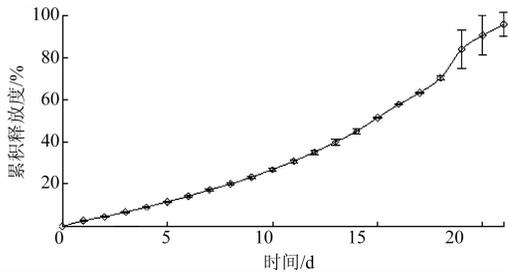


图4 吡嗪酮植入棒累积释放度曲线

品。利用甲醇与三氯甲烷互溶性,使吡嗪酮提取较完全,回收率高,且测试方法简单、快捷,辅料无干扰,含量测定准确度高。

3.2 对植入棒释放度考察,结果显示,吡嗪酮-PLGA缓释植入棒可使吡嗪酮缓慢释放,释药期达3周,每日释放量高于300  $\mu\text{g}$ ,21 d时的累积释放度为96%,起到了缓释的效果。以累积释放度对时间线性回归得 Ritger - Peppas 模型拟合方程<sup>[8]</sup>为:  $\ln y = 1.2423 \ln t + 4.0487$ ,  $r = 0.9848$  (其中  $y = M_t/M_\infty$ ,  $M_t$  为  $t$  时间的累积释放量,  $M_\infty$  为  $\infty$  时间的累积释放量,  $M_t/M_\infty$  为  $t$  时间的累积释放度), 释放参数  $n = 1.2423$ ,  $n > 0.89$ , 由此可推测药物释放为骨架溶蚀作用机制,即药物随着载体的降解被逐渐释放出来。

从释放曲线中还可以看出,2周内各植入棒之间的测量误差较小,2周后误差增大,这应为植入棒载体 PLGA 降解与药物释放共同作用所致。2周内,PLGA 降解较缓慢,药物随着 PLGA 的降解缓慢释放出来,药物的释放,致使植入棒上出现孔洞,并逐渐增多,孔洞的出现,增加了 PLGA 与水的接触面积,加速了 PLGA 的降解。当 PLGA 降解变成碎块时,出现药物突释现象。载体降解与药物释放共同作用致使各植入棒 PLGA 降解变成碎块的时间

不完全一致,因此,出现2周后误差增大现象。

释放后期药物突释现象可能由载体降解速率与药物释放速度不一致所致,还需进一步调整载体降解与药物释放之间的关系,解决后期突释问题,完善制剂的制备。

**致谢:**感谢杨清华、王伶、王晶、张琳、刘葵葵、李永贵、徐伟娜等同事在实验过程中提供的指导和帮助。

#### 参考文献:

- [1] 马 驿,刘 毅,曹小明. 吡嗪酮治疗血吸虫病的研究[J]. 湖南畜牧兽医,2001,(1):4-5.
- [2] 乐文菊,尤纪青,梅静艳. 吡嗪酮预防动物日本血吸虫病的作用[J]. 中国药理学报,1985,6(3):186-188.
- [3] 中国兽药委员会. 中华人民共和国兽药典2010年版[S].
- [4] 焦 伟,柴君杰,吴树春,等. 皮下埋植吡嗪酮缓释剂控制家犬细粒棘球绦虫感染的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1999,9(3):51-53.
- [5] Gomes A J, Faustino A S, Machado A E H, et al. Characterization of PLGA microparticles as a drug carrier for 3-ethoxybenzoyl-2H-benzofuro[3,2-f]-1-benzopyran-2-one ultrastructural study of cellular uptake and intracellular distribution[J]. Drug Deliv,2006,13(2):447-454.
- [6] 沈晓盛,于慧娟,蔡友琼,等. 高效液相色谱法测定水产品中残留的吡嗪酮[J]. 色谱,2007,25(6):861-863.
- [7] 兰 天,卜祥媛,吴慧琴,等. mPEG-PLA 的合成及吡嗪酮聚合物胶束的制备[J]. 中南药学,2011,9(12):881-885.
- [8] Ritger P L, Peppas N A. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs[J]. J Controlled Release,1987,5(1):23-36.

(责任编辑:陈 希)