

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.05.01

伊维菌素吡喹酮咀嚼片含量测定方法的建立

韩宁宁,赵富华,戴青,赵晖,杨秀玉,于晓辉*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2018-12-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 05-0001-09 [中图分类号] S859.2

[摘要] 为了建立伊维菌素吡喹酮咀嚼片同时测定两种主药含量的方法,采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈:水的梯度洗脱系统作为流动相,伊维菌素检测波长为 245 nm,吡喹酮检测波长为 210 nm。在该色谱条件下,溶剂和辅料对伊维菌素和吡喹酮出峰均无干扰,伊维菌素和吡喹酮与相邻杂质峰分离良好。伊维菌素在 2~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围线性关系良好;吡喹酮在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内线性关系良好。伊维菌素回收率为 102.5%,吡喹酮回收率为 99.4%。该方法操作简便,准确度高,重复性好,可用于伊维菌素吡喹酮咀嚼片同时测定两种主药的含量。

[关键词] 伊维菌素吡喹酮咀嚼片;含量测定;伊维菌素;吡喹酮

Establishment of the Content Determination Method for Ivermectin and Praziquantel Chewable Tablets

HAN Ning-ning, ZHAO Fu-hua, DAI Qing, ZHAO Hui, YANG Xiu-yu, YU Xiao-hui*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YU Xiao-hui, E-mail: Shuilon@sina.com

Abstract: In order to establish a content determination method for simultaneous determination of two main drugs in ivermectin and praziquantel chewable tablets, octadecyl silane bonded silica gel was used as filler; acetonitrile-water gradient elution system was used as mobile phase; the detection wavelength of ivermectin was 245 nm and the detection wavelength of praziquantel was 210 nm. In this method, solvents and excipients did not interfere with the peaks of ivermectin and praziquantel; ivermectin and praziquantel were well separated from adjacent impurity peaks. The linear relationship of ivermectin in the concentration range of 2~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was good. The linear relationship of praziquantel in the concentration range of 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was good. The recovery of ivermectin was 102.5%. The recovery of praziquantel was 99.4%. The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of two main drugs in ivermectin and praziquantel chewable tablets.

Key words: ivermectin and praziquantel chewable tablets; content determination; ivermectin; praziquantel

基金项目:“十二五”科技支撑计划(2015BAD11B03-4)

作者简介:韩宁宁,助理研究员,从事兽用抗生素药品检验检测。

通讯作者:于晓辉。E-mail: Shuilon@sina.com

伊维菌素吡喹酮咀嚼片是“十二五”国家科技支撑计划项目研制的新制剂,由伊维菌素、吡喹酮和赋形剂制成的咀嚼片,用于宠物犬体内外寄生虫的治疗。伊维菌素是大环内酯类体内外驱虫药^[1],对丝虫、钩虫、圆虫、鞭虫、蛔虫等均有效果;吡喹酮^[2]对动物体内线虫、吸虫、绦虫有效。通过两种药物组合,扩大驱虫谱,可提高一次性驱虫效果。为保证该制剂的质量可控,安全有效,需建立相应含量测定方法。本文创建了同时测定伊维菌素与吡喹酮的高效液相含量测定方法,并根据《兽药质量标准分析方法验证指导原则》^[3]的要求,对上述方法进行了验证。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与设备 高效液相色谱仪(HPLC)(Waters e2695 色谱系统,Empower 3 色谱工作站);二极管阵列检测器(PDA)(Waters 2998);XS205 分析天平(Mettler Toledo)。

1.2 药品与试剂 对照品名称/来源/批号/含量:伊维菌素/中国兽医药品监察所/K0191406/91.0%;吡喹酮/中国食品药品检定研究院/100046-201205/99.7%。3 批伊维菌素吡喹酮咀嚼片规格/生产企业/批号:伊维菌素 2 mg 与吡喹酮 50 mg/东方澳龙制药有限公司/20170501、20170502、20170503。乙腈(MERCK 公司色谱纯试剂)。其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 方法的建立过程

2.1.1 液相色谱条件的建立 采用《中国兽药典》吡喹酮含量测定液相色谱条件(乙腈:水 60:40),采集吡喹酮与伊维菌素混合对照品色谱图,发现该条件下吡喹酮出峰时间为 6 min,伊维菌素出峰时间为 120 min。如采用该色谱条件仅进行吡喹酮含量测定,伊维菌素会对多批次测定的后续样品的吡喹酮含量测定产生干扰。

为排除伊维菌素对吡喹酮测定的干扰,保证测定结果的准确性,需将伊维菌素与吡喹酮的液相色谱条件合并。合并后的色谱条件需使伊维菌素与吡喹酮在 20 min 内均出峰,溶剂及辅料对主成分测定需均无干扰,且相应分离度及塔板数均应符合药

典要求。

2.1.2 提取溶剂的选择 分别用甲醇及 60%乙腈溶液配制 0.2 mg/mL 的伊维菌素对照品溶液和 5.0 mg/mL 的吡喹酮对照品溶液(上述浓度与供试品拟采用的配制浓度一致)。考察对照品是否能完全溶解,根据测定结果选择合适的溶剂。

2.1.3 提取时间的选择 取片剂适量,研磨后精密称定,置锥形瓶中,精密加入 10 mL 甲醇,平行制备 4 份。各自分别超声 0、2、5、10 min,配制相当于伊维菌素 0.2 mg/mL 的供试品溶液,测定含量,考察提取时间。根据测定结果选择合适的提取时间。

2.1.4 溶液浓度的选择 《中国兽药典》中伊维菌素进样浓度为 0.2 mg/mL,吡喹酮为 0.05 mg/mL。照上述方法配制相当于伊维菌素 0.2 mg/mL 的溶液及相当于吡喹酮 0.05 mg/mL 的溶液,考察测定含量与标示含量的差异。通过测定回收率,进一步确定配制方法准确度是否符合要求。

2.1.5 检测波长的选择 《中国兽药典》中伊维菌素检测波长为 254 nm,USP 中伊维菌素检测波长为 245 nm。《中国兽药典》及 USP 中吡喹酮检测波长均为 210 nm。通过 PDA 检测器采集伊维菌素及吡喹酮光谱图,考察伊维菌素与吡喹酮最大吸收波长,并结合各药典方法,确定合适的检测波长。

2.2 最终建立的含量测定方法 色谱条件与系统适用性试验。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以水为流动相 A,以乙腈为流动相 B,照表 1 进行梯度洗脱,伊维菌素检测波长为 245 nm,吡喹酮检测波长为 210 nm。理论塔板数按吡喹酮峰和伊维菌素 H_2B_{1a} 峰计算,均应不低于 3000,伊维菌素 H_2B_{1a} 与 H_2B_{1b} 峰的分离度应不小于 3.0,吡喹酮峰与相邻峰的分离度应不小于 1.5。

测定法。取本品 20 片,精密称定,计算平均片重。研细,取约 0.8 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,超声 5 min,静置至室温,取上清液过滤,作为伊维菌素供试品溶液;精密量取上述溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为吡喹酮供试品溶液。取伊维菌素和吡喹酮对照品适量,用甲醇分别配制为每 1 mL 中约含

0.2 mg和 0.05 mg 的溶液,作为对照品溶液,同法测定。精密量取上述对照品溶液和供试品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,即得。

表 1 含量测定梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution condition for content determination

时间/min	流动相 B/%	流动相 A/%
0	60	40
6	60	40
6.01	100	0
17	100	0
17.01	60	40
22	60	40

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性 采集提取溶剂、辅料、对照品及供试品溶液色谱图,考察提取溶剂及辅料在伊维菌素及吡喹酮出峰时间有无干扰。

2.3.2 检测限与定量限 配制不同浓度伊维菌素及吡喹酮对照品溶液测定相应信噪比,以信噪比约为 3 : 1 时的浓度为检测限,信噪比约为 10 : 1 时的浓度为定量限。

2.3.3 线性和范围 分别配制浓度为 2、4、10、20、40、80、200、400 μ g/mL 的伊维菌素对照品溶液,及浓度为 1、2、5、10、20、50、100 μ g/mL 的吡喹酮对照品溶液,采集色谱图,以峰面积与对照品浓度作图,用最小二乘法进行线性回归。考察在上述两个浓度范围内,伊维菌素及吡喹酮峰面积与浓度是否线性关系良好。

2.3.4 准确度 取空白辅料 0.75 g,精密加入伊维菌素对照品 2 mg 及吡喹酮对照品 50 mg,置锥形瓶

中,精密加入甲醇 10 mL,超声 5 min,静置至室温,取上清液滤过,精密量取滤液 20 μ L 注入液相色谱仪,采集 245 nm 色谱图。精密量取续滤液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,采集 210 nm 色谱图。平行配制 6 份上述 100% 浓度水平的供试品溶液,分别测定伊维菌素及吡喹酮回收率。

2.3.5 精密度(中间精密度) 两位检验员各测定该批片剂的 3 份平行样品,伊维菌素相对平均偏差应小于 6%,吡喹酮相对平均偏差应小于 4%。

2.3.6 溶液稳定性 考察伊维菌素及吡喹酮对照品溶液室温放置 24 h 内不同时间点伊维菌素及吡喹酮主峰面积的变化以评价溶液稳定性。

2.3.7 耐用性 考察不同柱温(25、30、35 $^{\circ}$ C)、流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同品牌色谱柱对耐用性的影响。

3 结果与分析

3.1 方法的建立过程

3.1.1 液相色谱条件的建立 采用整合后的色谱系统(表 1),使吡喹酮在乙腈:水(60 : 40)的梯度范围(0~6 min)内出峰,伊维菌素在乙腈:水(100 : 0)的梯度范围(6.01~17 min)内出峰,溶剂及辅料对主成分测定均无干扰,且相应分离度及塔板数均符合药典要求(图 3~图 10)。

3.1.2 提取溶剂的选择 甲醇或 60% 乙腈两种溶剂均可使两种对照品完全溶解。考虑到甲醇作为溶剂无需配制,更为简单方便,选取甲醇作为提取溶剂。

3.1.3 提取时间的选择 根据表 2 结果,超声 5 min 后,测定结果不再升高,提示主成分已全部溶解。因此,确定提取方式为:以甲醇作为溶剂,超声 5 min。

表 2 提取时间的选择

Tab 2 Selection of extraction time

溶剂	甲醇	甲醇	甲醇	甲醇
超声时间/min	0	2	5	10
伊维菌素含量/%	72.12	98.98	100.70	100.64

3.1.4 溶液浓度的选择 照 2.1.4 所示浓度配制供试品溶液, 三批供试品测定含量均在标示含量的 100% 左右, 结果见表 3。回收率结果见 3.2.4 项, 伊维菌素与吡喹酮回收率均符合要求。提示伊维菌素进样浓度为 0.2 mg/mL, 吡喹酮进样浓度为 0.05 mg/mL 为合理的溶液浓度。

3.1.5 检测波长的选择 通过 PDA 检测器采集伊维菌素及吡喹酮光谱图, 发现伊维菌素最大吸收波长为 244.2 nm, 吡喹酮在 200~230 nm 之间无明显波峰, 但吸收由高至低下降(图 1~图 2)。故采用

245 nm 作为伊维菌素的检测波长, 210 nm 作为吡喹酮的检测波长。

表 3 三批供试品含量测定结果

Tab 3 Determination results of three batches of samples

批号	伊维菌素含量/%	吡喹酮含量/%
20170501	101.7	101.7
20170502	100.6	98.9
20170503	99.8	101.5

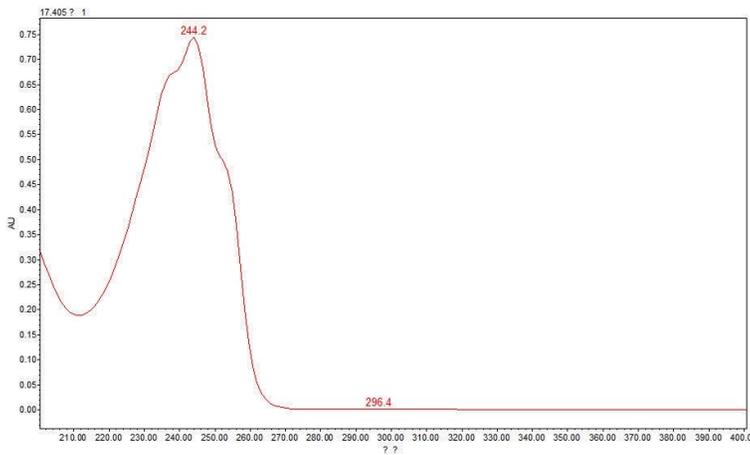


图 1 伊维菌素 H₂B_{1a} PDA 光谱图

Fig 1 PDA spectrum of Ivermectin H₂B_{1a}

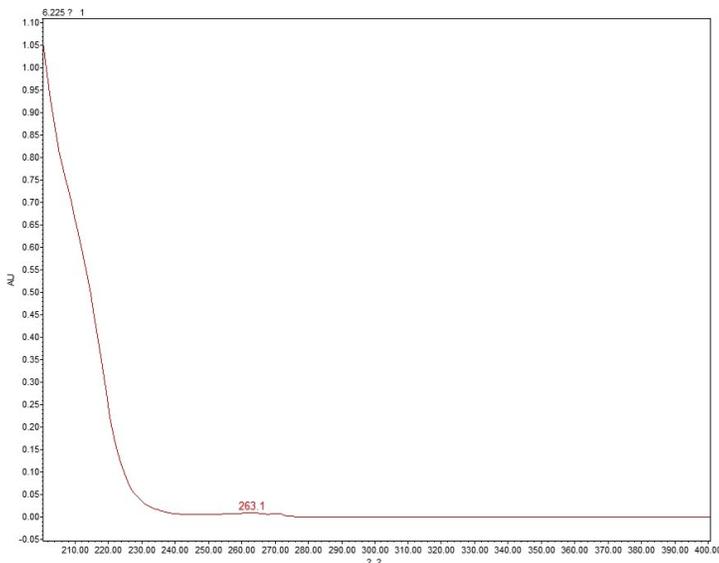


图 2 吡喹酮 PDA 光谱图

Fig 2 PDA spectrum of praziquantel

3.2 方法学验证

3.2.1 专属性 提取溶剂及辅料在伊维菌素及吡喹酮出峰时间均无干扰(图 3~图 10)。

3.2.2 检测限与定量限 该方法伊维菌素 H₂B_{1a} 检测限为 0.4 μg/mL,定量限为 1.2 μg/mL。吡喹酮检测限为 0.5 μg/mL,定量限为 1.0 μg/mL。

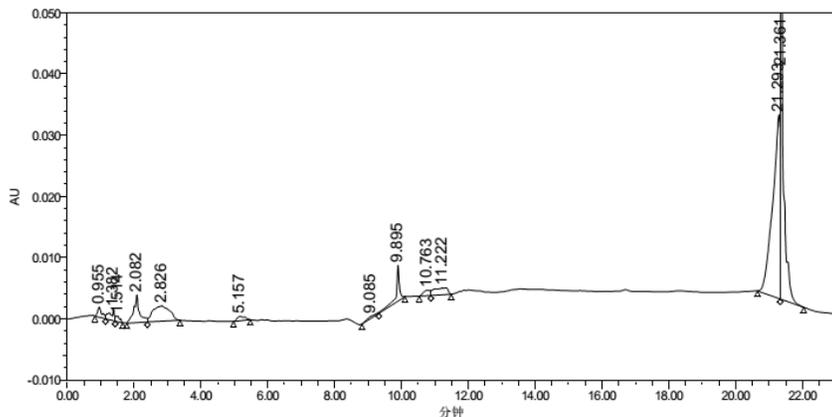


图 3 甲醇在 210nm 下色谱图

Fig 3 Chromatogram of methanol at 210 nm

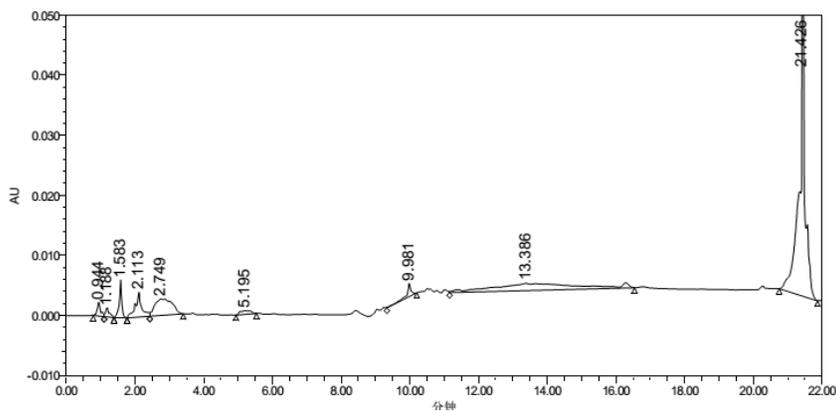


图 4 辅料在 210nm 下色谱图

Fig 4 Chromatogram of excipients at 210 nm

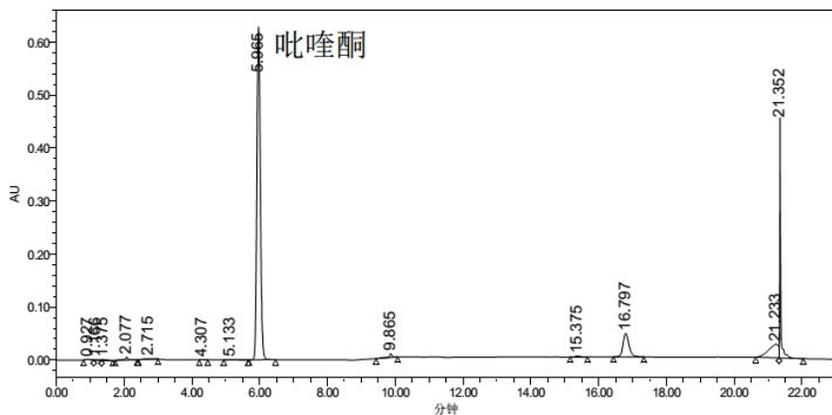


图 5 吡喹酮对照品在 210nm 下色谱图

Fig 5 Chromatogram of praziquantel reference at 210 nm

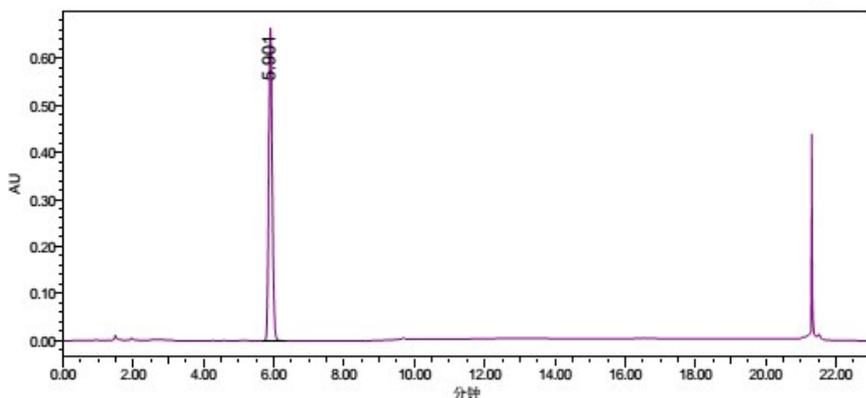


图 6 供试品在 210nm 下色谱图

Fig 6 Chromatogram of the sample at 210 nm

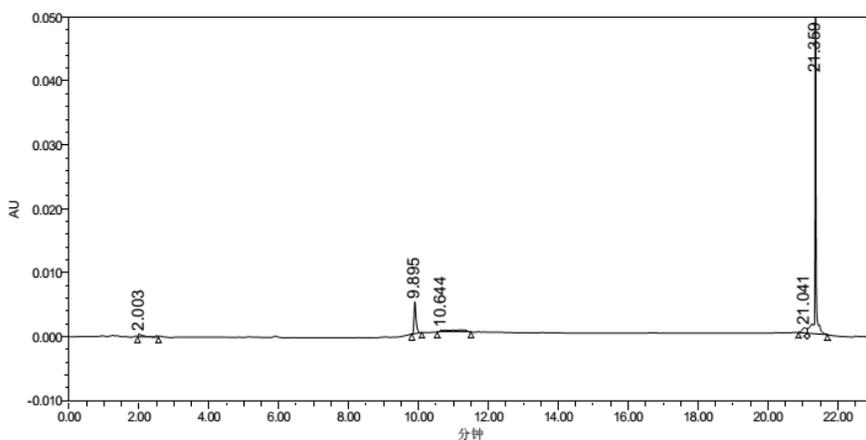


图 7 甲醇在 245nm 下色谱图

Fig 7 Chromatogram of methanol at 245 nm

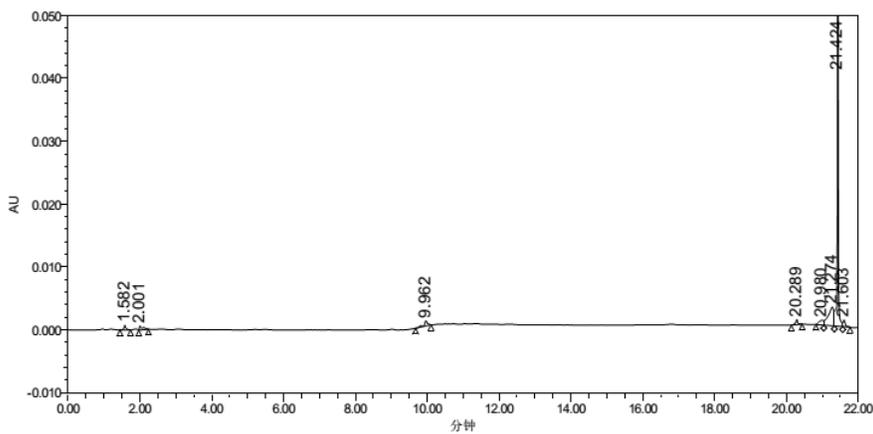


图 8 辅料在 245nm 下色谱图

Fig 8 Chromatogram of excipients at 245 nm

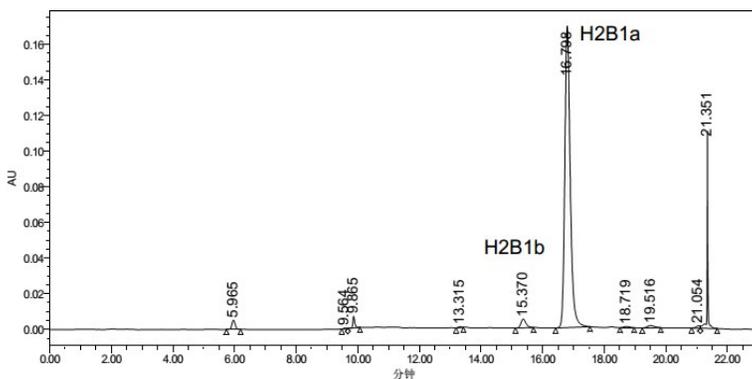


图 9 伊维菌素对照品在 245nm 下色谱图

Fig 9 Chromatographic Chart of Ivermectin Reference at 245 nm

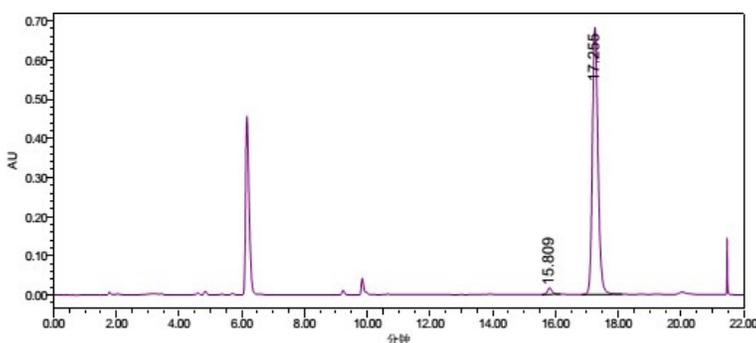


图 10 供试品在 245nm 下色谱图

Fig 10 Chromatogram of the sample at 245 nm

3.2.3 线性和范围 伊维菌素峰面积与浓度线性方程为： $y = 41323x - 95474, r = 0.9999$ ；吡喹酮峰面积与浓度线性方程为： $y = 95361x - 27338, r = 0.9999$ 。表明伊维菌素在 2~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内，吡喹酮在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内，峰面积与浓度

线性关系良好。

3.2.4 准确度 处方回收率结果如表 4 所示。结果符合要求。

3.2.5 中间精密性 结果如表 5~表 6 所示。结果符合要求。

表 4 伊维菌素及吡喹酮回收率结果

Tab 4 Result of recovery of ivermectin and praziquantel

伊维菌素添加量/mg	伊维菌素回收率/%	吡喹酮添加量/mg	吡喹酮回收率/%
1.95	105.01	50.33	100.74
1.85	102.46	49.71	95.15
2.07	103.68	50.00	97.75
2.01	101.09	50.15	100.23
2.04	98.19	50.14	99.85
2.42	104.56	50.20	102.55
伊维菌素平均回收率/%	102.5	吡喹酮平均回收率/%	99.4
RSD/%	2.4	RSD/%	2.5

表 5 伊维菌素精密度测定结果

Tab 5 Precision determination results of ivermectin

检验员	含量 1/%	含量 2/%	含量 3/%	平均含量/%	中间精密度 相对平均偏差/%	总平均含量/%
1	100.67	101.47	101.14	100.76	0.1	100.6
2	102.49	99.17	99.78	100.48		

表 6 吡喹酮精密度测定结果

Tab 6 Precision determination results of praziquantel

检验员	含量 1/%	含量 2/%	含量 3/%	平均含量/%	中间精密度 相对平均偏差/%	总平均含量/%
1	99.74	100.54	99.97	100.08	0.3	99.8
2	101.70	99.09	97.86	99.55		

3.2.6 溶液稳定性 结果如表 7 所示。伊维菌素对照品溶液在室温放置 2 h 内稳定,之后峰面积逐渐降低,但 24 h 内 RSD 仍仅为 0.9%,基本稳定;吡喹酮对照品溶液在室温放置 24 h 稳定。

3.2.7 耐用性 结果如表 8 所示。在该表所述各个条件下,理论塔板数按 H_2B_{1a} 峰计算均不低于 3000,伊维菌素 H_2B_{1a} 与 H_2B_{1b} 峰的分度度均不小于 3.0,理论板数按吡喹酮峰计算均不低于 3000。

4 讨论与结论

由于处方中伊维菌素与吡喹酮两种主药规格差异较大(2 mg 与 50 mg),如果为简化试验操作,采用相同的进样浓度,在伊维菌素与吡喹酮各自的最大吸收波长(245 nm 与 210 nm)附近提取色谱图,会导致伊维菌素峰面积过小,或者吡喹酮峰面积过载,二者均影响测定的准确性,因而本方法伊维菌素和吡喹酮采用了两种不同的供试品浓度进样。

但如果伊维菌素和吡喹酮均采用 245 nm 作为提取波长,采用未经第二步稀释的伊维菌素供试品溶液进样,同时测定伊维菌素和吡喹酮,二者峰面积均处于合适的范围(图 11),且无需进一步稀释配制吡喹酮供试品溶液,简化了试验操作。采用该简化方法测定批号为 20170502 的供试品,结果与最终采用的方法相比,无显著差异(表 9)。但考虑到 245 nm 恰好处于吡喹酮紫外光谱图的波谷位置,仪器对于浓度变化的灵敏度较低,易产生试验

误差,因此,最终未采用该简化方法。

表 7 伊维菌素及吡喹酮稳定性结果

Tab 7 Stability results of ivermectin and praziquantel

时间/h	伊维菌素 H_2B_{1a} 与 H_2B_{1b} 峰面积和	吡喹酮峰面积
0	7545012	4563791
1	7542843	4662437
2	7530075	4636088
6	7468629	4632457
12	7455298	4566992
24	7380933	4589891
平均峰面积	7487132	4608609
RSD/%	0.9	0.9

表 8 耐用性结果

Tab 8 Durability results

	H_2B_{1a} 峰 理论板数	H_2B_{1a} 与 H_2B_{1b} 峰 分离度	吡喹酮峰 理论板数
柱温 25 °C	40748	4.0	17084
柱温 30 °C	46993	4.0	17249
柱温 35 °C	55129	4.0	17091
流速 0.8 mL/min	46934	4.3	17918
流速 1.0 mL/min	46993	4.0	17249
流速 1.2 mL/min	48000	4.0	15606
Alltima C18 柱	46993	4.0	17249
XBrige C18 柱	66317	4.0	12466
YMC C18 柱	121612	3.2	17522

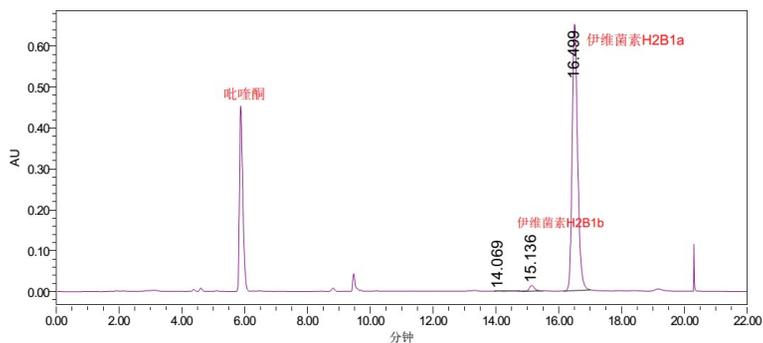


图 11 245 nm 下伊维菌素与吡喹酮色谱图

Fig 11 Chromatogram of ivermectin and praziquantel at 245 nm

表 9 简化方法与最终采用的方法测定结果的比较

Tab 9 Comparison of the results of simplified and final methods

	供试品含量 1/%	供试品含量 2/%	平均值/%
简化方法	98.77	99.02	98.9
最终采用的方法	98.21	99.56	98.9

参考文献:

[1] 杨森,熊尚清,杨敬,等. 伊维菌素防治动物寄生虫病的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医, 2017,(5上): 83-85.
 Yang S, Xiong SQ, Yang J, et al. Advances of Ivermectin in the Control of Animal Parasitic Diseases[J].Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017,(5 Part I): 83-85.

[2] 吴德智,马正,刘运峰,等. 吡喹酮制剂的发展和应[用].中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(2): 194-196.
 Wu DZ, Ma Z, Liu YF, et al. Development and application of

praziquantel preparations[J].Chin J Schisto Control, 2013, 25 (2): 194-196.

[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典一部[M]. 2015 年版. 北京: 中国农业出版社.
 Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. The first volume of Chinese Veterinary Pharmacopoeia [M]. 2015 Edition. Beijing: China Agriculture Press.

(编辑:侯向辉)