

伊维菌素聚乳酸微球制备条件的 优化及药物含量测定^{*}

王敏儒 陈杖榴 冯淇辉

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 用乳化溶剂挥发法制备了伊维菌素(IVM)聚乳酸(PLA)微球。试验采用 $L_{18}(3^7)$ 正交设计, 以微球粒径分布为主要优选水平, 结合微球收率和包裹率, 筛选出最佳制备条件: 连续相为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚乙烯醇(PVA)水溶液; 分散相为 PLA(M_r 8.2 万, 投量 2.0 g)和 IVM 原料药(0.67 或 1.00 g)溶于 25 mL 二氯甲烷; 搅拌速度为 $450\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温下搅拌 12 h 挥干二氯甲烷, 过滤收集微球。所得微球干燥后呈白色粉末状, 微球平均收率为 $87.90\%\pm 1.16\%$ [$w(\text{IVM})$ 理论值为 25.0%] 和 $88.33\%\pm 2.68\%$ [$w(\text{IVM})$ 理论值为 33.3%]。采用溶解沉淀法, 以 RP-HPLC-UV 法测定微球中药物含量; 以二氯甲烷和甲醇(1:9)为溶媒, 可完全沉淀聚合物; 药峰分离完全, 无干扰峰; 平均回收率为 $95.85\%\pm 0.84\%$ 。

关键词 伊维菌素; 微球; 聚乳酸; 正交设计; 高效液相色谱

中图分类号 S859.6

伊维菌素(ivermectin, IVM)是一种新型高效、广谱、安全的抗生素, 对多种体内外寄生虫有效, 并与其他抗寄生虫药无交叉耐药性(Campell, 1989)。国内外兽医临床广泛应用的制剂有注射剂及一些内服制剂; 也已研制了一些长效控释制剂(徐慧斌等, 1996; Egerton et al, 1986)。微球(microspheres, MS)制剂因其具有控制释药、靶向给药和降低毒副作用等特点, 应用范围越来越广(王亚敏等, 1996; 周芝芳等, 1991; Couvreur et al, 1995)。兽医学界已开始研究 IVM 在较低组织浓度或血液浓度即可控制体内体表寄生虫, 适于制备 MS 制剂。笔者采用多因素多位级正交设计, 通过分析制备因素对 MS 形态、大小及含药量的影响, 优选了制备含 IVM 的聚乳酸[poly(*d,l*-lactic acid), PLA] MS 的条件, 制备了用于体内外释药试验的 MS; 并建立了测定 MS 中 IVM 含量的 HPLC-UV 法, 为进一步研究其体内外释药特征打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

药品与试剂: IVM 原料药(北京拜耳生物技术研究所、上海兽药厂联合生产, 批号 94003), IVM 标准品[中国兽药监查所惠赠, $w(\text{H}_2\text{B}_{1a})=95.36\%$], PLA(中国科学院成都有机化学研究所, M_r 分别为 4.8 万、6.5 万和 8.2 万), 聚乙烯醇(PVA-124, 日本原产, 广州化学试剂玻璃仪器批发部分装, 批号 930628), 二氯甲烷、甲醇及其他试剂均为分析纯, 国产。

仪器: 超级恒温水浴(CS-501 型, 上海沪南科学仪器联营厂), 恒温水浴振荡器(HZS 型,

哈尔滨东联电子技术开发有限公司), 电动搅拌器(6511 型, 上海标本模具厂), 高效液相色谱仪(HP1100 系列, 美国惠普公司), 台式离心机(80—2B 型, 上海安亨科学仪器厂).

1.2 最佳制备条件的选择

微球的制备参考文献方法(Bodmeier et al, 1988; Spenlehauer et al, 1986), 采用乳化-溶剂挥发法进行. 经预试, 确定了因素位级表(见表 1), 按 $L_{18}(3^7)$ 正交设计安排试验(陆彬等, 1994), 以优选制备条件.

表 1 因素位级表¹⁾

位级	$\rho(\text{PVA})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$V_{\text{有机相}}/\text{mL}$	$M_r(\text{PLA})/\text{万}$	D/g	D'/g	$n/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$
1	10	20	6.5	2.0	$1/4\times D$	250
2	15	25	8.2	2.5	$1/3\times D$	450
3	20	30	8.2	3.0	$1/2\times D$	600

1) D 为 PLA 投量; D' 为 IVM 投量, 随 PLA 投量的变化而改变; n 为搅拌速度

1.3 MS 中药物含量的测定

样品预处理: 精密称取 MS 样品约 20 mg, 置于 12 mL 具塞试管中, 加二氯甲烷 1 mL 溶解, 加甲醇 9 mL, 混匀, $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液用甲醇定容至 10 mL 适当稀释后用于 HPLC 测定.

标准曲线: 精密称取 IVM 标准品 0.052 4 g, 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 得 $\rho(\text{H}_2\text{B}_{1a})=500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准储备液; 精密移取此标准储备液 5.0 mL, 用甲醇定容至 50 mL 得标准中间液, 稀释后得不同浓度的标准工作液, 经 HPLC 测定后对浓度和峰面积进行直线回归, 得到标准曲线.

回收率与变异系数: 取伊维菌素原料药约 5 mg, 空白微球 15 mg, 精密称定; 从 $w(\text{IVM})$ 理论值为 20% 的 3 批 MS 样品中, 分别称取约 20 mg 各 5 份, 按照样品预处理方法处理并测定药物含量.

色谱条件: 色谱柱为 ODS Hypersil, $5\text{ }\mu\text{m}$, $125\text{ mm}\times 4\text{ mm}$; 流动相为甲醇: 水 (90:10, V/V), 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 245 nm.

2 结果与讨论

2.1 正交试验结果

在正交设计的条件范围内, 所得微球在大小、形态等方面有一定的差异, 粒径范围在 10~200 μm ; MS 收率在 72% 以上, 见表 2.

计算各因素不同位级平均粒径及其标准差之和, 以此为纵坐标, 以因素类别为横坐标作图(见图 1).

分析表 2 和图 1, 以极差 R 排序, 影响平均粒径的因素分别是: 搅拌速度(n) $\gg$ PLA 投量(D) $\gg$ IVM 投量(D') $\gg$ $\rho(\text{PVA})\gg M_r(\text{PLA})\gg V_{\text{有机相}}$; 影响粒径分布的因素分别是: $D\gg n\gg V_{\text{有机相}}\gg \rho(\text{PVA})\gg D'\gg M_r(\text{PLA})$.

可见, 搅拌速度、PLA 及 IVM 投量是本试验条件下影响 MS 大小的主要因素. PLA 投量增加, 粒径增大; IVM 投量增加, 平均粒径却减小; 搅拌速度提高, 平均粒径趋小. 有机相容积和 $M_r(\text{PLA})$ 对粒径的影响较小. PLA 投量、搅拌速度仍是影响平均粒径标准差大小的主要因素, 其次是有机相容积和 $\rho(\text{PVA})$. 增加连续相粘度、加大 PLA 投量, 粒径分布更趋分散; 而增加分

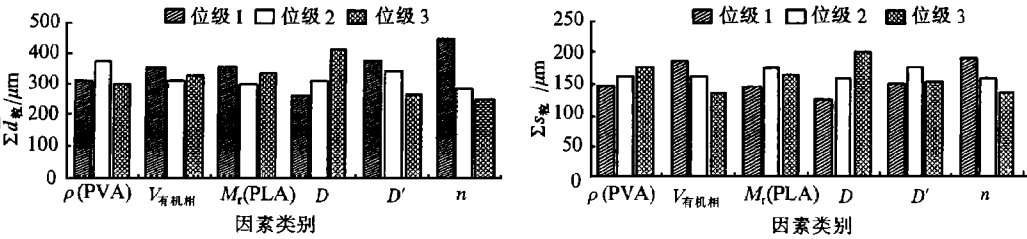
表 2 正交试验结果表¹⁾

试验 序号	$\rho(\text{PVA})$ /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$V_{\text{有机相}}$ /mL	$M_r(\text{PLA})/\text{万}$	D/g	D'/g	$n/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	$\overline{d}_{\text{粒}}/\mu\text{m}$	$s_{\text{粒}}/\mu\text{m}$	MS 收率/%
1	10(1)	20(1)	8.2(3)	2.5(2)	0.83(2)	250(1)	82.50	36.88	89.30
2	15(2)	20(1)	6.5(1)	2.0(1)	0.50(1)	450(2)	61.84	16.86	93.22
3	20(3)	20(1)	8.2(2)	3.0(3)	1.50(3)	600(3)	46.33	35.77	72.67
4	10(1)	25(2)	8.2(2)	2.0(1)	0.67(2)	600(3)	35.44	16.14	81.50
5	15(2)	25(2)	8.2(3)	3.0(3)	0.75(1)	250(1)	118.00	36.77	90.76
6	20(3)	25(2)	6.5(1)	2.5(2)	1.25(3)	450(2)	51.27	26.46	86.69
7	10(1)	30(3)	6.5(1)	3.0(3)	0.75(1)	600(3)	68.88	15.11	87.50
8	15(2)	30(3)	8.2(2)	2.5(2)	1.25(3)	250(1)	65.08	22.09	88.65
9	20(3)	30(3)	8.2(3)	2.0(1)	0.67(2)	450(2)	36.31	17.91	86.57
10	10(1)	20(1)	6.5(1)	2.0(1)	1.00(3)	250(1)	48.37	23.95	90.05
11	15(2)	20(1)	8.2(2)	3.0(3)	1.00(2)	450(2)	67.51	44.92	89.11
12	20(3)	20(1)	8.2(3)	2.5(2)	0.63(1)	600(3)	39.96	25.97	80.87
13	10(1)	25(2)	8.2(3)	3.0(3)	1.50(3)	450(2)	29.95	28.24	84.31
14	15(2)	25(2)	6.5(1)	2.5(2)	0.83(2)	600(3)	32.77	22.70	88.00
15	20(3)	25(2)	8.2(2)	2.0(1)	0.50(1)	250(1)	45.71	30.83	87.96
16	10(1)	30(3)	8.2(2)	2.5(2)	0.63(1)	450(2)	39.87	23.74	97.88
17	15(2)	30(3)	8.2(3)	2.0(1)	1.00(3)	600(3)	29.41	18.18	90.99
18	20(3)	30(3)	6.5(1)	3.0(3)	1.00(2)	250(1)	85.20	38.00	90.00

1) D 为 PLA 投量; D' 为 IVM 投量, 随 PLA 投量的变化而改变; n 为搅拌速度; $\overline{d}_{\text{粒}}$ 和 $s_{\text{粒}}$ 分别为平均粒径及其标准差; 表中括号内的数字代表位级

散相粘度、加快搅拌速度, 粒径分布更趋集中. 各因素不同位级间 MS 收率的差异都不大, MS 收率最低为 72%, 最高达 97%. 在本试验正交设计条件下, MS 收率均较高.

根据正交试验结果, 主要依据平均粒径及其标准差, 结合收率及包裹率, 确定最佳制备条件如下: 连续相为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PVA 250 mL, 分散相为二氯甲烷 25 mL, $M_r=8.2$ 万的 PLA 投量 2.0 g, IVM 投量分别为 1.00 和 0.67 g; 搅拌速度为 $450\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 室温下搅拌形成 o/w 乳剂, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续搅拌 12 h 挥干有机溶剂. 依此条件制备 $w(\text{IVM})$ 理论值为 25.0% 和 33.3% 的 MS, 用于体外释药试验和药动力学研究. 本试验以粒径分布为主要优选水平, 旨在提高粒径在 $60\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 之间 MS 的收率; 而选择 M_r 为 8.2 万的 PLA, 则是基于 M_r 越高, MS 在体内释药越缓慢.



D 为 PLA 投量; D' 为 IVM 投量, 随 D 的变化而改变; n 为搅拌速度; $\overline{d}_{\text{粒}}$ 和 $s_{\text{粒}}$ 分别为平均粒径及其标准差

图 1 制备条件对粒径分布的影响

2.2 回收率与变异系数

预处理溶媒的选择: 本实验选择了二氯甲烷和甲醇为混合溶媒, 筛选出二者之比为 1:9 时, 聚乳酸沉淀完全, 离心后上清澄清. 经 HPLC 测定, 药峰分离完全, 无杂质干扰.

HPLC 色谱分离情况: 在所选色谱条件下, H_2B_{1a} 和 H_2B_{1b} 的保留时间分别为 4.4 和 3.8 min 左右, 空白样品无干扰峰.

标准曲线、回收率及精密度: 标准曲线为 $C = -0.06877 + 0.0001183A$ (A 为色谱峰面积), $r = 0.9997$, 线性范围是 $0.625 \sim 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 以样品处理稀释后的实测浓度对理论浓度之比为相对回收率, 结果显示平均回收率为 $95.85\% \pm 0.84\%$; 取 $w(\text{IVM})$ 理论值为 20.0% 的 MS 样品, 测定实际含药量, 求得批内变异系数分别为 1.72% 、 3.86% 和 0.77% , 批间变异系数为 2.68% , 说明以本方法测定微球中伊维菌素的含量误差较小, 重现性好.

2.3 不同批次制备的 MS 中药物含量

经测定, 原料药中平均 $w(H_2B_{1a})$ 为 $87.78\% \pm 0.28\%$ ($n = 5$). 按上述方法测定 MS 中 H_2B_{1a} 含量, 再换算为 IVM 含量. 按照优选条件制备的 $w(\text{IVM})$ 理论值为 25.0% 和 33.3% 的 MS, $w(\text{IVM})$ 实测值分别为 $24.48\% \pm 0.60\%$ 和 $31.97\% \pm 1.54\%$, 平均包裹率分别为 $97.90\% \pm 2.41\%$ 和 $95.13\% \pm 4.66\%$.

表3显示, 不同含药量的 MS, 在制备当天及室温下存储 30、60 和 90 d, $w(\text{IVM})$ 实测值无显著差异. 本研究表明, 将 IVM 制成 PLA 微球制剂, 可望在室温下长期存放, 这也是制备 MS 制剂的目的之一. 有关 MS 在不同保存条件下的稳定性研究, 尚待今后进行.

表3 室温下保存 90 d 内微球中药
物质量分数的实测值($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 5$)¹⁾

t/d	$w(\text{IVM})/\%$		
	S_1	S_2	S_3
0	19.72 ± 0.34	24.51 ± 0.53	32.68 ± 0.53
30	19.64 ± 0.58	24.41 ± 0.87	32.92 ± 0.80
60	19.43 ± 0.36	24.43 ± 0.34	32.82 ± 0.59
90	19.31 ± 0.54	24.40 ± 0.84	32.36 ± 0.63

1) S_1 、 S_2 和 S_3 分别为 $w(\text{IVM})$ 理论值 20.0% 、 25.0%

和 33.3% MS

3 小结

以 PLA 为囊材, 采用乳化溶剂挥发法, 制备了含 IVM 的 MS. 采用多因素多位级正交设计, 初步筛选了最佳制备条件, 但要获得适合不同用途的 MS 制剂, 尚需参考体内释药试验, 进一步优化制备方法.

准确测定 MS 中药物含量, 是制备 MS、筛选制备条件和进行体内释药试验的必要条件. 本研究采用的 HPLC 法, 可比较准确而方便地测定 MS 中 IVM 的含量.

参 考 文 献

- 王亚敏, 石庭森. 1996. 微球制剂药物控释研究进展. 中国药理学杂志, 31(3): 131~135
- 陆 彬. 1994. 药剂学实验. 北京: 人民卫生出版社, 136~139
- 陈庆华. 1987. 聚乳酸微球药物含量的测定方法. 医药工业, 18(9): 417~420
- 周芝芳, 周明兴, 沈明照. 1991. 含炔诺酮的乳酸-乙醇酸共聚物微球的制备及其体外实验. 中国药理学杂志, 26(6): 351~355
- 徐慧斌, 沈 杰, 叶明忠, 等. 1996. 伊维菌素长效控释丸在绵羊体内的药物动力学研究. 中国兽医寄生虫病, 4(2): 5~9

Bodmeier R, McGinity J W. 1988. Solvent selection in the preparation of poly(d,l -lactide) microspheres pre-

- pared by the solvent evaporation method. *Int J Pharm*, 43: 179~183
- Campell W C. 1989. Ivermectin and abamectin. New York: Springer-Verlag, 215~224
- Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm*, 41(1): 2~13
- Egerton J R, Suhayda D, Eary C H. 1986. Prophylaxis of nematode infections in cattle with an indwelling rumino-reticular ivermectin sustained release bolus. *Vet Parasit*, 22: 67~69
- Spenlehauer G, Veillard M, Benoit J P. 1986. Formation and characterization of cisplatin loaded poly(*d l*-lactide) microspheres for chemoembolization. *J Pharm Sci*, 75(8): 750~755

OPTIMIZATION OF MICROSPHERE PREPARATION PROCEDURE AND HPLC DETERMINATION OF IVERMECTIN CONTENT IN THE POLY (*dl*-LACTIC ACID) MICROSPHERES

Wang Minru Chen Zhangliu Feng Qihui *

(Dept. of Vet. Med, South China Agric Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Poly (*d l*-lactic acid)(PLA) microspheres(MS) containing ivermectin(IVM) were prepared by an oil-in-water solvent evaporation method. By using $L_{18}(3^7)$ orthogonal design and taking size distribution as main optimization factor, the best prescription and method were selected. The critical controlling variables of particle size were PLA and IVM concentration in organic phase, polyvinyl alcohol(PVA) concentration in continuous phase and the stirring speed for mixing of the two phases. The optimal experimental conditions to produce spherical and discrete drug-loaded microspheres were as follows: the dispersed phase was PLA (2.0 g) and IVM (0.67 and 1.00 g) dissolved in methylene chloride; the continuous phase was $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVA; polymer-drug solution was mixed into emulsifier solution by stirring at a speed of $450\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ to form a dispersion. An HPLC method with UV detection was established for determining the ivermectin content in the PLA microspheres. By dissolving 20 mg MS in methylene chloride (1 mL) and precipitating with methanol (9 mL), the IVM content in the microspheres was determined by RP-HPLC-UV method. This assay was simple, practicable and reproducible. The recovery rate was up to $95.85\%\pm0.84\%$. The encapsulation efficiency were $97.90\%\pm2.41\%$ and $95.13\%\pm4.66\%$, respectively, for IVM loaded PLA microspheres with theoretical IVM mass fraction of 25.0% and 33.3%. Stored at room temperature for 30, 60 and 90 days the determined IVM contents in MS with theoretical IVM mass fraction of 25% and 33.3% were not different from those of newly prepared ones.

Key words ivermectin; microspheres; poly (*d l*-lactic acid)(PLA); orthogonal design; HPLC determination

* Fung Ki-Fai