

梁立杰, 黎键业, 许颖, 等. 氟苯尼考缓释颗粒的制备及体外释放特性 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 1-7.
LIANG Lijie, LI Jianye, XU Ying, et al. Preparation and *in vitro* release characteristics of florfenicol sustained-release granules [J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 1-7.

氟苯尼考缓释颗粒的制备及体外释放特性

梁立杰, 黎键业, 许颖, 刘雅红, 黄显会
(华南农业大学 兽医学院/国家兽医微生物耐药性风险评估实验室/
广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】延长药物有效血药浓度的维持时间, 产生持续稳定的抑菌作用, 避免多剂量连续使用氟苯尼考产生胚胎毒性和免疫抑制。【方法】以硬化油、聚乙二醇、甘油酯为辅料, 采用离心喷雾干燥制粒技术法制备氟苯尼考缓释颗粒, 高效液相色谱法 (HPLC) 测定氟苯尼考含量。以药物在不同释放介质 (pH 1.2 盐酸缓冲液、pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液) 中的释放特性为指标, 对氟苯尼考粉和自制的氟苯尼考缓释颗粒进行溶出试验, 考察体外释放特性。【结果】4 个批次制备的氟苯尼考缓释颗粒中氟苯尼考实际含量在标示含量中的占比分别为 99.19%、100.01%、97.45% 和 100.72%, 相对标准偏差(RSD)分别为 0.82%、0.86%、0.77% 和 0.24%。氟苯尼考粉在 0.25 h 内完全释放, 自制的氟苯尼考缓释颗粒在模拟胃液环境 (pH 1.2 盐酸缓冲液) 基本不释放, 在模拟肠液环境 (pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液) 缓慢释放, 5 h 内释放量达 95% 以上。【结论】自制的氟苯尼考缓释颗粒中药物分布较均匀, 符合中国兽药典要求。相比于氟苯尼考粉, 氟苯尼考缓释颗粒表现出良好的耐酸性体外缓释性, 可为后续的临床试验研究和临床使用药物提供参考依据。

关键词: 氟苯尼考; 缓释颗粒; 离心喷雾干燥技术; 释放度
中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)04-0001-07

Preparation and *in vitro* release characteristics of florfenicol sustained-release granules

LIANG Lijie, LI Jianye, XU Ying, LIU Yahong, HUANG Xianhui
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria/Guangdong Provincial Key Laboratory for Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To prolong the maintenance time of the effective blood concentration of the drug, generate a sustainable and stable bacteriostatic action, and avoid embryotoxicity and immunosuppression in multi-dose continuous use of florfenicol. 【Method】The test used hardened oil, polyethylene glycol and glyceride as auxiliary materials. The florfenicol sustained-release granules were prepared by centrifugal spray drying granulation method, and the content of florfenicol was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Using release characteristics of the drug in different media (pH 1.2 hydrochloric acid buffer, pH 4.3 acetate buffer and pH 6.8 phosphate buffer) as indicators, the dissolution tests of florfenicol powder and self-made florfenicol sustained-release granules were carried out to investigate their *in vitro* release

performances. 【Result】 The percentages of florfenicol actual contents in indicated contents of florfenicol sustained-release granules prepared in four batches were 99.19%, 100.01%, 97.45% and 100.72%, and the relative standard deviations (RSD) were 0.82%, 0.86%, 0.77% and 0.24% respectively. The florfenicol powder was completely released within 0.25 h. The self-made florfenicol sustained-release granules were substantially not released in simulated gastric fluid environment (pH 1.2 hydrochloric acid buffer), and released slowly under simulated intestinal fluid environment (pH 4.3 acetate buffer and pH 6.8 phosphate buffer) with the release amount of over 95% within 5 h. 【Conclusion】 The drug in self-made florfenicol sustained-release granules is homogeneous distributed, and the granules conform to China veterinary pharmacopoeia. Compared with florfenicol powder, florfenicol sustained-release granules show good acid resistance and *in vitro* sustained-release performance, which provides a reference for subsequent clinical trial research and clinical use of drugs.

Key words: florfenicol; sustained-release granule; centrifugal spray drying technology; release rate

氟苯尼考 (Florfenicol) 是美国先灵-保雅 (Schering-Plough) 公司在 19 世纪 70 年代末研制的一种动物专用的新型酰胺醇类广谱抗菌药, 对革兰阴性菌和革兰阳性菌如胸膜放线杆菌和大肠埃希菌都有强大的抑菌能力^[1]。氟苯尼考具有抗菌谱广、吸收好、体内分布广等特点^[2], 在兽医临床上广泛应用于猪、禽和水产动物的疾病治疗^[3-5], 仅 2013 年氟苯尼考的用量就达到了 1 万 t^[6]。在兽医临床上氟苯尼考常用的给药方式是混饲或饮水, 目前, 氟苯尼考的制剂类型主要有与葡萄糖等辅料简单混合的普通粉剂、以纽氟罗为代表的预混剂和为了提高溶解度研制的环糊精包合物等^[7-8]。无论粉剂、预混剂还是环糊精包合物都存在达峰时间快、峰浓度高、消除快等问题, 容易导致多剂量连续给药时药物峰谷浓度差较大, 且谷浓度低于有效浓度产生抑菌空档期, 同时过高的峰浓度不会增强药物疗效反而容易导致免疫抑制^[9-10]和胚胎毒性^[11]的发生。为减少氟苯尼考在猪体内的峰谷浓度差, 消除间歇采食导致的谷浓度低于有效浓度的时间和多剂量给药抗菌空档期, 避免诱导耐药性, 降低峰浓度值避免药物在体内的浪费, 达到增强药物疗效、避免产生耐药性的目的, 亟需研制氟苯尼考新剂型。

本试验通过选用合适的稀释剂、填充剂、缓释剂和粘合剂等辅料, 以药物体外释放度为评价指标, 运用离心喷雾干燥造粒技术制备了一种缓释、长效的新剂型——氟苯尼考缓释颗粒, 以缩小氟苯尼考在动物体内血药浓度的峰谷浓度差, 延长氟苯尼考在肠道释放吸收的时间, 从而减少药物的使用量, 避免因多剂量连续使用氟苯尼考产生免疫抑制, 降低产生胚胎毒性的风险, 为氟苯尼考产业化生产提供新的剂型及工艺。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (1260 型, 四元泵, 紫外检测器, 美国安捷伦公司); 色谱柱 (Gemini C18 110A, 250 mm×4.6 mm×5 μm, 美国 Phenomenex 公司); 溶出试验仪 (RCY-808 型, 天津海益达公司); pH 测定计 (PHS-3C 型, 上海雷磁仪器厂); 数控超声仪 (KH-500DB 型, 昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

氟苯尼考对照品 (w, 99.3%) 购自中国兽医药品监察所; 氟苯尼考原料药 (w, 99.8%) 购自浙江海翔川南药业有限公司; 氟苯尼考粉 (w, 10%) 购自正典生物技术有限公司; 硬化油购自杭州油脂化工有限公司; 甘油酯购自广州嘉德乐生化科技有限公司; 乙腈, 色谱级纯, 批号: 122269, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 盐酸、冰醋酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠、氯化钾、十二烷基硫酸钠 (w, 95.0%) 等均为国产分析纯。

1.3 氟苯尼考缓释颗粒的制备

称取处方量的氟苯尼考原料药和辅料 (质量比为 1:9), 将水加热至 60~75 °C 后, 加入缓释剂、稀释剂和黏合剂, 匀速搅拌均匀, 得到混匀物料 A; 待混匀物料 A 温度上升至 80~85 °C 后, 再投入填充剂和矫味剂, 匀速搅拌使物料完全融溶, 得到混匀物料 B; 将氟苯尼考投入混匀物料 B 中, 搅拌物料至无堆积后, 乳化 20~50 min, 得到混匀物料 C; 将混匀物料 C 在 70 °C 保温后进行离心喷雾干燥, 冷却, 筛选出粒度大小为 300~450 μm 的药物颗粒, 备用。

1.4 体外溶出分析方法的建立

1.4.1 色谱条件 参考《中华人民共和国兽药典》^[11]中氟苯尼考的高效液相色谱 (HPLC) 检测方法, 流

动相为乙腈、水和冰醋酸(体积比为 100:197:3),紫外检测波长 224 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL。

1.4.2 回收率与精密度试验 精密称取氟苯尼考 25 mg 对照品 2 份,分别置于 50 mL 容量瓶中,一份加入适量流动相溶液超声溶解并定容,然后分别用 3 种释放介质 [pH 1.2 盐酸缓冲液、pH 4.3 醋酸缓冲液(含 5 g/L SDS)、pH 6.8 磷酸缓冲液(含 5 g/L SDS)] 稀释,作为对照品溶液。另一份先加入氟苯尼考微囊化颗粒配方比例的空白辅料,再加入适量流动相溶液超声溶解并定容,然后分别用 3 种释放介质溶液稀释,制得质量浓度为 40、50、60 μg/mL 的氟苯尼考溶液。制得的溶液过 0.45 μm 针式过滤器,按“1.4.1”的色谱条件上机检测,每个浓度样品连续重复进样 3 针,记录峰面积,计算供试样品的回收率和相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)。制备氟苯尼考质量浓度为 50 μg/mL 的平行供试样品 6 份,上机检测,计算样品的精密度。

1.4.3 标准曲线的制作 以 pH 1.2 盐酸缓冲液为介质,精密称量氟苯尼考对照品 25 mg,用 pH 1.2 盐酸缓冲液稀释,配制成氟苯尼考质量浓度为 500 mg/L 的储备液。将储备液用 pH 1.2 盐酸缓冲液稀释成质量浓度为 5、10、20、50、100、200 mg/L 的溶液,过 0.45 μm 针式过滤器后,按照“1.4.1”的色谱条件上机检测。参照氟苯尼考在 pH 1.2 盐酸缓冲液介质中标准曲线的制定方案,制作 pH 4.3 醋酸缓冲液(含 5 g/L SDS)介质以及 pH 6.8 磷酸缓冲液(含 5 g/L SDS)介质的标准曲线。

1.4.4 稳定性试验 将氟苯尼考质量浓度为 500 mg/L 的储备液分别用 3 种释放介质溶液稀释,制成质量浓度为 50 μg/mL 的供试品溶液。室温放置 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 后,取 2 mL 溶液过 0.45 μm 针式过滤器后上机检测,计算放置不同时间供试样品中氟苯尼考的含量,评价氟苯尼考溶液室温放置的稳定性。

1.5 氟苯尼考缓释颗粒药物含量检测

精密称取制备的氟苯尼考缓释颗粒 0.25 g,置于 100 mL 碘量瓶中,精密加入 50 mL 提取溶液(乙腈、水、冰醋酸体积比为 200:97:3),超声溶解后过滤,精密取滤液 5 mL 于 50 mL 容量瓶中,用流动相(乙腈、水、冰醋酸体积比为 100:197:3)定容并摇匀,过 0.45 μm 针式过滤器,按“1.4.1”的色谱条件进样分析,利用单点法计算缓释颗粒中氟苯尼考的实际含量。

1.6 氟苯尼考缓释颗粒体外释放度的检测

释放度检测方法以《中华人民共和国兽药

典》^[11]306-308 中的溶出度测定第一法(篮法)为依据。精密称取氟苯尼考缓释颗粒与氟苯尼考粉各 0.5 g,置于转篮中。加 900 mL 相应的溶出介质于溶出杯中,在 (37.0±0.5)℃、100 r/min 条件下进行溶出试验。分别于 0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 h 的时间点取样 1 mL(同时向溶出杯中补加相同温度的释放介质溶液 1 mL)。经 0.45 μm 针式过滤器过滤后,按“1.4.1”的色谱条件进样分析,根据“1.4.3”制得的标准曲线回归方程计算氟苯尼考浓度,按公式(1)计算样品在不同时间点的累计释药百分率,绘制样品的累计释放百分率-时间曲线。

$$Q = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i}{mDL} \times 100\%, \tag{1}$$

式中, Q 表示氟苯尼考的累计释放百分率, C_n 表示第 n 个采样时间点的样品中氟苯尼考的质量浓度; V 表示释放介质溶液的总体积; V_i 表示第 i 个采样时间点的取样体积; C_i 表示第 n 个采样时间点所取样品氟苯尼考的质量浓度; m 表示颗粒总质量, DL 表示颗粒中氟苯尼考的总质量分数。

1.7 释放模型拟合

利用 Origin Pro 8.0 按照 Zero-order、First-order 和 Higuchi 方程分别对缓释颗粒在不同 pH 释放介质条件下的释放曲线进行拟合,以各模型拟合方程的 r 值确定最佳拟合模型。

2 结果与分析

2.1 专属性试验

氟苯尼考专属性试验结果(图 1)显示,氟苯尼考出峰时间为 7.1 min,空白溶液在该方法下没有出现干扰峰,专属性良好,符合《中华人民共和国兽药典》^[11]规定。

2.2 检测限和定量限

以信噪比≥3 的氟苯尼考浓度为检测限,以信噪比≥10 的氟苯尼考浓度为定量限。精密移取一定量的氟苯尼考对照品溶液,用流动相溶液逐级稀释,按“1.4.1”的色谱条件进样分析。结果显示,氟苯尼考的检测限为 0.05 μg/mL,定量限为 0.10 μg/mL。

2.3 标准曲线的绘制

以氟苯尼考的峰面积(S)为横坐标,质量浓度(C)为纵坐标,通过最小二乘法对数据进行线性回归,绘制标准曲线。氟苯尼考在 pH 1.2 盐酸缓冲液中的回归方程为 $C=0.070\ 4S-4.381\ 1$ ($R^2=0.999\ 3$),在 pH 4.3 醋酸缓冲液中的回归方程为 $C=0.070\ 1S-3.556\ 5$ ($R^2=0.999\ 0$),在 pH 6.8 磷酸缓冲液中的回

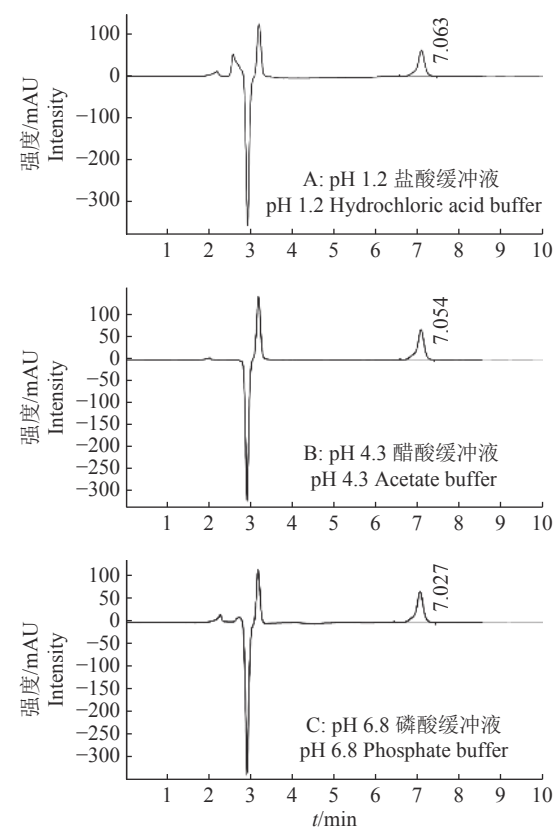


图 1 50 µg/mL 氟苯尼考溶液在不同释放介质溶液中的高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatograms of 50 µg/mL florfenicol solution in different release medium solutions

归方程为 $C=0.698\ 0S-2.740\ 7$ ($R^2=0.999\ 0$)。结果显示, 氟苯尼考在 5~200 µg/mL 质量浓度范围内线性良好 ($R^2\geq0.999\ 0$)。

2.4 回收率与精密度试验

根据《药品质量标准分析方法验证指导原则》^{[11]374-377} 关于溶出度方法学的要求, 在规定范围内, 测定 50 µg/mL (相当于 100% 浓度水平) 氟苯尼考 6 份供试样品的结果, 并进行精密度评价。以对照品加入量与所取供试品中待测定成分质量比 1.2:1、1:1、0.8:1 左右作为回收率高、中、低浓度, 本试验所取的氟苯尼考待测成分量约为 50 µg/mL, 因此选择质量浓度为 40、50、60 µg/mL 的氟苯尼考溶液进行考察。

氟苯尼考在 3 种介质中的添加回收率结果 (表 1) 和精密度结果 (表 2) 显示: 低 (40 µg/mL)、中 (50 µg/mL) 与高质量浓度 (60 µg/mL) 的药物添加回收率分别为 98.33%~100.91%、99.35%~101.13%、98.29%~101.03%, RSD 为 0.13%~0.86%、0.37%~0.67%、0.27%~0.93%, 精密度的 RSD 为 0.41%~0.84%。回收率以及精密度的 RSD 均小于 1.50%, 符合《中华人民共和国兽药典》^[11] 中《药品质量标准分析方法验证指导原则》规定。

2.5 稳定性试验

精密移取 50 µg/mL 的氟苯尼考对照品溶液在

表 1 添加制备氟苯尼考缓释颗粒空白辅料的药物回收率

Table 1 Recovery rates of blank excipients for preparation of florfenicol sustained-release granules n=3

$\rho/(\mu\text{g/mL})$	释放介质 Release medium	回收率/% Recovery rate				RSD
		1	2	3	$\bar{X}\pm\text{SD}$	
40	pH 1.2 盐酸缓冲液 pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	98.33	98.50	98.63	98.49±0.12	0.13
	pH 4.3 醋酸缓冲液 pH 4.3 Acetate buffer	98.47	100.07	100.47	99.67±0.86	0.86
	pH 6.8 磷酸缓冲液 pH 6.8 Phosphate buffer	100.00	100.91	99.28	100.06±0.67	0.67
	pH 1.2 盐酸缓冲液 pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	100.74	99.46	100.98	100.39±0.67	0.67
	pH 4.3 醋酸缓冲液 pH 4.3 Acetate buffer	100.33	101.13	100.28	100.58±0.39	0.39
	pH 6.8 磷酸缓冲液 pH 6.8 Phosphate buffer	99.35	100.03	100.22	99.87±0.37	0.37
50	pH 1.2 盐酸缓冲液 pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	98.93	98.29	98.70	98.64±0.26	0.27
	pH 4.3 醋酸缓冲液 pH 4.3 Acetate buffer	100.84	100.13	100.93	100.63±0.36	0.35
	pH 6.8 磷酸缓冲液 pH 6.8 Phosphate buffer	98.82	100.40	101.03	100.08±0.93	0.93
	pH 1.2 盐酸缓冲液 pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	98.93	98.29	98.70	98.64±0.26	0.27
	pH 4.3 醋酸缓冲液 pH 4.3 Acetate buffer	100.84	100.13	100.93	100.63±0.36	0.35
	pH 6.8 磷酸缓冲液 pH 6.8 Phosphate buffer	98.82	100.40	101.03	100.08±0.93	0.93

表 2 添加制备氟苯尼考缓释颗粒空白辅料的药物精密度

Table 2 Accuracy of blank excipients for preparation of florfenicol sustained-release granules

n=6

释放介质 Release medium	氟苯尼考含量/% Florfenicol content							RSD/%
	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm SD$	
pH 1.2 盐酸缓冲液 pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	100.60	101.02	100.95	99.32	98.87	99.51	100.05±0.84	0.84
pH 4.3 醋酸缓冲液 pH 4.3 Acetate buffer	99.52	100.20	100.53	99.82	100.05	100.73	100.14±0.41	0.41
pH 6.8 磷酸缓冲液 pH 6.8 Phosphate buffer	100.94	101.02	100.30	99.49	101.18	101.14	100.68±0.61	0.60

0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 的时间点进样, 以氟苯尼考的峰面积计算, 结果 (表 3) 显示, 氟苯尼考不同时间点在 PH 1.2 盐酸缓冲液、PH 4.3 醋酸缓冲液和 PH 6.8 磷酸缓冲液中 RSD 分别是 1.86%、1.44% 和 1.80%, 表明氟苯尼考溶液在这 3 种不同 pH 介质中 8 h 内稳定性良好, 符合《中华人民共和国兽药典》^[1] 规定。

2.6 氟苯尼考缓释颗粒药物含量

氟苯尼考缓释颗粒药物含量测定结果 (表 4) 显示, 该提取方法能够完全提取制备的氟苯尼考缓释颗粒中的药物, 缓释颗粒中的药物含量 (*w*) 分别 99.19%、100.01%、97.45%、100.72%, 符合《中华人民共和国兽药典》^[1] 中对待测成分含量和回收率限

度的要求 (95%~105%), 且 RSD 均小于 2.00%, 表明氟苯尼考缓释颗粒中药物分布较均匀。

2.7 氟苯尼考缓释颗粒体外释放试验

以时间为横坐标, 累计释放百分比为纵坐标, 绘制在 pH 1.2 盐酸缓冲液、pH 4.3 醋酸缓冲液、pH 6.8 磷酸缓冲液各溶出介质中, 氟苯尼考缓释颗粒和氟苯尼考粉在 0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 h 的时间点的释放曲线 (图 2)。

氟苯尼考缓释颗粒与氟苯尼考粉的体外释放曲线如图 2 所示, 氟苯尼考粉在 0.25 h 时释放量已经接近 90%, 0.5 h 后已经完全释放。氟苯尼考缓释颗粒在 pH 1.2 盐酸缓冲介质 (模拟胃液) 中, 1 h 前不释放, 1 h 后少量释放, 8 h 释放量仅为 6.13%; 氟苯尼考缓释颗粒在 pH 4.3、6.8 的缓冲介质 (模拟

表 3 氟苯尼考在不同释放介质溶液中的稳定性试验结果

Table 3 Results of the stability test of florfenicol in different release medium solutions

释放介质 Release medium	不同采样时间在标示含量中的占比/% Percentage in indicated content at different sampling time										RSD/%
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	$\bar{X} \pm SD$	
pH 1.2 盐酸缓冲液 pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	97.33	100.12	99.00	95.05	100.56	99.51	99.40	97.91	100.84	98.86±0.02	1.86
pH 4.3 醋酸缓冲液 pH 4.3 Acetate buffer	99.10	101.85	100.60	101.09	101.25	100.40	97.93	98.85	102.19	100.36±0.01	1.44
pH 6.8 磷酸缓冲液 pH 6.8 Phosphate buffer	97.43	101.33	100.03	100.78	102.61	101.36	102.70	98.57	102.21	100.78±0.02	1.80

表 4 氟苯尼考缓释颗粒中药物含量的测定结果

Table 4 Determination of drug content in fluorfenicol sustained-release granules

%

批次 Batch	实际含量($\bar{X} \pm SD$) Actual content	RSD	批次 Batch	在标示含量中的占比($\bar{X} \pm SD$) Percentage in indicated content	RSD
1	9.89±0.09	0.93	1	99.19±0.008	0.82
2	9.95±0.08	0.85	2	100.01±0.009	0.86
3	9.72±0.08	0.87	3	97.45±0.008	0.77
4	10.02±0.04	0.42	4	100.72±0.002	0.24

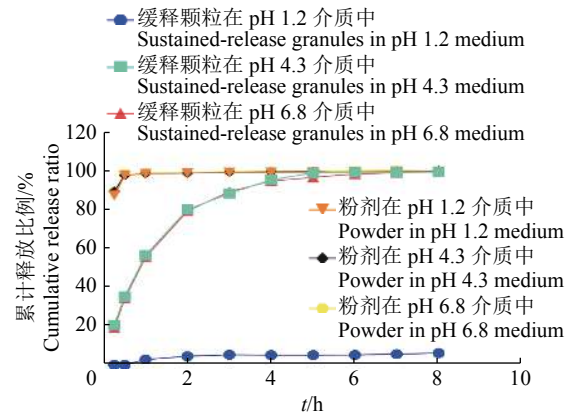


图 2 氟苯尼考缓释颗粒和氟苯尼考粉在不同释放介质溶液中的累计释放量曲线

Fig. 2 Cumulative release curves of florfenicol sustained-release granules and florfenicol powder in different release medium solutions

肠液) 中缓慢释放, 0.5 h 释放量为 35.42% 和 34.30%, 2 h 的释放量为 80.16% 和 79.38%, 5 h 的释放量为 98.99% 和 96.70%。此条件下制得的氟苯尼考缓释颗粒表现出良好的耐酸性以及在模拟肠液的环境下良好的释放性, 达到了药物缓释的目的。

2.8 氟苯尼考缓释颗粒体外释放特性拟合方程

用 Origin Pro 8.0 对氟苯尼考缓释颗粒在不同时间点 (t) 的累计释放百分率 (M) 进行方程拟合。结果 (表 5) 显示氟苯尼考缓释颗粒在 pH 1.2 盐酸缓冲液中 R^2 均低于 0.80, 在 pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液的条件下, 药物释放曲线均与 First-order 方程拟合度较好, 拟合方程分别为 $\ln(1-M)=-0.771\ 85t-0.046\ 22(R^2=0.998\ 96)$ 和 $\ln(1-M)=-0.763\ 80t-0.030\ 72(R^2=0.999\ 32)$

表 5 氟苯尼考缓释颗粒体外累积释放方程拟合

Table 5 Fitting of cumulative release equations of florfenicol sustained-release granules

释放介质 Release medium	方程模型 Equation model	回归方程 ¹⁾ Regression equation	R^2
pH 1.2 盐酸缓冲液	Zero-order	$M=0.006\ 79t+0.014\ 91$	0.649 49
pH 1.2 Hydrochloric acid buffer	First-order	$\ln(1-M)=-0.007\ 14t-0.014\ 62$	0.655 46
	Higuchi	$M=0.025\ 12t^{1/2}-0.004\ 13$	0.804 98
pH 4.3 醋酸缓冲液	Zero-order	$M=0.090\ 19t+0.442\ 3$	0.690 03
pH 4.3 Acetate buffer	First-order	$\ln(1-M)=-0.771\ 85t-0.046\ 22$	0.998 96
	Higuchi	$M=0.333\ 68t^{1/2}+0.189\ 37$	0.854 28
pH 6.8 磷酸缓冲液	Zero-order	$M=0.091\ 21t+0.431\ 13$	0.690 13
pH 6.8 Phosphate buffer	First-order	$\ln(1-M)=-0.763\ 80t-0.030\ 72$	0.999 32
	Higuchi	$M=0.337\ 40t^{1/2}+0.175\ 45$	0.854 01

1) M表示累计释放百分率, t表示取样时间
1) M indicates cumulative release ratio, t indicates sampling time

3 讨论与结论

本研究选用合适的辅料充分混合和乳化, 通过离心喷雾干燥技术制得了一种高度分散的氟苯尼考缓释颗粒。氟苯尼考制剂配方中含有不能全部溶解于水或有机溶剂的辅料, 为了完全提取缓释颗粒中的氟苯尼考, 确保测定结果的准确性, 本研究提高了提取液中有机相的比例。通过高效液相色谱法检测, 不同批次制备的氟苯尼考缓释颗粒中氟苯尼考实际含量在标示含量中占的比例均在 95%~102% 之间, 符合药典要求, RSD 小于 2.00%, 表明氟苯尼考缓释颗粒中药物分布较均匀, 制备氟苯尼考缓释颗粒的工艺可达到要求。

影响猪消化道 pH 的因素很多, 正常胃肠道的 pH 在恒定范围内^[12], 猪胃部 pH 变化范围为 1.0~3.5, 小肠和大肠 pH 变化范围为 4.0~7.0^[13]。为更好地模拟胃肠道的酸碱环境, 选择 pH 1.2 盐酸缓

冲液、pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液作为体外溶出试验的释放介质。氟苯尼考在水中的溶解度很低, 为满足漏槽条件, 更好地模拟胃肠道环境, 需在释放介质溶液中添加一定量的表面活性剂。本释放度试验中, 因胃液只有少量的胃蛋白酶, 模拟胃液的 pH 1.2 盐酸缓冲液在没有添加表面活性剂的情况下已满足漏槽条件, 因此不需加表面活性剂; 在 pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液中均需要加入表面活性物质以满足漏槽条件和更好地模拟肠道环境。常用的表面活性剂有 SDS 和吐温-80, 经过一系列摸索, 发现即使高浓度的吐温-80 也无法满足漏槽条件, 因此本试验选择 SDS 作为表面活性剂。考虑到 SDS 有可能损害色谱柱, 以及在低温状态下析出堵塞高效液相色谱仪管路。因此对溶出样品在上机检测前要先进行净化, 4 ℃ 高速离心 10 min, 使 SDS 沉淀析出, 弃沉淀物, 得到澄清上清液, 过 0.45 μm 孔径的滤膜后上机检测。

经过一系列探索,发现 5 g/L 的 SDS 添加量满足漏槽条件,被本释放度试验采用。pH 1.2 盐酸缓冲液作为模拟胃液的溶剂,猪体内肠道酸碱性条件及生物活性条件^[14]模拟分别选择均添加了 5 g/L SDS 的 pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液。

为评价研制的氟苯尼考缓释颗粒在体外的释放特征,将氟苯尼考缓释颗粒置于 pH 1.2 盐酸缓冲液、pH 4.3 醋酸缓冲液和 pH 6.8 磷酸缓冲液的环境下考察其体外的释放特征。结果显示,氟苯尼考缓释颗粒在模拟胃液环境 (pH 1.2 盐酸缓冲液) 中 1 h 内不释放,保证其在通过胃部的时候不受胃酸影响,避免在胃部因酸环境破坏微囊导致提前释放,无法达到缓释作用;在模拟肠液的环境 (pH 4.3、6.8 缓冲液) 中,氟苯尼考缓释颗粒缓慢且完全释放,0.5 h 释放量为 35.42% 和 34.30%,没有出现突释情况,2 h 释放量为 80.16% 和 79.38%,5 h 释放量为 98.99% 和 96.70%,延缓药物释放的同时能促进完全释放。相比于微球制剂,氟苯尼考缓释颗粒的释放时间更符合食物在猪消化道滞留的时间^[15-16];相比于氟苯尼考肠溶缓释包衣微粒制剂^[17],缓释颗粒的释放量更为完全。由各模型拟合结果可知氟苯尼考缓释颗粒的体外释放符合 First-order 模型。

本试验所用到的离心喷雾干燥制粒技术中的喷雾干燥过程中水分蒸发迅速,仅需数秒就能完成干燥,快速制备出缓释、稳定的氟苯尼考产品。工艺过程较简化,操作控制方便,节省了时间和工艺成本。此工艺制备的氟苯尼考缓释颗粒具有良好的过胃耐酸性能,保证药物不受胃酸影响的同时可使药物在肠道中缓慢且完全释放,延长药物有效血药浓度维持时间,提供持续稳定的抑菌作用。在多次临床给药应用中,该氟苯尼考缓释颗粒可缩小峰谷浓度差,维持平稳的有效血药浓度,达到长效的效果。因此可减少临床给药次数,进而减少药物在生产上的用量,达到减少使用抗生素、避免产生胚胎毒性和免疫抑制的目的,为后续的临床试验研究和临床使用药物提供参考依据。

参考文献:

[1] 张春辉,邢广旭,胡晓飞,等. 动物专用药物氟苯尼考的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(5): 95-98.

[2] 周鹏,李炜,董国权. 氟苯尼考在动物疾病治疗中的应用效果[J]. 中国畜禽种业, 2019: 45.

[3] 杨凡凡. 三种药物对猪传染性胸膜肺炎的疗效试验[J]. 贵州畜牧兽医, 2017, 41(6): 21-24.

[4] 李亚男,杨帆,王丹,等. 氟苯尼考的药效学及其对禽源致病菌的治疗作用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2015, 40(1): 1-4.

[5] 徐力文,廖昌容,刘广锋. 氟苯尼考用于水产养殖的安全性[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 512-518.

[6] ZHANG Q Q, YANG G G, PAN C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of china: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(11): 6772-6782.

[7] 魏海涛,刘锋,钟笑婷,等. 水溶性氟苯尼考的研制[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(2): 12-15.

[8] 魏海涛,宋敏,李亮华,等. 氟苯尼考-β-环糊精包合物的研制[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(4): 94-97.

[9] HU D, ZHANG T, ZHANG Z, et al. Toxicity to the hematopoietic and lymphoid organs of piglets treated with a therapeutic dose of florfenicol[J]. Vet Immunol Immunop, 2014, 162(3/4): 122-131.

[10] GUAN S, LU J, SHEN X. Florfenicol impairs the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice[J]. Immunopharm Immunot, 2011, 33(4): 609-613.

[11] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 306-308.

[12] GUO B L, GAO Q Y. Preparation and properties of a pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/poly (N-isopropylacrylamide) semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs[J]. Carbohydr Res, 2007, 342(16): 2416-2422.

[13] 陈元明,刘金旭. 猪消化道的酸碱度 (pH)[J]. 中国畜牧杂志, 1964: 5-6.

[14] 谢沐风. 如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(3): A23-A32.

[15] 李仲谨,田晓静,杨威. 氟苯尼考淀粉微球的制备及缓释性能的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2): 205-207.

[16] 裴艳新,王德华. 哺乳动物消化道内食物滞留时间的影响因素[J]. 动物学杂志, 2000, 35(5): 50-53.

[17] 李智慧,黄山,孙文静,等. 氟苯尼考肠溶缓释包衣微粒的制备及体外评价[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(12): 31-34.

【责任编辑 李庆玲】