

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.08.09

# 伊维菌素纳米乳中伊维菌素含量 HPLC 检测方法的建立

苗 艳, 朱庆贺, 陈 曦, 杨旭东, 王 爽, 王丽坤, 陈 亮, 兰世捷,  
冯万宇, 李 丹, 史同瑞\*

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2021-01-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 08-0060-06 [中图分类号] S859.84

**[摘 要]** 建立了伊维菌素纳米乳中伊维菌素含量的高效液相色谱检测方法(HPLC)。采用 C18 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-水(40:55:5)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL, 柱温 25 ℃。伊维菌素浓度在 4.6 ~ 92.0 μg/mL 时, 其峰面积与浓度线性关系良好( $r^2 = 0.9996$ ), 回收率高, 平均回收率为 98.25% ~ 98.76%。精密度良好, RSD 均小于 2%, 色谱峰图无杂质干扰, 稳定性高, 本操作方法简便, 分析快速, 结果准确, 适用于伊维菌素纳米乳剂的含量测定。

**[关键词]** 伊维菌素; 纳米乳剂; 高效液相色谱; 含量

## Content Determination of Ivermectin Nano-emulsion by HPLC

MIAO Yan, ZHU Qing-he, CHEN Xi, YANG Xu-dong, WANG Shuang, WANG Li-kun, CHEN Liang,  
LAN Shi-jie, FENG Wan-yu, LI-Dan, SHI Tong-rui\*

(Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heilongjiang, Qiqihar 161005, China)

Corresponding author: SHI Tong-rui, E-mail: systr@sina.com

**Abstract:** A method for the content determination of ivermectin nano-emulsion by HPLC was established. HPLC system consisted of C18 column(4.6 × 250 mm, 5 μm), methyl alcohol-acetonitrile-water(40:55:5) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wave length was 254 nm. The injection volume was 10 μL and column temperature was room temperature. There was no interference occurred from impurities. The calibration curve was linear in the range of 4.6 ~ 92.0 μg/mL( $r^2 = 0.9996$ ). The average recovery was 98.25% ~ 98.76%. The method is rapid, simple and accurate for the content determination of ivermectin nano-emulsion.

**Key words:** ivermectin; nano-emulsion; HPLC; content

**基金项目:** 黑龙江科研机构创新能力提升专项“兽药新药新品种开发”(YC2016D004);“农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX15-10);农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX16)

**作者简介:** 苗 艳, 助理研究员, 硕士, 从事兽药和分子免疫相关研究。

**通讯作者:** 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

伊维菌素(Ivermectin, IVM)具有广谱、高效、安全等优点,是一种使用广泛的抗寄生虫药物,对动物体内外寄生虫,尤其是线虫和节肢动物,具有高效驱杀作用<sup>[1-2]</sup>。由于伊维菌素几乎不溶于水,明显制约了伊维菌素的应用范围,尤其在制备伊维菌素注射剂型时,溶解伊维菌素需要大量使用有机溶剂,不仅增加了生产成本,也增大了对动物的刺激性<sup>[3]</sup>。伊维菌素由于其高效驱杀皮肤寄生虫的作用,常被用于制备抗牛羊寄生虫的透皮药物,但普通的透皮剂型效果不佳。为克服伊维菌素注射及透皮剂型的缺点,本研究室制备了高含水量的伊维菌素纳米乳剂,为水包油型乳剂,不仅降低了企业生产成本以及对动物的刺激性,而且已有研究表明,纳米乳剂能显著增加药物的透皮效果<sup>[4]</sup>,这为兽医临床中伊维菌素的应用提供了可选择的新剂型。由于自制伊维菌素纳米乳剂的进一步研究需要,本研究建立了纳米乳剂中伊维菌素的高效液相色谱含量检测方法,从而为自制伊维菌素纳米乳剂的稳定性考察以及含量检测提供技术支持。

## 1 材料与仪器

1.1 材料 伊维菌素标准品,含量 92.0%,中国食品药品检定研究院;伊维菌素,含量 95.7%,河北美荷药业有限公司;伊维菌素纳米乳剂样品(自制),规格为 1% 伊维菌素纳米乳剂;乙腈/甲醇均为色谱纯,赛默飞世尔科技公司。

1.2 仪器 高效液相色谱仪,LC-20AT,日本岛津公司;二级管阵列检测器,SPD-M20A,日本岛津公司;InertSustain C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),岛津技迈(上海)商贸有限公司;纯水仪,XYE2-20-H 型,北京湘顺源科技有限公司;电子分析天平,MS104TS/02 型,梅特勒-托利多(上海)有限公司;实验室 pH 计,FE20 型,梅特勒-托利多(上海)有限公司。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇:乙腈:水(40:55:5);检测波长

254 nm;流速:1 mL/min;注温:25 ℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取经干燥至恒重的伊维菌素对照品 10 mg,置 100 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成 92.0 μg/mL 的对照品储备液。精密量取 1 mL 对照品储备液,置于 10 mL 容量瓶中,容量瓶中加入流动相稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,制备为浓度为 9.20 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 按照配方比例制备伊维菌素纳米乳剂,精密取样品适量(相当于伊维菌素 10 mg),置 100 mL 容量瓶中,加流动相充分溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,制备为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液制备 按配方比例量取与供试品相当的空白纳米乳剂(不含伊维菌素,其他成分与伊维菌素纳米乳剂相同)适量,按照 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验 分别取伊维菌素对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按 2.1 项色谱条件测定,结果见图 1。在该色谱条件下,伊维菌素 H2B1b 和 H2B1a 峰保留时间分别为 7.1 和 8.1 min 左右,阴性对照在此时间附近未出峰,因此,对伊维菌素 HPLC 的测定没有影响,专属性能满足检测要求。

2.4 线性试验 精密量取对照品储备液 0.5、1.0、3.0、8.0、10 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,配置成浓度分别为 4.6、9.2、27.6、73.9、92.0 μg/mL 的系列对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定,以 B1a 和 B1b 峰面积总和( $y$ )对伊维菌素的浓度( $x$ , μg/mL)进行线性回归,方程为  $y = 15285x + 12584$ ,  $r^2 = 0.9996$ 。结果表明伊维菌素在 4.6 ~ 92.0 μg/mL 范围内线性关系良好(图 2)。

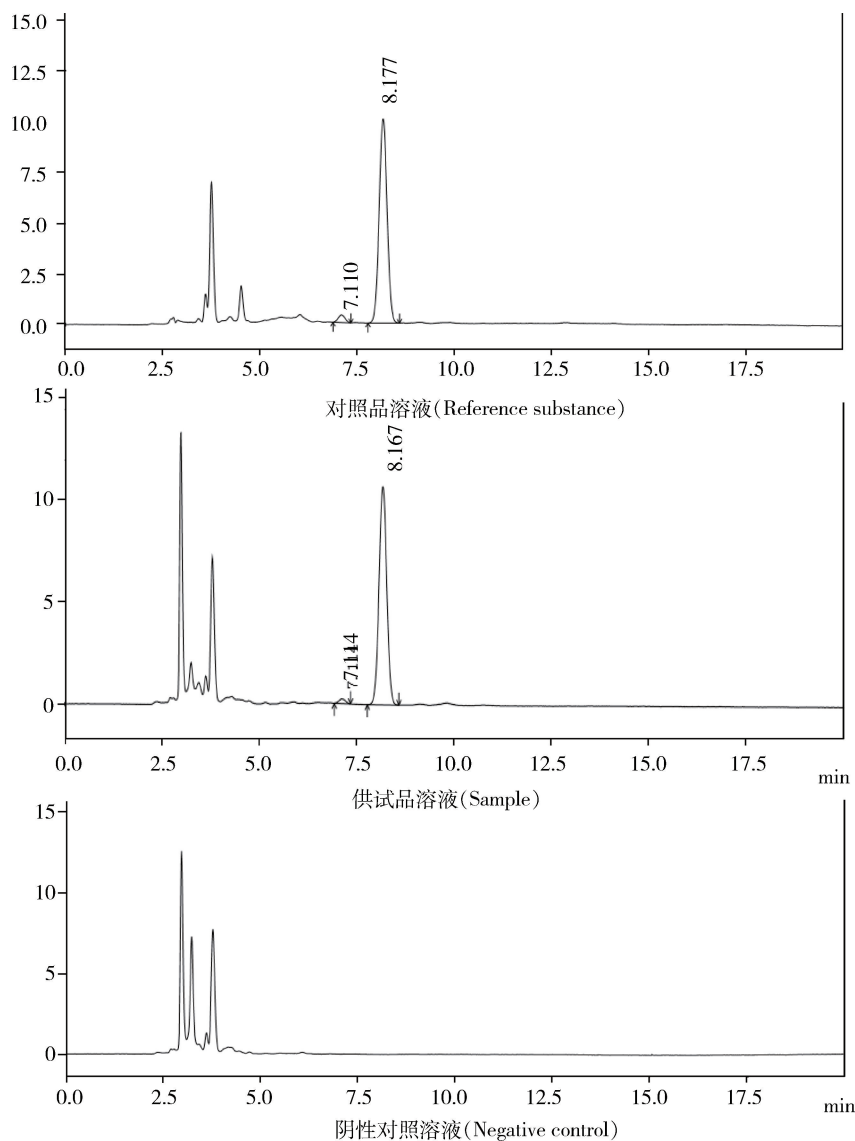


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 The HPLC chromatogram

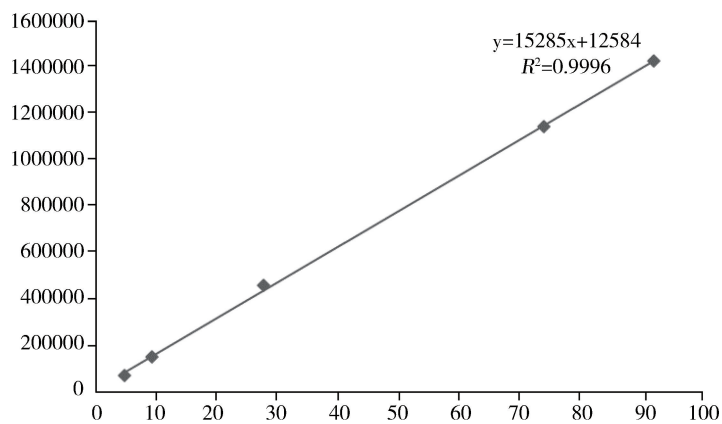


图 2 伊维菌素标准曲线

Fig 2 The standard curve of Ivermectin

2.5 回收率测定 取适量伊维菌素对照品并添加配方剂量的空白纳米乳剂基质,超声溶解后用流动相稀释为高(110.4 μg/mL)、中(92.0 μg/mL)、低(73.6 μg/mL)3 种理论浓度的对照品,每个浓度配

制 3 份,按 2.1 项下色谱条件测定其含量,计算回收率,结果见表 1。结果表明高、中、低浓度对照品的平均回收率为 98.25% ~ 98.76%。该方法回收率符合要求。

表 1 伊维菌素的回收率 (n = 3)  
Tab 1 Recovery rate of Ivermectin

| 理论浓度/(μg · mL <sup>-1</sup> )<br>Theoretical concentration | 实测浓度/(μg · mL <sup>-1</sup> )<br>Measured concentration | 回收率/%<br>Recovery rate | 平均回收率<br>Average recovery rate | RSD/% |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------|
| 73.6                                                       | 71.84                                                   | 97.61                  | 98.34                          | 0.70  |
|                                                            | 72.45                                                   | 98.43                  |                                |       |
|                                                            | 72.85                                                   | 98.98                  |                                |       |
|                                                            | 91.75                                                   | 99.73                  |                                |       |
| 92.0                                                       | 90.25                                                   | 98.10                  | 98.76                          | 0.88  |
|                                                            | 90.58                                                   | 98.46                  |                                |       |
|                                                            | 108.20                                                  | 98.00                  |                                |       |
|                                                            | 109.56                                                  | 99.24                  |                                |       |
| 110.4                                                      | 107.65                                                  | 97.51                  | 98.25                          | 0.91  |
|                                                            |                                                         |                        |                                |       |

回收率 R% = 实测浓度/理论浓度 × 100%

2.6 精密度的测定 取批号 20191030 的伊维菌素纳米乳剂样品适量(约相当于伊维菌素 10 mg),精密称定,按高、中、低三个浓度水平分别添加伊维菌素原料试药,制备为向已知含量制剂中添加已知测定物的添加样品,每个浓度水平的添加样品分别制

备 3 份供试品。按 2.2.2 项制成供试品溶液,进行含量测定,计算精密度,结果见表 2。结果表明高、中、低浓度供试品回收率为 97.25% ~ 100.14%,精密度良好,RSD 小于 2%。

表 2 精密度试验结果  
Tab 2 Results of precision test

| 添加量/mg<br>Amount of addition/mg | 取样量/mL<br>Sample intake /mL | 样品中伊维菌素含量/mg<br>Content of Ivermectin<br>in sample/mg | 实测含量/mg<br>Measured content<br>of sample/mg | 回收率/%<br>Recovery rate/% | RSD/%  |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|--------|
| 高                               | 30.3                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 39.78                    | 98.28  |
|                                 | 30.4                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 40.02                    | 98.75  |
|                                 | 30.0                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 39.46                    | 98.20  |
|                                 | 20.1                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 29.72                    | 98.11  |
| 中                               | 20.3                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 30.33                    | 100.14 |
|                                 | 20.0                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 29.88                    | 99.40  |
|                                 | 10.0                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 19.64                    | 94.60  |
|                                 | 10.2                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 19.92                    | 97.25  |
| 低                               | 10.1                        | 1.0                                                   | 10.0                                        | 19.60                    | 95.05  |

2.7 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 测定 取伊维菌素储备液分别配制为 0.046、0.092、0.184、0.368  $\mu\text{g/mL}$  浓度的检测溶液,按 2.1 项下色谱条件后过微孔滤膜进样测定,测得基线噪音值,以 10 倍信噪比 ( $S/N > 10$ ) 所对应的伊维菌素浓度为最低定量限,确定本方法定量限为 0.092  $\mu\text{g/mL}$ 。以 3 倍信号强度与噪声强度的比值 ( $S/N > 3$ ) 所对应的伊维菌素浓度为检出限,确定本方法检出限为 0.046  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.8 样品含量测定 精密量取 3 批次的伊维菌素纳米乳剂样品,每批次 3 份,按 2.2.2 项制备为供试品溶液,进行含量测定。结果表明,批号为 20191001、20191115、20191131 的 3 批样品中伊维菌素平均含量分别为标示量的 98.37%、99.68%、100.04%,符合规定。

### 3 结 论

紫外吸收峰值检测结果表明,伊维菌素在 244 nm 附近有最大吸收。但对比检测色谱图发现,244 nm 液相色谱图杂峰对伊维菌素的主峰稍有干扰,而 254 nm 色谱图则分离良好。此外,参考兽药典 2015 版要求,伊维菌素应在 254 nm 处进行检测,所以本研究建立的纳米乳中伊维菌素含量检测方法选择 254 nm 进行检测。通过色谱结果的比较分析,在 254 nm 波长下测定,能够获得最大的灵敏度和抗干扰能力。

本实验室前期研发了伊维菌素微乳剂型<sup>[4]</sup>,为了更好的改良剂型,继续研发了伊维菌素纳米乳剂。纳米乳与微乳是近年来研究的热点载药剂型,两种剂型都是由油相、水相、表面活性剂以及助表面活性剂按照一定比例制备而成的粒径在 100 ~ 1000 nm 范围内的外观澄清透明的剂型<sup>[5]</sup>,但与微乳不同的是,纳米乳的制备需要借助外来能量(如机械搅拌或组分的化学能)才能形成稳定的体系<sup>[6]</sup>。纳米乳剂最早在农药相关制品中被应用,由于其水溶性好、稳定性好,最大限度的发挥了除草剂、杀虫剂以及一些杀菌剂的杀灭能力<sup>[7]</sup>。在中药挥发油领域中纳米乳剂也被广泛应用<sup>[8]</sup>,研究表明,将挥发油类药物制备为纳米乳剂,可以改善配

方的稳定性,增强药物与细胞或受体的相互作用,增强靶向性,提高生物利用度,改善药物对粘膜、皮肤的通透性,减少药物对组织的刺激性,并有效保护挥发油的挥发和降解。近年来,纳米乳剂也有在抗生素中作为载药体系应用的报道,尤其对于难溶于水的药物,如由乙酰甲喹、利福昔明、氟苯尼考等药物制备的纳米乳剂<sup>[9-11]</sup>,研究表明乙酰甲喹纳米乳剂制品安全性良好,纳米乳剂能显著增加乙酰甲喹的透皮效果,并且相对生物利用度能达到乙酰甲喹溶液制剂的 694.45%<sup>[9]</sup>。另外由于纳米乳剂具有无限溶于水,在水中分散良好的优点,研究人员研制了水产用伊维菌素纳米乳剂,解决了水产用乳油剂杀虫剂的局限<sup>[12-13]</sup>。在局部用药中纳米乳剂也有较为广泛的应用<sup>[6]</sup>,佛司可林纳米乳剂被研制成为透皮制剂,透皮效果显著<sup>[14]</sup>。

综合纳米乳剂的剂型优势以及兽医临床使用的需要,本实验室研发了兽用伊维菌素纳米乳剂,为更好的对新剂型药物的稳定性考察及含量检测,建立了纳米乳剂中伊维菌素的 HPLC 含量检测方法。本方法分离度好,伊维菌素 H2B1b 和 H2B1a 峰保留时间分别为 7.1 和 8.1 min 左右,峰形好,基本无拖尾,杂质不干扰实验测定,而且采用外标法测定伊维菌素纳米乳剂的含量操作简单,结果准确,回收率高,重复性好,是伊维菌素纳米乳剂中伊维菌素含量检测的简便、快速、准确的方法。

### 参考文献:

- [1] 段培强,潘方燕,曾杨梅,等. 长效伊维菌素注射液在山羊体内的药动学研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2021,43(1):75-80.
- [2] 王嗣涵,张继瑜,邢守叶,等. 伊维菌素微乳中伊维菌素的含量测定方法研究[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(6):1861-1868.
- [3] Duan P Q, Pan F Y, Zeng Y M, et al. Pharmacokinetical Study of a Long Acting Ivermectin Injection in Goats[J]. Journal of Southwest University(Natural Science Edition), 2021, 43(1), 75-80.
- [4] Wang S H, Zhang J Y, Xing S Y, et al. Content Determination of Ivermectin in the Ivermectin Microemulsion Injection[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(6):

- 1861–1868.
- [3] 邢一丹,蔡云鹏,张亚峰,等. 伊维菌素在不同动物中安全性、药效学和药代动力学的差异性研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018,52(5):72–78.
- Xing Y D, Cai Y P, Zhang Y F, *et al.* Research Progress on the Difference of Safety, Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Ivermectin in Various Animals[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(5):72–78.
- [4] 朱庆贺,陈曦,王丽坤,等. 伊维菌素微乳的研制及质量评价[J]. 动物医学进展, 2018, 39(1):61–72.
- Zhu Q H, Chen X, Wang L K, *et al.* Construction and Characterization of Camelid Naive Single-domain Antibody Phage Display Library[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(1):61–72.
- [5] Burger C, Shahzad Y, Brummer A, *et al.* Traversing the skin barrier with Nano-emulsions[J]. Curr Drug Deliv, 2017, 14(4):458–472.
- [6] 史同瑞,于万才. 纳米乳及纳米乳制剂的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, 5:10–11.
- Shi T R, Yu W C. Study on microemulsion and microemulsion preparation[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2005, 5:10–11.
- [7] Anton N, Vandamme T F, *et al.* Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences[J]. Pharm Res, 2011, 28(5):978–985.
- [8] 杨波,周阳,王福玲,等. 纳米载药系统在中药挥发油中的研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(11):46–49.
- Yang B, Zhou Y, Wang F L, *et al.* Research progress of nano drug delivery systems in volatile oil of traditional Chinese medicine[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2018, 37(11):46–49.
- [9] 赵恒科,蓝月,南灿,等. 8% 甲氰菊酯丁氟螨酯纳米乳剂的研制及其性能[J]. 中国农业科学, 2016, 49(14):2700–2710.
- Zhao H K, Lan Y, Nan C, *et al.* Preparation of 8% Fenpropathrin Cyflumetofen Nano-Emulsion and Its Performance[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(14):2700–2710.
- [10] 吴敬超. 乙酰甲嗪纳米乳的制备及药效研究[D]. 西北农林科技大学, 2012.
- Wu J C. Studies on Preparation and efficacy of Mequindox Nanoemulsion[M]. Northwest A&F University, 2012.
- [11] 边益庆,高娴. 复方利福昔明纳米乳剂的制备及质量评价[J]. 畜牧与饲料科学, 2018, 39(4):1–4.
- Bian Y Q, Gao X. Preparation and Quality Evaluation of Compound Rifaximin Nanoemulsion[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2018, 39(4):1–4.
- [12] 时菲菲,秦枫,王秀君,等. 氟苯尼考纳米乳制备及其抑菌效果观察[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(10):2936–2942.
- Shi F F, Qin F, Wang X J, *et al.* Preparation of Florfenicol Nanoemulsion and Observation of Its Antibacterial Effect[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(10):2936–2942.
- [13] 尹伦甫,陈昌福. 水产用伊维菌素纳米级微乳剂的研制[J]. 科学养鱼, 2009, 11:76.
- Yin L P, Chen C F. Preparation of ivermectin nanometer microemulsion for aquatic products[J]. Scientific Fish Farming, 2009, 11:76.
- [14] Miastkowska, Sikora E, Lason E, *et al.* Nano-emulsions as vehicles for topical delivery of forskolin[J]. Acta Biochim Pol, 2017, 64(4):713–718.

(编辑:侯向辉)