

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.01.07

替米考星固体分散体的制备与物相鉴定

巴娟¹, 张勇军¹, 邓桦¹, 杨少林², 李进², 杨鸿^{1*}

(1.佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东佛山 528231; 2.广东养宝生物制药有限公司, 广东佛山 528300)

[收稿日期] 2018-09-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 01-0044-06 [中图分类号] S859.796

[摘要] 为改善替米考星的水溶性, 提高其生物利用度, 选用聚乙二醇 6000 和泊洛沙姆 188 作为载体, 采用熔融法制备替米考星固体分散体。以体外累积溶出度为评价指标, 通过正交试验筛选最佳制备工艺, 选用 X-射线衍射法、傅里叶红外光谱法进行物相鉴定。结果显示, 替米考星固体分散体最佳制备工艺为联合载体 PEG6000 : P188 = 20 : 1、药载比 1 : 3、搅拌时间 1 h、固化时间 12 h; 物相鉴定表明, 替米考星为非晶态, 固体分散体为晶体结构, 替米考星以无定形态分散于载体中; 替米考星固体分散体在 2 min 时溶出度达到 71.8%, 15 min 时完全溶解, 显著提高了替米考星的溶出速率。该制备工艺简单, 选用联合载体制备替米考星固体分散体, 能够有效避免单一载体制备替米考星固体分散体出现的缺陷, 有效提高溶出度, 方便临床饮水用药。

[关键词] 替米考星; 联合载体; 固体分散体; 溶出度

Preparation and Phase Identification of Tilmicosin Solid Dispersion

BA Juan¹, ZHANG Yong-jun¹, DENG Hua¹, YANG Shao-lin², LI Jin², YANG Hong^{1*}

(1. College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231, China;

2. Guangdong Yangble Bio-pharmaceutical Co Ltd., Foshan, Guangdong 528300, China)

Corresponding author: YANG Hong, E-mail: yhong007@163.com

Abstract: In order to improve the water solubility and bioavailability of tilmicosin, the tilmicosin solid dispersion was prepared by melting method using PEG6000 and P188 as the carrier. Taking the accumulated dissolution *in vitro* as the evaluation index, the optimum preparation process was screened by orthogonal test. X-ray diffraction method and Fourier transform infrared spectroscopy were used to identify the solid dispersion. The results showed that optimal preparation process of solid dispersion of tilmicosin were combined carrier PEG6000 : P188 = 20 : 1, tilmicosin : carrier = 1 : 3, the stirring time was one hour and the curing time was 12 hours. The phase identification showed that tilmicosin was amorphous and the solid dispersion was crystal structure. Tilmicosin was dispersed in the carrier in an amorphous form. The dissolution rate of tilmicosin solid dispersion reached 71.8% at 2 min. It was completely dissolved at 15 min, which significantly improved the dissolution rate of tilmicosin. The

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2016A020210140); 广东省教育厅预防兽医学重点实验室项目(2014KTSPT037)

作者简介: 巴娟, 在读硕士研究生, 研究方向为新兽药研发。

通讯作者: 杨鸿。E-mail: yhong007@163.com

preparation process is simple, and the combined carrier is used to prepare the tilmicosin solid dispersion, which can avoid the defects of the solid dispersion of tilmicosin prepared by a single carrier, effectively improve the dissolution and facilitate the clinical use of drinking water.

Key words: tilmicosin; combined carrier; solid dispersion; dissolution

替米考星(Tilmicosin)是一种以泰乐菌素为前体半合成的大环内酯类畜禽专用抗生素^[1]。替米考星对革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性菌、支原体、螺旋体等均有良好的抑制作用,对胸膜肺炎放线菌、巴氏杆菌具有比泰乐菌素更强的抗菌活性,与临床常用抗生素无交叉耐药性^[2]。替米考星在水中极难溶解,具有较强的苦味,口服对胃部黏膜有刺激,生物利用度较低,在兽医临床上主要通过拌料给药,由于动物患病时易食欲不振,不能起到及时治疗疾病的作用,导致其在兽医临床上推广应用受到限制。固体分散体技术是将难溶性药物以微晶态、胶态、无定形态或分子状态高度分散在载体材料中的新型制剂技术,固体分散体技术可以提高难溶性药物的体外溶出速率,以改善药物的吸收和生物利用度^[3-5]。为增加替米考星的水溶性,提高其生物利用度,方便饮水给药,及时治疗疾病,本试验选用 PEG6000 和 P188 作为载体,采用熔融法制备替米考星固体分散体,旨在制备一种稳定、速溶的替米考星固体分散体制剂,给养殖业带来更大的方便以及利益。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 替米考星对照品(含量 93.9%,批号:K0311407,中国兽医药品监察所);替米考星原料药(含量 95.86%,批号:T2017127043,宁夏泰瑞制药有限公司);聚乙二醇 6000(PEG6000,批号:EK170713,上海伊卡生物技术有限公司);泊洛沙姆 188(P188,巴斯夫(中国)有限公司);磷酸、甲醇、乙腈、二正丁胺、四氢呋喃均为色谱纯。

1.2 仪器设备 LC-15C 高效液相色谱仪(岛津企业管理(中国)有限公司);MS-H-Pro+磁力搅拌器(大龙兴创实验仪器有限公司);RC-3 溶出度测定

仪(天津市新天光分析仪器技术有限公司);X 射线多晶衍射仪(德国 Bruker D8 ADVANCE);Bruker Vertex 傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司)。

1.3 替米考星含量测定方法的建立

1.3.1 色谱条件 色谱柱:C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为水:乙腈:磷酸二丁胺:四氢呋喃(805:115:25:55);检测波长 280 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min。

磷酸二丁胺溶液(1 mol/L):取二正丁胺 168 mL,加 10%磷酸溶液 700 mL,边加边搅拌,放冷后,用磷酸调节 pH 值至 2.5±0.1,加水至 1000 mL。

1.3.2 线性关系考察 精密称量 25 mg 替米考星对照品,置于 50 mL 量瓶中,加入 10 mL 乙腈,超声溶解,用 10%磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,制备成 500 μg/mL 的储存液。分别取储存液 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 10%磷酸溶液稀释至刻度,得到 5、25、50、100、150、200、250、300 μg/mL 的稀释液,分别取各浓度稀释液 20 μL 进样,记录色谱图峰面积,以替米考星溶液的浓度对峰面积作线性回归,得到线性回归方程为 $y = 27767x - 55380$ ($r^2 = 0.9999$),替米考星浓度在 5~300 μg/mL 范围内,与峰面积线性关系良好。

1.4 替米考星固体分散体的制备

1.4.1 载体筛选 分别取处方(表 1)中的载体置于烧杯中,57 ℃水浴加热至完全熔融,按处方加入替米考星,边加边搅拌,使替米考星完全融于介质中。搅拌 2 h 后从水浴中取出烧杯,迅速倒入预冷的不锈钢托盘中,然后转移至 -20 ℃ 的冰箱固化 4 h,取出置 35 ℃ 鼓风干燥箱干燥 24 h,从托盘中取出,研碎,过 80 目筛,置干燥器避光保存^[6-8]。

表 1 替米考星固体分散体配方

Tab 1 Formulation of the tilmicosin solid dispersion

配方	PEG6000:P188	PEG6000/g	P188/g	替米考星/g
1	1 : 0	12		4
2	0 : 1		12	4
3	1 : 1	6	6	4
4	2 : 1	8	4	4
5	5 : 1	10	2	4
6	10 : 1	12	1.2	4.4
7	20 : 1	12	0.6	4.2
8	50 : 1	12	0.24	4.08
9	100 : 1	12	0.12	4.04

1.4.2 正交试验设计 通过载体筛选等单因素考察后,按照正交设计表 $L_9(3^4)$,以三因素药载比(A)、搅拌时间(B)、固化时间(C)三水平进行设计(表 2),以累积溶出度为指标筛选出替米考星固体分散体的最佳制备工艺。

表 2 正交试验设计因素和水平

Tab 2 Factors and levels of orthogonal design

水平	A:药载比	B:搅拌时间/h	C:固化时间/h
1	1 : 1	1	4
2	1 : 2	2	8
3	1 : 3	3	12

1.5 溶出度测定 按兽药典中的桨法测定药物溶出度^[9]。取替米考星固体分散体适量(相当于替米考星原药 100 mg),溶出介质为经脱气处理的蒸馏水 900 mL,温度 37 ℃,转速 100 r/min,分别于 2、5、10、15、20、30、45、60 min 时定量取样 5 mL,同时补充等量同温介质 5 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,高效液相色谱法分别测定峰面积,代入标准回归方程,计算药物的累积溶出度。同一样品连续测定 3 次。

1.6 固体分散体物相鉴定 参照固体分散体表征手段^[10],本试验选用 X-射线衍射、傅里叶变换红外光谱用于替米考星固体分散体的物相鉴定。

1.6.1 X 射线衍射法 将替米考星原料药、载体、

物理混合物、固体分散体研碎过 80 目筛,进行 X 射线衍射分析,检测依据为 JY/T 009-1996 转靶多晶体 X 射线衍射方法通则。测试条件:Cu 靶,PIXcel ID 探测器,Ni 滤波片,电压:40 kV,电流:40 mA,角度范围:3°~60°,扫描速度:12°/min,取适量样品填充样品槽,压实刮平,使用正装法进样,分别进行 X 射线衍射分析。

1.6.2 红外光谱法 将替米考星原料药,载体,物理混合物、固体分散体研碎过 80 目筛,进行傅里叶红外光谱的分析,检测依据为 GB/T 6040-2002 红外光谱分析方法通则,分别取适量样品与 KBr 混合后压片,在 400~4000 cm^{-1} 进行红外扫描,分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数 32 次,进行红外光谱分析,记录图谱。

2 结果与分析

2.1 载体筛选结果分析 由累积溶出度图(图 1)可知,选用 PEG6000 单一载体制备替米考星固体分散体,溶出速率并不是太快,2 min 时溶出度只达到 20%,随着载体 P188 比例的增加,固体分散体的溶出速率越快,累积溶出度越高。但实际制备过程中,随着载体 P188 比例的增加,固体分散体的粘性越大,易粘结成团。最终试验选用联合载体 PEG6000 : P188 = 20 : 1 制备替米考星固体分散体,提高溶出速率的同时,也能够避免单一载体制备替米考星固体分散体出现的缺陷。

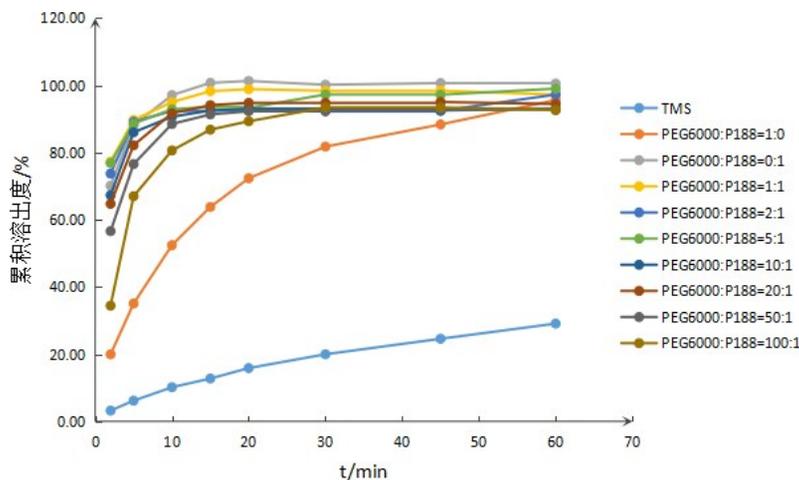


图 1 累积溶出度图

Fig 1 Chart of cumulative dissolution

2.2 正交试验与溶出度结果 根据正交试验结果 (表 3)可知, $A_3 > A_2 > A_1$, $B_1 > B_3 > B_2$, $C_3 > C_1 > C_2$, 最优制备工艺为 $A_3B_1C_3$, 即药载比 1 : 3, 搅拌时间 1 h,

固化时间 12 h。此制备工艺制备的替米考星固体分散体在 2 min 时溶出度达到 71.8%, 15 min 时可完全溶解, 显著提高了替米考星的溶出速率。

表 3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	累积溶出度/%
1	1	1	1	1	92.37
2	1	2	2	2	91.57
3	1	3	3	3	92.35
4	2	1	2	3	95.87
5	2	2	3	1	95.44
6	2	3	1	2	95.10
7	3	1	3	2	96.13
8	3	2	1	3	95.70
9	3	3	2	1	95.62
K1	92.10	94.79	94.39		
K2	95.47	94.24	94.35		
K3	95.82	94.36	94.64		
R	3.72	0.55	0.29		

2.3 X 射线衍射分析 由图 2 可知, 替米考星在低角度出现一些衍射峰叠加在一起, 没有特征衍射峰出现, 说明替米考星是非晶态, 是一种无定型物质。联合载体、物理混合物、固体分散体在衍射角 19° 和 23° 处分别具有较强的衍射特征峰, 但物理混合物、

固体分散体的衍射峰都有降低, 说明载体为晶体结构, 替米考星主要以无定型状态分散在载体中, 替米考星固体分散体为晶体结构, 这与其他文献中报道的检测结果一致^[11]。

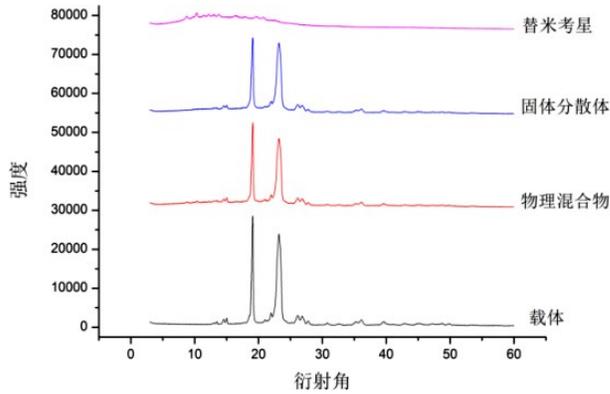
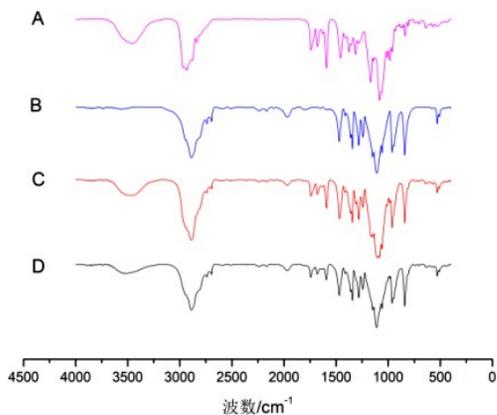


图 2 X 射线衍射图谱

Fig 2 Results of X-ray diffraction

2.4 傅里叶红外光谱分析 参照文献中替米考星、PEG6000 和 P188 红外光谱图分析^[11-13],由红外光谱图(图 3)可知,替米考星在 3452cm^{-1} 处具有一个较宽吸收峰,是游离的羟基伸缩振动吸收峰,在 $2933\sim 2836\text{cm}^{-1}$ 处具有吸收峰,是 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2$ 的伸缩振动峰,在 1741 、 1679cm^{-1} 处具有稍弱吸收峰,是碳碳双键与羰基的不饱和伸缩振动吸收峰,在 1593cm^{-1} 、 1457cm^{-1} 有尖锐吸收峰,是 $\text{N}-\text{H}$ 和 $\text{C}-\text{H}$ 的振动吸收峰,在 1168 、 1083cm^{-1} 处有较强吸收峰,是 $\text{C}-\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的伸缩振动吸收峰。



A 为替米考星, B 为联合载体, C 为替米考星和联合载体物理混合物, D 为替米考星固体分散体

图 3 红外光谱图

Fig 3 Fourier infrared spectroscopy

通过对比替米考星、载体与固体分散体红外光谱图,固体分散体中的替米考星在 3452cm^{-1} 处的

吸收峰发生了移动,而且吸收峰的强度明显降低,在 1741 、 1679 、 1593cm^{-1} 处的吸收峰明显降低,在 1457cm^{-1} 和 1168cm^{-1} 的吸收峰已经消失。载体的特征吸收峰基本都在,并且无较大变化,说明替米考星已分散于载体中,为替米考星固体分散体的形成提供参考依据。

3 讨论与结论

近几年来,有人在替米考星制剂的研究中采用了微囊、纳米乳、包合物、脂质体等新技术,在一定程度上,提高了药物的溶解度,掩盖了替米考星的苦味,并且具有缓释、靶向的作用^[14-16]。但是大部分技术需要加入大量有机试剂,难以除尽,存在成本较高、步骤繁琐、污染环境等问题,因而限制了增溶新技术在替米考星制剂实际生产中的应用。

熔融法制备固体分散体时,不需要加入有机试剂,且制备工艺简单。目前固体分散体的老化现象限制了该技术在工业生产和临床上的应用,可以通过调整载体理化性质、采用联合载体、改善贮存环境等因素提高固体分散体的稳定性。PEG6000 是一种水溶性高分子聚合物,具有良好的水溶性和生物相容性,而 P188 是一种非离子型表面活性剂,载药量大,能抑制产品结晶^[17-18]。

本试验分别选用了 PEG6000 和 P188 作为载体制备替米考星固体分散体,结果发现 PEG6000 作为载体制备的固体分散体质地硬,溶出速率稍慢,2 min 时溶出度达到 20%,而 P188 作为载体制备的固体分散体质地较软,粘性大,流动性差,但溶出速率较快,2 min 时溶出度达到 70%。P188 价格也较为昂贵,综合各因素考察,试验选用 PEG6000 和 P188 联合载体,经过筛选,选用 PEG6000 : P188 = 20 : 1 制备替米考星固体分散体,通过正交试验对制备工艺进行优化,X 射线衍射法和傅里叶红外光谱法也说明替米考星固体分散体形成,替米考星以无定型态分散于载体中。该制备工艺简单,避免了单一载体制备替米考星固体分散体出现的缺陷,提高溶出速率的同时,又能降低经济成本,替米考星固体分散体易溶于水,方便饮水给药,可及时治疗疾病,给养殖业带来更大的方便以及利益。

参考文献:

- [1] 杜昌余,王洪光,林卫瑞,等. 替米考星 Eudragit L100 纳米粒的制备及体外评价[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(11): 848-852.
Du Ch Y, Wang H G, Lin W R, *et al.* Preparation of tilmicosin-eudragit L 100-nanoparticles and its characteristics *in vitro* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(11): 848-852.
- [2] 吉明霞. 单凝聚法制备替米考星明胶微囊的工艺研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2016.
Ji M X. Study on technology of simple coacervation for tilmicosin gelatine microcapsules [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2016.
- [3] Onoue S, Sato H, Ogawa K, *et al.* Improved dissolution and pharmacokinetic behavior of cyclosporine a using highenergyamorphous solid dispersion approach [J]. Int J Pharm, 2010, 399(1/2): 94-101.
- [4] Hong S W, Lee B S, Park S J, *et al.* Solid dispersion formulations of megestrol acetate with copovidone for enhanced dissolution and oral bioavailability [J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(1): 127-135.
- [5] Liu Y S, Gao S, Ke X, *et al.* Recent research advances in solid dispersions of poorly soluble drugs [J]. Prog Pharm Sci, 2013, 37(4): 166-173.
- [6] 吕彪,刘三侠,孙雪峰,等. 替米考星固体分散体的制备及质量评价[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(9): 68-71.
Lv B, Liu S X, Sun X F, *et al.* Preparation and quality evaluation of tilmicosin solid dispersion [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015, 47(9): 68-71.
- [7] 彭霞,何江梅,黄兴亮,等. 泊洛沙姆固体分散体对辛伐他汀溶出特性的影响[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(2): 178-180.
Peng X, He J M, Huang X L, *et al.* Effect of poloxamer solid dispersion on the dissolution of simvastatin [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2013, 28(2): 178-180.
- [8] 董春柳,刘艳艳,王天梓,等. 阿苯达唑固体分散体的制备及分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(6): 1018-1023.
Dong Ch L, Liu Y Y, Wang T Z, *et al.* Preparation and analysis of albendazole solid dispersions [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(6): 1018-1023.
- [9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2015年版一部)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 附录 163.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia (2015 edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: appendix 163.
- [10] 梅丽,金方. 固体分散体表征手段的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(8): 782-788.
Mei L, Jin F. Advances in characterization methods of solid dispersion [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2014, 45(8): 782-788.
- [11] 张小洪. 脂质体、分散体和肠溶包衣替米考星体外释放和抑菌研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2014.
Zhang X H. Effects of dissolution and antibacterial activity *in vitro* of tilmicosin, using liposome/solid dispersion/enteric-coated approach [D]. Chongqing: Chongqing University, 2014.
- [12] 吕淑荣. 替米考星的合成与质量研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
Lv Sh R. The synthesis and quality research of tilmicosin [D]. Qindao: Ocean University of China, 2005.
- [13] 董春柳. 阿苯达唑固体分散体的制备及其在犬体内药代动力学研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
Dong Ch L. Study on the preparation of albendazole solid dispersion and its pharmacokinetics in dogs [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [14] 梁劲康,吴志玲,黎乃添,等. 替米考星微囊的体外释放特性考察[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(5): 41-47.
Liang J K, Wu Zh L, Li N T, *et al.* Study on *in vitro* release behavior of tilmicosin microcapsules [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(5): 41-47.
- [15] 王晓芳,刘军锋,董玉玲,等. 替米考星固体脂质纳米乳的制备及体外抗菌效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, (5): 132-211.
Wang X F, Liu J F, Dong Y L, *et al.* Preparation of tilmicosin solid lipid nanoemulsion and its antibacterial effect *in vitro* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, (5): 132-211.
- [16] 牛建国,高保磊. 一种替米考星- β 环糊精包合物及其制备方法[P]. 河南: CN103655595A, 2014-03-26.
Niu J G, Gao B L. Tilmicosin- β cyclodextrin inclusion compound and preparation method thereof [P]. Henan: CN103655595A, 2014-03-26.
- [17] 周巧云,张朝晖,潘俊芳,等. 泊洛沙姆为载体的疏水性药物新剂型研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(4): 315-319.
Zhou Q Y, Zhang Zh H, Pan J F, *et al.* Development of poloxamers used as carriers for new dosage forms of hydrophobic drugs [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2011, 28(4): 315-319.
- [18] 曾庆成. 固体分散技术的研究进展[J]. 中南药学, 2017, 15(1): 81-84.
Zeng Q Ch. Research progress in solid dispersion technique [J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(1): 81-84.