

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.01.009

长效伊维菌素注射液在山羊体内的药动学研究

段培强¹, 潘方燕¹, 曾杨梅²,
陈红伟^{1,2}, 姜波², 吴俊伟^{1,2}

1. 西南大学 动物科学学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 重庆布尔动物药业有限公司, 重庆 荣昌 402460

摘要: 研究新型长效伊维菌素注射液在山羊体内的动力学特征. 按照 0.2 mg/kg 的剂量给山羊单次皮下注射药物, 使用 3p97 软件分析处理实验数据. 结果表明: 长效伊维菌素注射液比普通伊维菌素注射液吸收更加充分, 半衰期更长, 毒副作用更小, 作用效果更强.

关键词: 伊维菌素; 药物代谢动力学; 山羊; 长效制剂

中图分类号: S827

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)01-0075-06

伊维菌素^[1-2]是一类高效、广谱、低毒性的大环内酯类抗寄生虫药物, 对体内外寄生虫特别是线虫和节肢动物有良好的驱杀作用, 深受广大养殖户的好评. 但其存在较多的缺陷, 如药效时间短, 需反复多次给药, 吸收不充分, 生物利用度低等^[3-4]. 本研究旨在研发一种药效时间更长, 吸收利用率更高, 毒副作用更小的伊维菌素注射液, 并为该药物的生产使用提供相应的理论数据.

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品

1% 长效伊维菌素注射液, 重庆布尔动物药业有限公司提供, 规格: 100 mL : 1 g, 批号: 161225; 1% 普通伊维菌素注射液, 重庆布尔动物药业有限公司提供, 规格: 100 mL : 1 g, 批号: 161218; 伊维菌素对照品, 含量为 93.8%, 批号: 0190812, 中国兽医药品监察所; 甲醇(HPLC): 安徽天地高纯溶剂有限公司; 乙腈(HPLC): 安徽天地高纯溶剂有限公司.

1.1.2 衍生化试剂

N-甲基咪唑、三氟乙酸酐: 美国 Sigma 公司.

1.1.3 仪器设备

JE202 型电子天平; TD4K 型台式低速离心机; UltiMate3000 型高效液相色谱; 色谱柱: AcclaimTM120 C18(5 μ m 120 A 4.6 mm \times 250 mm); D-37520 型台式高速离心机; DW-86L338 型超低温冷藏柜; XW-80A 型涡旋混合仪器.

1.1.4 试验动物

健康荣昌本地黑山羊 12 只, 雌、雄各半, 体质量为(24.08 \pm 2.89) kg, 正常饲养管理. 以青绿牧草为

收稿日期: 2019-11-27

基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0040).

作者简介: 段培强, 硕士, 主要从事动物药理学研究.

通信作者: 吴俊伟, 教授.

主, 精料为不添加抗寄生虫药物和抗生素的全价饲料, 自由饮水, 试验前临床观察 3 d. 试验开始前进行随机分组, 并采血检查. 确保所有试验用山羊的血液中不含有伊维菌素.

1.2 伊维菌素含量测定方法

用高效液相色谱(HPLC)法测定药物的准确含量, 所得结果用于计算准确的给药量, 以保证实验数据的准确性和可靠性.

1.2.1 色谱条件

检测波长: 254 nm; 流动相: 甲醇: 乙腈: 水=35: 53: 12; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C

1.2.2 药物稀释

将 1%伊维菌素注射液配置成 0.2 mg/mL 的质量浓度. 精密量取 2 mL 伊维菌素溶液, 置 100 mL 容量瓶中, 用色谱级无水甲醇定容, 摇匀, 再用 0.22 μ m 的有机滤头过滤即得. 长效和普通伊维菌素注射液分别配置 3 个批次.

1.3 药动学试验方法

1.3.1 给药及血样采集

将 12 只山羊随机分为 A、B 两组, A 为长效伊维菌素注射液组(简称: 长效组), B 为普通伊维菌素注射液组(简称: 普通组). 按 0.2 mg/kg 的剂量单次皮下给药, 给药后 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, 240 h, 336 h, 432 h, 528 h 颈静脉采血, 每次采血样 3 mL, 放置在 5 mL 含肝素钠的离心管中, 混匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层清液, 放置在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内, 待用.

1.3.2 血浆样品处理

往装有 0.5 mL 血浆的离心管中加乙腈 1 mL, 涡旋 30 s, 然后 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液置于 10 mL 离心管中, 并往其中加入乙酸乙酯 4 mL, 涡旋 1 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于另一新的 10 mL 离心管中, 再向残渣中加入 2 mL 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 50 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 待衍生化.

1.3.3 衍生化

往试管中加衍生化试剂 A (N-甲基咪唑: 乙腈=1: 1)100 μ L, 涡旋混匀 30 s; 再加衍生化试剂 B(三氟乙酸酐: 乙腈=1: 2) 150 μ L, 涡旋混匀 30 s, 密封避光, 室温下放置 15 min, 再往其中加入 750 μ L 甲醇, 涡旋混合 30 s, 过 0.22 μ m 有机滤膜, 装入 2 mL 棕色进样瓶中, 供高效液相色谱(HPLC)测定.

1.3.4 色谱条件

流速: 1.5 mL/min; 进样量: 20 μ L; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 荧光检测: 激发波长 365 nm, 发射波长: 475 nm; 洗脱梯度见表 1.

表 1 洗脱梯度

时间/min	甲醇/%	乙腈/%	乙酸/%
0	39	55	6
13	39	55	6
15	45	55	0
25	39	55	6

注: 表 1 中数值表示流动项中各物质的不同含量.

1.4 方法学验证

1.4.1 标准曲线的建立

用伊维菌素对照品配置 5 μ g/mL 和 0.5 μ g/mL 的原液, 再取一定量的原液加入到空白血浆中, 使其质量浓度为 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL, 经蛋白处理和衍生化后用高效液相色谱(HPLC)进行检测, 得出相应数据. 以峰面积的比值(S)对质量浓度(C)作线性回归, 求出回归方程和相关系数. 相关系数(R)要求大于 0.99.

1.4.2 精密度与准确度测定

精密度用批内和批间的相对标准偏差值(RSD)来考察, RSD 值应小于 15%。准确度应在 85%~115% 范围内。用伊维菌素对照品配置 100 ng/mL, 50 ng/mL, 5 ng/mL 共 3 个质量浓度的样品, 每个质量浓度配置 5 份, 配置方法与 1.4.1 相同。连续 3 d 测定 3 个不同批次的样品即可。

1.4.3 提取回收率

用伊维菌素对照品配置 100 ng/mL, 50 ng/mL, 5 ng/mL 共 3 个质量浓度样品, 每个质量浓度配置 5 份, 配置方法与 1.4.1 相同。要求回收率大于 70%。

1.5 数据处理及统计分析

药时数据用 3p97 软件处理, 选择出最适宜的代谢动力学模型。药动学参数、血药质量浓度显著性分析用 SPSS 软件处理。

2 结果

2.1 伊维菌素含量测定

长效组的准确含量为标示量的 101.73%, 普通组的准确含量为标示量的 109.54%, 符合兽药典的规定。测定峰面积结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 HPLC 法测定伊维菌素的峰面积($\bar{X} \pm SD, n=3$)

数 据	组 别		
	长效组峰面积	普通组峰面积	对照品峰面积
$\bar{X} \pm SD$	52.920 9 \pm 1.031 8	61.296 2 \pm 1.350 4	55.955 4 \pm 0.346 8
准确含量/%	101.73	109.54	

2.2 回收率、标准曲线及变异系数

伊维菌素在质量浓度为 1 ng/mL~100 ng/mL 的范围内线性关系良好, 回归方程为 $y=4\ 475x+3\ 075$ (y 为药物峰面积, x 为药物质量浓度), 相关系数 $r=0.999$ (图 2)。以 100 ng/mL, 50 ng/mL 和 5 ng/mL 3 个添加质量浓度测定血浆样品中伊维菌素的回收率分别为 95.79% \pm 1.33%, 92.8% \pm 0.87%, 76.72% \pm 1.09%, 批间变异系数分别为 0.46%, 0.56%, 0.63%; 批内变异系数分别为 0.5%, 0.35%, 0.93% (表 3)。本试验的色谱峰型尖锐, 血浆中杂质分离良好, 无明显的干扰峰(图 3)。

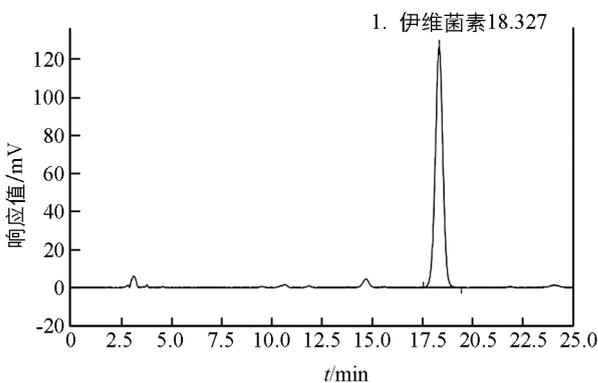


图 1 HPLC 法测定伊维菌素的峰面积色谱图

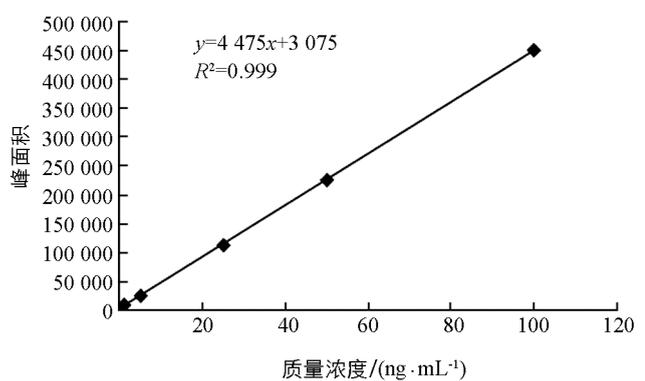


图 2 伊维菌素在山羊血浆中的标准曲线

表 3 回收率及变异系数($\bar{X} \pm SD, n=3$)

药物质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	回收率/ % \pm SD	变异系数/%	
		批间	批内
5	76.72 \pm 1.09	0.63	0.93
50	92.80 \pm 0.87	0.56	0.35
100	95.79 \pm 1.33	0.46	0.50

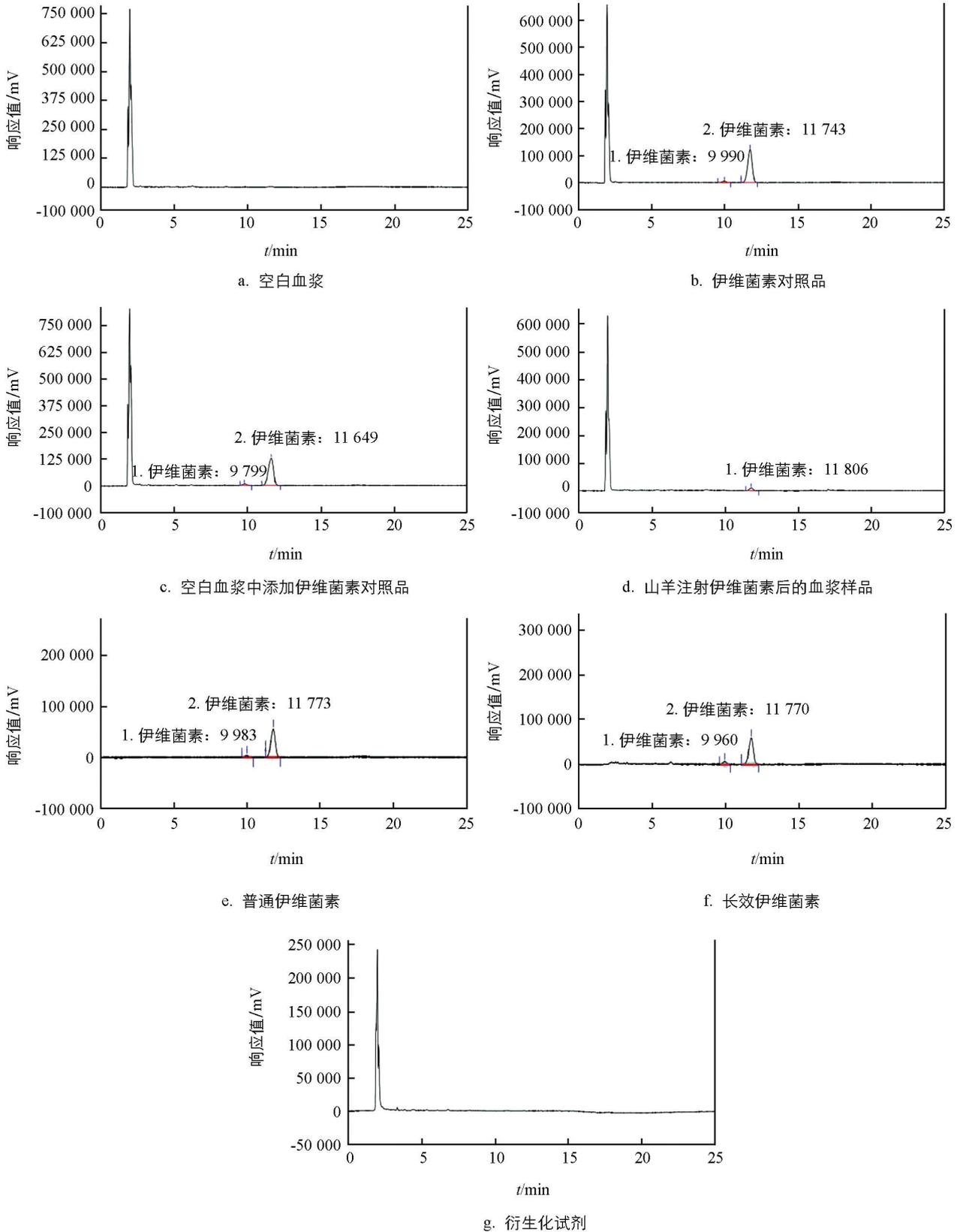


图 3 伊维菌素專屬性高效液相色谱图

2.3 山羊体内的药动力学特征

不同时间血药质量浓度实测平均值见表 4, 相应的药动力学参数见表 5, 相应的药时曲线见图 4.

表 4 山羊体内各时间点的血药质量浓度($\bar{X} \pm SD, n=6$)

采血时间/ h	血药质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		采血时间/ h	血药质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	
	长效组	普通组		长效组	普通组
1	1.73±0.49	1.74±0.97	72	7.79±0.62	5.55±0.83
2	2.80±1.29	3.14±0.84	96	6.20±1.08	4.28±1.25
4	3.53±0.76	3.73±1.06	144	5.02±0.54	2.41±0.61
8	7.57±0.92	8.03±0.84	240	3.72±0.23	1.30±0.22
12	10.45±1.39	8.10±0.23	336	2.84±0.54	N. D
24	12.17±0.84	8.38±0.42	432	1.95±0.69	N. D
48	9.47±1.14	7.50±1.38	528	1.26±0.25	N. D

注: N. D: 表示未检出。

表 4 A、B 两组的药动学参数值($\bar{X} \pm SD, n=6$)

参数名称	单位	数 值	
		长效组(A)	普通组(B)
A	ng/mL	17.113 2±7.205 6*	6.853 8±3.693 5*
alpha	1/h	0.036 7±0.009 0	1.542 1±3.250 2
B	ng/mL	8.135 9±1.017 3	9.840 3±3.676 9
beta	1/h	0.003 5±0.000 7**	0.009 8±0.003 2**
Ka	1/h	0.076 8±0.015 8	0.114 0±0.041 4
V/f(c)	L	0.011 4±0.001 3	0.013 1±0.007 0
T1/2(alpha)	h	19.836 7±4.751 5**	15.878 3±18.719 7**
T1/2(beta)	h	211.249 1±40.515 8*	70.900 6±17.647 5*
K21	1/h	0.018 1±0.004 3	0.161 3±0.189 2
K10	1/h	0.007 0±0.001 5	0.063 1±0.122 7
K12	1/h	0.025 1±0.026 8	1.327 5±3.042 8
AUC	(ng/mL)×h	2 566.770 9±350.031 1**	1049.355 8±216.692 7**
CL/f(s)	L/h	0.0000 8±0**	0.000 2±0**
Tpeak	h	25.226 3±4.623 2	22.107 3±4.453 6
Cmax	ng/mL	10.981 9±0.581 9**	8.722 8±0.550 8**
T1/2(ka)	h	9.430 3±2.372 2	6.715 1±2.208 5

注: * 表示差异具有统计学意义($p < 0.05$); ** 表示差异极具有统计学意义($p < 0.01$); 无肩标表示差异不具有统计学意义($p > 0.05$)。

3 结 语

分析 A、B 两组的主要动力学参数可知, 改良处方及生产工艺的长效伊维菌素注射液在山羊体内吸收更充分、更完全, 降低了毒副作用, 延长了半衰期. 长效组的达峰质量浓度(Cmax)为 10.981 9 ng/mL, 达峰时间(Tpeak)为 25.226 3 h, 与普通组的 Cmax 值(8.722 8 ng/mL)和 Tpeak 值(22.107 3 h)相比较, 长效组药物在体内达峰时间更长且质量浓度更高, 其安全性更佳, 药效更好.

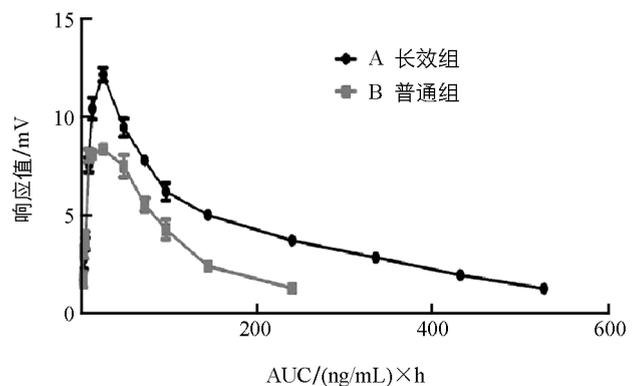


图 4 A、B 两组的药时曲线

长效组的 AUC 值为 $2566.7709(\text{ng/mL}) \times \text{h}$, 比普通组的 AUC 值增加了 $1517.4151(\text{ng/mL}) \times \text{h}$, 表明其分布更广泛、更均匀, 作用时间相对延长, 起到缓释长效的作用。

分析其原因, 可能是与长效组药物血浆蛋白结合率变高有关。药物在体内以结合型和游离型两种状态存在, 仅游离型药物分子易被分布代谢^[5]。当结合率变高, 使得血管内游离的药物分子减少, 药物吸收更加完全, 并且避免了药物短时间, 高质量浓度地集聚在作用部位而出现毒副作用^[6-7]。药物在代谢过程中, 结合型的药物分子不能被机体所代谢^[8-9], 且体内游离的药物分子和结合型的药物分子处于一种动态平衡状态, 药物与血浆蛋白结合率变高, 游离的药物分子减少, 故能有效地延长药物的代谢时间, 达到长效的目的。

参考文献:

- [1] 王作洲. 阿维菌素类药物兽医临床驱虫应用研究进展 [J]. 畜牧兽医杂志, 2009(4): 32-35.
- [2] OMURA S. Ivermectin: 25 Years and Still Going Strong [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(2): 91-98.
- [3] 魏海涛, 倪姮佳, 方秋华, 等. 伊维菌素药动学研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2010(9): 50-52.
- [4] 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(5): 72-78.
- [5] NAKAO T, BANBA S, HIRASE K. Comparison Between the Modes of Action of Novel Meta-Diamide and Macrocylic Lactone Insecticides on the RDL GABA Receptor [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2015, 120: 101-108.
- [6] 李 铭, 冯 伟, 李 术. 阿维菌素类药物对非靶动物毒理学的研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(12): 126-130.
- [7] 文 豪. 伊维菌素微乳在羊体内的药代动力学与残留研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [8] 潘保良, 王玉万, 汪 明. 阿维菌素长效注射液(油悬剂)与普通注射液在绵羊体内的药代动力学比较研究 [J]. 中国兽药杂志, 2003(3): 18-21.
- [9] 任丽君, 郭玉娟, 姚 军, 等. 伊维菌素缓释注射液的制备工艺及在绵羊体内药代动力学研究 [J]. 西北药学杂志, 2016(5): 497-500.

Pharmacokinetical Study of a Long-Acting Ivermectin Injection in Goats

DUAN Pei-qiang¹, PAN Fang-yan¹, ZENG Yang-mei²,
CHEN Hong-wei^{1,2}, JIANG Bo², WU Jun-wei^{1,2}

1. College of Animal Science, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;

2. Chongqing Bull Animal Pharmaceutical Co. Ltd., Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: An experiment was conducted to study the pharmacokinetics of a novel long-acting ivermectin injection in goats. Subcutaneous injection of a dose of 0.2 mg/kg was made, and the 3p97 software was used to acquire the plasma concentration-time curve. The results showed that this long-acting ivermectin injection had more absorption, longer half-life, less toxic side effects and stronger parasiticidal effect than common ivermectin injections.

Key words: ivermectin; pharmacokinetics; goat; long-acting preparation