

# 伊维菌素微球在家兔体内的药动学<sup>\*</sup>

王敏儒<sup>\*\*</sup> 陈杖榴 冯淇辉

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

**摘要** 皮下注射伊维菌素(IVM)微球悬液(5.0mg/kg及10.0mg/kg)和害获灭(1%伊维菌素, 0.5mg/kg), RP-HPLC-UV法定量, 研究了IVM在家兔体内的药物动力学。害获灭皮下注射给药, 药-时数据符合一级吸收一室开放模型, 主要动力学参数为:  $t_{1/2ka} = 7.24 \pm 2.96h$ ;  $t_{1/2ke} = 36.38 \pm 8.66h$ ;  $t_{max} = 21.46 \pm 4.82h$ ;  $C_{max} = 22.53 \pm 2.32ng/ml$ ;  $AUC = 1749 \pm 318ng/1.h$ , 其动力学参数表现比较明显的个体差异, 且与其它动物有明显差别。微球皮下注射一周后, 血药浓度呈较稳定状态, 到第42天(高剂量组)和第32天(低剂量组), 血浆中测不出 $H_2B_{1a}$ (低于2.5ng/ml)。以房室模型拟合, 微球高低剂量组均符合有吸收二室开放模型, 主要药动学参数均表现显著的个体差异。

**关键词** 伊维菌素, 微球, 药动学, 家兔

在目前乃至今后相当长时期内, 应用抗寄生虫药仍是控制动物寄生虫病的有效手段。伊维菌素(Ivermectin, IVM)是一种新型高效、广谱、低毒、安全的抗生素, 对家畜的多种体内外寄生虫均有效, 而且与其它抗寄生虫药无交叉耐药性<sup>[5]</sup>。目前在国内外已广泛应用, 是众多抗寄生虫药中效果最好的一种。在可以预计的将来, 包括伊维菌素在内的埃维菌素类仍将长期应用于兽医临床。但是, 伊维菌素目前只有普通制剂, 每次给药维持时间短, 需多次给药, 存在应用不便, 又耗费大量人力物力等缺点。因而开发长效控释制剂是畜牧业发展的客观需要<sup>[4]</sup>。国内外已就伊维菌素以及某些苯并咪唑类药的长效控释制剂开展了研究<sup>[2,3,7]</sup>, 有些已经投放市场。微球(Microspheres, MS)是近年来发展起来的一种新剂型, 是以天然或人工合成的高分子材料将药物包裹其中, 具有控制释放、靶向给药、降低毒副作用等特点, 其应用范围越来越广<sup>[1,6]</sup>。但在兽医药界, 有关微球制剂的研究尚处于起步阶段。伊维菌素在较低组织(血液)浓度时即可控制杀灭动物体内、体表的寄生虫。选择合适的囊材和制备工艺, 制备不同应用目的的微球, 可以在动物体内缓慢控制释药, 维持稳定而持久的血液(组织)浓度, 达到长期防治寄生虫病的目的。研究伊维菌素微球的药动学, 可准确认识其在体内的释药规律。本实验旨在通过对伊维菌素PLA微球在家兔体内药动学的研究, 评价其体内释药规律, 为研究伊维菌素长效控释制剂打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 药品与试剂: 伊维菌素微球(自制, PLA分子量8.2万, IVM含量25%), 伊维菌素标

\* 国家自然科学基金资助项目 39770572。

\*\* 现在工作单位: 佛山科学技术学院动物医学系, 528231。

\*\*\* 收稿日期 1998-09-10。

准品( $H_2B_{1a}$ 含量为 95.36%, 中国兽药监察所惠赠), 害获灭注射液(1% 伊维菌素无菌注射液, 荷兰哈勒姆市默沙东药厂, 批号 HB35700), 乙腈(HPLC 级, 爱尔兰 LABSCAN 公司产品, 批号 4051/6), 二氯甲烷、甲醇、丙酮及其它试剂(分析纯, 均为国产)。

1.1.2 仪器: 高效液相色谱仪(HP1100 系列, 包括四联泵、脱气泵、紫外检测器、工作站, 美国惠普公司), 电子分析天平(AE 160 型, 瑞士 Mettler 公司), 80-2B 型台式离心机(上海安亨科学仪器厂), HY-4 型调速多用振荡器(广州市富城仪器厂), FZQ-2 型旋涡混合器(江苏省泰县医疗器械厂), 可调微量加样器(1000 $\mu$ l 和 100 $\mu$ l, 法国 Gilson 公司)。

1.1.3 动物: 新西兰大白兔, 购自第一军医大学实验动物中心。

## 1.2 试验方法

1.2.1 动物分组、给药及采血: 动物随机分为 3 组, 分别为害获灭组(0.5mg/kg)、高剂量(10.0mg/kg)和低剂量(5.0mg/kg)微球组。害获灭注射液以 0.25ml 微量注射器皮下注射; 微球用含有羧甲基纤维素钠和吐温-20 的生理盐水 2ml 混悬, 背部皮下注射。给药后一定时间自耳静脉采血, 肝素抗凝分离血浆, 置于低温冰箱待测。

1.2.2 血浆样品预处理: 血浆 1.0ml, 置于 10ml 离心管, 加丙酮 1.5ml, 置悬涡混合器混匀, 静置 15min, 加水 1.5ml, 混匀, 4 000r/min 离心 15min, 移取上清至 12ml 有盖试管。沉淀各加 1ml 丙酮和水, 混匀, 离心取上清, 合并上清。上清加 5ml 二氯甲烷, 加盖后置水平振荡器, 以每分钟 200 次振荡 20min, 3 000r/min 离心 10min, 用滴管吸取下层有机相置于 10ml 磨口玻璃离心管。上层以 4ml 二氯甲烷重复提取 2 次, 合并二氯甲烷, 在  $N_2$  流下 50 $^{\circ}C$  水浴中挥干; 加 50 $\mu$ l 甲醇, 加塞, 置旋涡混合器 3min 溶残渣, 3 000r/min 离心 5min, 上清进样 20 $\mu$ l 测定。

1.2.3 标准曲线: 取空白血浆 1ml, 分别加入伊维菌素标准工作液 50 $\mu$ l, 制成含  $H_2B_{1a}$  分别为 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 和 160ng/ml 的标准品血浆系列。按照血浆样品预处理方法抽提后, 50 $\mu$ l 甲醇溶残渣, 进样 20 $\mu$ l 测定。以峰面积对浓度进行线性回归, 得到的回归方程即为计算血药浓度的标准曲线。

1.2.4 回收率测定: 取空白血浆 1ml, 分别加入 0.05, 0.2, 0.4 和 0.8 $\mu$ g/ml 伊维菌素标准工作液 50 $\mu$ l, 按 1.2.2 项方法抽提并测定。

1.2.5 色谱条件: 色谱柱: ODS Hypersil, 5 $\mu$ m, 125 $\times$ 4mm, 惠普公司产品; 流动相: 乙腈/甲醇/水(40/45/15, v/v); 流速: 1ml/min; 紫外检测波长: 245nm。

1.2.6 数据处理: 将每个样品经 HPLC 测定的峰面积按标准曲线换算为相应的浓度, 血药浓度时间数据则以 MCPKP 软件在计算机上进行房室模型拟合。同时, 微球组以血药浓度平均值对时间作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理

测定血浆或组织中伊维菌素含量, 主要采用 HPLC 法、放射化学分析法以及免疫分析技术。放射化学分析法可用于研究伊维菌素的代谢; HPLC 法更常用于药动学或残留研究, 又可分为 NP-HPLC-UV, RP-HPLC-UV 及 RP-HPLC 荧光检测方法等。NP-HPLC-UV 不能区分  $H_2B_{1a}$  和  $H_2B_{1b}$ ; RP-HPLC 荧光检测法灵敏度高, 但干扰因素多, 前处理复杂, 对玻璃仪器、溶剂要求极高, 限制了其普遍应用; 而随着高灵敏度紫外检测器的出现, RP-HPLC-UV 法已能满足

药动学研究的需要。前处理一般采用有机溶剂萃取、预处理柱富集提纯及二者的结合。有机溶剂提取工作量较大,但小柱预处理成本高,前者可能暂时更适合我国国情。本实验中,以丙酮水沉淀蛋白,二氯甲烷抽提。抽提过程中注意玻璃仪器严格清洗,所用有机溶剂均重新蒸馏。处理后的样品以 HPLC 进行测定,药峰分离良好,无干扰峰,色谱图见图 1,  $H_2B_{1a}$  保留时间为 9.4~9.5min 左右,  $H_2B_{1b}$  为 7.4min 左右。本方法可测定浓度为 2.5ng/ml 的血浆样品,基本满足了药动学研究的需要。由于本研究所采用的动物是家兔,考虑到采血时间较长,家兔体重较小,每个时间点采血量不宜过大,所以靠增大血浆样品量来提高检测限并不现实。从研究的角度,或可采用其它灵敏度更高的方法,如免疫分析法。

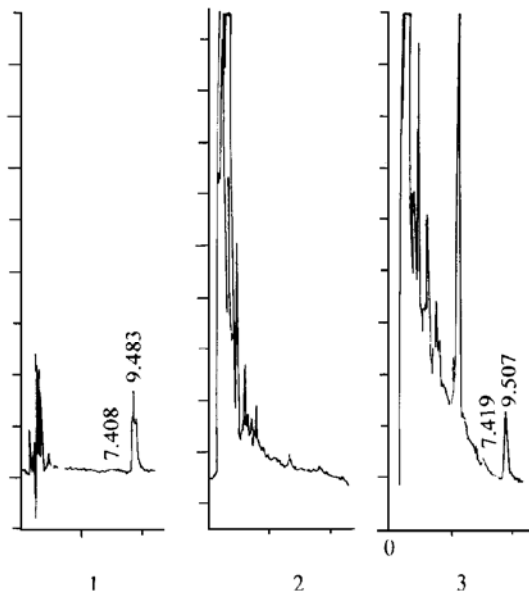


图 1 伊维菌素标准品及血浆样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograph of ivermectin

- 1 伊维菌素标准品 Ivermectin
- 2 空白血浆对照 Controlled plasma
- 3 给药后的血浆抽提液 Drug administered animal plasma

## 2.2 标准曲线与添加回收率

2.2.1 标准曲线: 本实验采用新型 RP-1100 系列 HPLC 系统及紫外检测器, IVM 标准品进样 1ng/20 $\mu$ l, 仪器的响应为峰面积 500 左右, 进样量低于 1ng, 药峰就会被背景噪音所掩盖。因尚无合适内标物, 本实验采用外标法。按实际浓缩倍数折算, 可测定 IVM 浓度为 2.5ng/ml 的血浆样品。在制备标准曲线时, 每毫升血浆添加标准品 2.5~160ng, 按血浆样品预处理方法抽提并测定, 测得峰面积与浓度之间呈线性正相关, 不同批次间重复性好。标准曲线回归方程:

$$C(\text{ng/ml}) = -0.2353 + 0.005825A, r = 0.9962$$

2.2.2 回收率及变异系数: 见表 1

## 2.3 血药浓度实测值

表 2, 表 3 和表 4 分别为害获灭组和微球高、低剂量组血药浓度实测值。

从血药浓度来看, 害获灭组和微球高、低剂量组均显示较为明显的个体差异。皮下注射害获灭, 达峰时间从 12h 到 36h 不等; 峰值从约 20 到约 28mg/kg。微球组, 峰值出现在给药后 1 天到 4 天, 峰浓度也有明显的个体差异。

表 1 血浆中伊维菌素测定的回收率及变异系数  
Table 1 Recovery of ivermectin from skipped samples

制备浓度 Skipped concentration (ng/ml)	实测浓度 Determined concentration (ng/ml)*	回收率 Recovery (%)	变异系数 Coefficient of variation (%)
2.5	2.6 ± 0.25	109.3	9.6
10	10.4 ± 1.19	104.4	11.4
20	18.3 ± 1.02	91.4	5.5
40	35.4 ± 3.04	88.6	8.6

\*  $\bar{x} \pm \text{SD}$ , n= 3

表 2 家兔皮下注射害获灭(0.5mg/kg)血药浓度实测值  
Table 2 Plasma concentration of H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> after subcutaneous(s. c) injection of  
IVOMEC(0.5mg/kg) in rabbits

时间 Time (h)	动物编号 Animal numbers								平均值 Average $\bar{x} \pm \text{SD}$
	1	2	3	4	5	6	7	8	ng/ml
1	0	0	2.4	0	0	0	2.8	0	0.65 ± 1.21
2	4.5	2.2	3.8	5.2	5.1	5.4	4.4	2.5	4.14 ± 1.14
4	6.4	8.3	9.3	6.9	6.7	5.4	7.7	4.8	6.94 ± 1.48
8	12.8	16.2	12.9	9.4	15.2	9.2	14.6	13.1	12.90 ± 2.54
12	21.0	19.9	17.1	17.3	24.3	14.5	19.6	26.9	20.08 ± 4.02
16	27.2	22.4	22.8	18.4	25.5	18.5	22.7	20.3	22.26 ± 3.07
24	24.4	20.3	26.5	25.2	NS	20.3	28.3	18.1	21.70 ± 3.92
36	17.4	16.6	18.5	28.2	17.1	20.3	23.7	15.0	19.58 ± 4.39
48	12.3	13.3	12.2	19.4	11.3	10.8	16.1	13.5	13.61 ± 2.85
72	7.6	9.5	8.2	11.2	7.8	8.3	11.8	10.8	9.40 ± 1.67
120	6.4	6.3	5.4	8.6	3.8	4.6	7.3	5.6	6.00 ± 1.51
168	ND	ND	ND	5.3	ND	ND	5.1	2.4	1.60 ± 2.37

注: ND(not detectable)为不可测得; NS(no sample)为样品缺失。下同

## 2.4 药动学特征

2.4.1 家兔皮下注射害获灭的药动学参数: 见表 5。

表 3 家兔皮下注射 IVM 的 PLA 微球 (5.0mg/kg, IVM) 血药浓度实测值

Table 3 Plasma concentration of H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> after s. c injection of IVM  
microsphere suspension (5.0mg/kg, IVM) in rabbits

时间 Time (d)	动物编号 Animal numbers							平均值 Average x ±SD
	1	2	3	4	5	6	7	
0.04			6.6	11.3		4.9	10.5	4.76 ±4.95
0.08	11.5	10.6	9.9	12.2	8.6	8.5	NS	10.21 ±1.51
0.17	12.4	11.5	13.1	15.8	8.5	10.6	11.1	11.86 ±2.27
0.33	19.7	12.4	12.2	15.4	10.5	27.0	21.0	16.89 ±5.95
0.5	22.6	18.9	14.7	21.7	11.4	27.7	21.4	18.32 ±5.65
1	29.0	24.0	34.8	28.3	20.4	41.3	25.2	29.00 ±7.06
2	NS	34.3	38.5	42.2	31.3	21.5	33.6	33.57 ±7.07
3	43.2	35.5	47.1	25.7	42.3	19.7	23.5	33.86 ±10.88
4	25.8	43.2	33.0	17.5	42.2	13.8	11.7	26.74 ±13.10
6	18.6	20.4	16.9	12.5	37.5	10.3	12.3	18.36 ±9.21
8	17.9	9.6	15.4	12.4	20.8	9.8	11.0	13.29 ±4.75
10	8.2	10.0	11.2	9.5	13.1	8.8	11.4	10.26 ±1.66
12	7.1	8.4	7.5	9.6	9.2	5.4	9.1	8.08 ±1.36
14	7.9	8.2	8.0	7.8	9.0	4.6	9.4	7.84 ±1.55
18	6.4	6.7	7.2	6.4	7.5	6.5	8.3	7.00 ±0.71
22	6.4	6.9	7.4	10.3	8.2	5.4	8.0	7.51 ±1.56
26	5.8	7.4	5.5	6.9	6.4	6.3	8.5	6.27 ±0.70
30	6.0	4.5	4.3	7.0	5.0	6.3	5.6	5.53 ±0.99
34	2.5	ND	ND	6.0	ND	2.6	ND	1.58 ±2.29
38	ND	ND	ND	2.5	ND	ND	ND	

从皮下注射微球后所得到的药动学参数可知, 伊维菌素(害获灭)在家兔的药动学可以用有吸收一室开放模型来描述。但药动学参数表现明显的个体差异。伊维菌素微球在家兔的药动学虽也可用房室模型来拟合, 但所得参数显然不能准确描述其药动学特征。

2.4.2 家兔皮下注射微球的血药浓度—时间曲线: 见图 2。

表 4 家兔皮下注射 IVM 的 PLA 微球(10.0mg/kg, IVM) 血药浓度实测值

Table 4 Plasma concentration of H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> after s. c injection of IVM  
microsphere suspension(10.0mg/kg, IVM) in rabbits

时间 Time (d)	动物编号 Animal numbers							平均值 Average x ±SD
	1	2	3	4	5	6	7	
0.04	14.4	21.0	17.5	21.3	15.5	12.2	13.6	16.50 ±3.57
0.08	19.8	15.3	17.2	22.4	17.2	15.1	21.2	18.31 ±2.64
0.17	26.2	25.6	20.4	19.5	18.8	18.4	25.8	22.65 ±3.59
0.33	35.8	31.9	23.8	27.8	34.4	41.2	34.7	32.48 ±6.14
0.5	39.2	41.0	57.9	34.3	40.5	48.3	51.2	39.02 ±9.41
1	46.8	45.1	66.1	49.5	59.7	60.1	65.2	56.07 ±8.78
2	NS	51.3	52.1	65.5	55.5	69.3	68.3	66.33 ±8.29
3	47.1	40.1	44.4	56.9	47.6	77.5	55.4	52.71 ±12.41
4	34.2	27.5	38.4	37.2	42.0	62.1	40.2	40.23 ±10.74
6	25.2	19.8	22.7	20.4	29.0	19.6	28.5	22.78 ±3.72
8	20.4	16.9	14.2	18.5	25.2	16.8	22.3	19.19 ±3.73
10	18.2	9.5	14.0	13.4	16.9	11.4	12.1	13.64 ±3.06
14	12.0	10.3	12.7	11.6	13.3	9.5	12.5	11.7 ±1.36
18	10.6	10.6	9.9	11.0	14.2	6.4	11.7	10.63 ±2.33
22	11.0	8.3	10.6	9.5	13.7	6.9	8.4	9.77 ±2.24
26	7.3	6.7	10.8	10.3	12.5	7.8	9.1	9.21 ±2.10
30	5.7	6.2	7.9	8.6	10.5	6.8	6.3	7.43 ±1.69
34	6.8	7.0	6.1	7.9	8.8	6.5	5.8	6.99 ±1.05
38	3.4	ND	6.0	2.8	8.6	3.4	5.9	4.30 ±2.78
42	ND	ND	2.5	ND	5.0	ND	2.6	1.44 ±1.98

表 5 家兔皮下注射害获灭(0.5mg/kg, IVM) 主要动力学参数

Table 5 Pharmacokinetic parameters of ivermectin in rabbits after subcutaneous  
administration of IVOMEK(0.5mg/kg, IVM)

药动力学参数 Parameters	单位 Units	动物编号 Animal numbers								平均值 Average x ±SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	
t <sub>1/2Ka</sub>	h	6.41	4.06	8.20	11.66	6.67	10.18	8.03	2.71	7.24 ±2.96
t <sub>1/2Ke</sub>	h	33.35	45.20	29.07	40.32	22.88	30.90	41.50	47.78	36.38 ±8.66
t <sub>max</sub>	h	20.23	17.10	21.52	30.16	18.55	24.81	24.13	15.18	21.46 ±4.82
C <sub>max</sub>	ng/ml	23.27	20.91	22.10	23.82	26.14	18.88	24.30	20.79	22.53 ±2.32
AUC	ng/l.h	1661	1735	1525	2296	1440	1453	2159	1730	1749 ±318

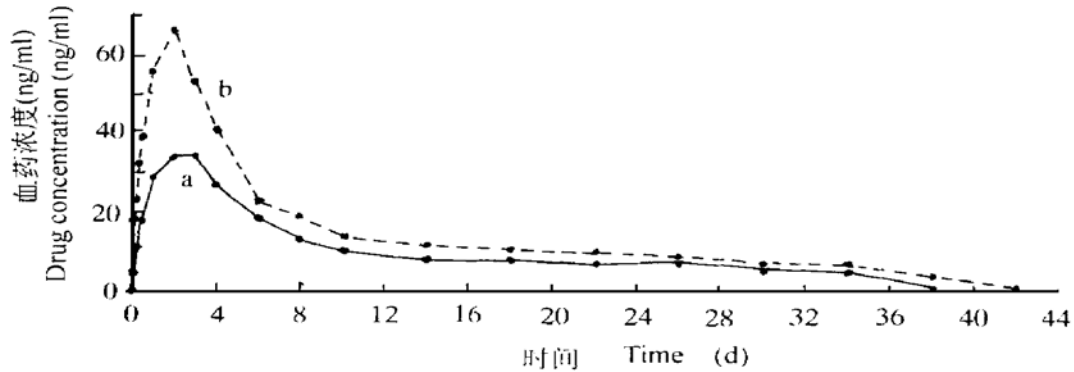


图2 家兔皮下注射微球的血药浓度—时间变化曲线

a: 微球低剂量组(IVM 5mg/kg); b: 微球高剂量组(IVM 10mg/kg)

Fig. 2 Drug concentration-time curve of IVM loaded microspheres injected subcutaneously to rabbits

在其他多数动物,伊维菌素不论以何种途径给药,消除过程均较慢,消除半衰期为 2.5~7d 不等<sup>[5]</sup>。害获灭给家兔皮下注射,平均消除半衰期为 1.5d,显示了比较明显的动物种属差异。家兔皮下注射伊维菌素微球,高低剂量组都可见一周内血药浓度较高,维持稳定血药浓度的时间在高低剂量组分别约为 5 周和 3 周。血药浓度没能维持更长时间的原因,一是因其消除相对较快,从其消除半衰期为 36.38h 就可看出;其二,从给药后 1~2d 出现较高峰值来看,体内释药可能有突释现象(burst effect)<sup>[6]</sup>,出现突释的原因可能在于微球表面吸附了较多药物;另外,还可能受测定方法的影响:已有研究者指出,由于检测方法不同,检测限高低不一,所收集的数据得出的药动学参数有显著差异。如以 HPLC 荧光法和紫外法测定,伊维菌素在绵羊体内的消除半衰期分别为 7.2d 和 2.7d。本实验所采用的 HPLC-UV 法可测到 2.5ng/ml,但尚需建立更灵敏的测定方法,以检测低于 2.5ng/ml 的血药浓度维持时间究竟有多长。

## 参 考 文 献

- 1 王亚敏,石庭森.微球制剂药物控释研究进展.中国药学杂志,1996,31(3):131
- 2 刘付启荣,冯淇辉.丙硫苯咪唑控释装置及其在山羊体内的释药过程和药效研究.畜牧兽医学报,1993,24(6):560~565
- 3 徐慧斌,沈杰,叶明忠,等.伊维菌素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,1996,4(2):5~9
- 4 Anderson N. Controlled release of anthelmintic drug: a new concept for prevention of helminthosis in sheep. Res Vet Sci, 1980, 29: 331~341
- 5 Campell WC ed. Ivermectin and Abamectin. Springer-Verlag, New York, 1989
- 6 Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. Eur J Pharm Biopharm, 1995, 41(1):2~13
- 7 Egerton JR, Suhayda D, Eary CH. Phophylaxis of nematode infections in cattle with an indwelling ruminant reticular ivermectin sustained release bolus. Vet Parasit, 1986, 22: 67~69

**PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF IVERMECTIN  
LOADED PLA MICROSPHERES IN RABBITS**

Wang Minru, Chen Zhangliu, Feng Qihui  
(*Department of Veterinary Medicine, South China  
Agricultural University, Guangzhou 510642*)

**Abstract**

The pharmacokinetics of ivermectin (IVM) loaded in Poly(*d, l*-lactic acid) (PLA) microspheres (MS) in rabbits was investigated. MS suspensions were given to the animals subcutaneously at the IVM dosage of 5.0 and 10.0 mg/kg, respectively. IVOMECS (0.5 mg/kg, s.c) was concluded in the experiment for comparison. Blood samples were collected after administration and the plasmas were separated. Ivermectin was extracted from the plasma into methylene chloride, and an analytical sample was prepared by evaporating organic solvent and dissolving the residue into methanol. Reversed-phase HPLC with UV photometric detection was used to determine ivermectin concentration, at accuracy of 2.5 ng/ml. The plasma drug concentration data of IVOMECS could be best described as a one compartment open model with first order absorption. The pharmacokinetic parameters were as follows:  $t_{1/2ka} 7.24 \pm 2.96$  h,  $t_{1/2ke} 36.38 \pm 8.66$  h,  $t_{max} 21.46 \pm 4.82$  h,  $C_{max} 22.53 \pm 2.32$  ng/ml, and AUC  $1749 \pm 318$  ng/1. h. After subcutaneous injection of MS, the drug concentration-time curve had obvious individual differences. One week after administration, the plasma IVM concentration kept at steady state for 5 (high dosage) or 3 (low dosage) weeks.

**Key words** Ivermectin, Microspheres, Pharmacokinetics, Rabbit