

重组水蛭素肠溶胶囊单次和多次给药在Beagle犬体内的药动学研究

杨辉^{1*}, 周远大¹, 何海霞¹, 范开²(1.重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400016; 2.重庆富进生物医药有限公司, 重庆 400054)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0916-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.15

摘要 目的:研究重组水蛭素肠溶胶囊单次和多次给药在Beagle犬体内的药动学特征。方法:取12只Beagle犬按随机对照法分为单次ig组和单次iv组,每组6只,按0.2 mg/kg ig或iv重组水蛭素,收集血样;清洗2周后12只犬按0.2 mg/kg ig重组水蛭素,连续给药7 d,收集血样,作为多次ig组。采用酶联免疫吸附法测定血浆中重组水蛭素浓度,以DAS 2.0软件计算药动学参数。结果:单次ig和单次iv重组水蛭素在Beagle犬体内药动学特征均符合二室模型,ig重组水蛭素肠溶胶囊的绝对生物利用度为 $(14.908 \pm 1.868)\%$;单次ig组和多次ig组犬体内重组水蛭素的 t_{peak} 分别为 (2.105 ± 0.243) 、 (3.000 ± 0.000) h, $t_{1/2\beta}$ 分别为 (8.660 ± 2.965) 、 (14.870 ± 2.710) h, c_{max} 分别为 (10.700 ± 0.872) 、 (12.05 ± 1.587) ng/mL, $AUC_{0-1440\text{ min}}$ 分别为 (55.250 ± 4.386) 、 (58.978 ± 6.002) ng·h/mL,两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:ig重组水蛭素肠溶胶囊可一定程度被吸收入血;连续多天ig重组水蛭素肠溶胶囊在犬体内不产生蓄积,不改变其药动学特征。

关键词 重组水蛭素;肠溶胶囊;注射液;单次给药;多次给药;药动学;Beagle犬

Study on the Pharmacokinetics of Recombinant Hirudin Enteric-coated Capsule by Single and Multiple Administration in Beagle Dogs

YANG Hui¹, ZHOU Yuanda¹, HE Haixia¹, FAN Kai² (1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2.Chongqing Fagen Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Chong- qing 400054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetic characteristics of Recombinant hirudin enteric-coated capsule by single and multiple administration in Beagle dogs. METHODS: 12 Beagle dogs were divided into single ig group and single iv group by random control method, 6 in each group. Recombinant hirudin 0.2 mg/kg was intragastrically administrated or intravenously injected, blood sample was collected; after 2 weeks of cleaning, 12 dogs were intragastrically administrated recombinant hirudin 0.2 mg/kg, for 7 d. Sample blood was collected, referred to multiple ig group. Recombinant hirudin concentration in plasma was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 software. RESULTS: The results showed that pharmacokinetics by ig and iv recombinant hirudin in Beagle dogs fitted to two-compartment model, absolute bioavailability of ig Recombinant hirudin enteric-coated capsule was $(14.908 \pm 1.868)\%$; the pharmacokinetic parameters in single ig group and multiple ig group were t_{peak} of (2.105 ± 0.243) , (3.000 ± 0.000) h, $t_{1/2\beta}$ of (8.660 ± 2.965) , (14.870 ± 2.710) h, c_{max} of (10.700 ± 0.872) , (12.05 ± 1.587) ng/mL, $AUC_{0-1440\text{ min}}$ of (55.250 ± 4.386) , (58.978 ± 6.002) ng·h/mL, without statistical significances in two groups($P>0.05$). CONCLUSIONS: The ig Recombinant hirudin enteric-coated capsule can be absorbed into the blood to a certain extent. There is no accumulation for ig Recombinant hirudin enteric-coated capsule for several days, and it dose not change the pharmacokinetic characteristics.

KEYWORDS Recombinant hirudin; Enteric-coated capsule; Injection; Single administration; Multiple administration; Pharmacokinetics; Beagle dogs

水蛭(*Hirudo nipponica whitman*)学名为日本医蛭,是我国传统的中药材,始载于《神农本草经》,历代本草对其均有记录。药用水蛭为水蛭的干燥全体,具有破血逐瘀的作用。天然的水蛭素(Hirudin)是由65~66个氨基酸组成的多肽,是迄今为止最强的凝血酶特异性抑制剂^[1-2]。由于天然水蛭素的来源匮乏,提取步骤烦琐,难

以得到足够量的纯品以满足临床用药的需求。20世纪80年代末,国外应用基因工程技术,研制出与天然水蛭素结构相似、作用相同的重组水蛭素(Recombinant hirudin, rH),并在临床上得到广泛应用。重组水蛭素注射剂和脂质体鼻腔给药的药动学已有文献报道^[3-5],但重组水蛭素口服制剂的药动学研究尚未见文献报道。本研究采用酶联免疫吸附(ELISA)法,测定Beagle犬单次iv重组水蛭素注射液和单次ig、多次ig重组水蛭素肠溶胶

* 主管药师,博士。研究方向:新药研发、医院药学。电话:023-89012224。E-mail: yanghui_023@126.com

囊后的血药浓度,研究重组水蛭素肠溶胶囊在 Beagle 犬体内的药动学特征,以期水蛭素口服制剂的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

MR-250 型酶标仪(天津科器高新技术公司); B160A 型医用低速离心机(河北省安新县白洋离心机厂); BP61 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品

重组水蛭素肠溶胶囊[批号:030301,规格:含重组水蛭素 0.25 mg/粒(抗凝血酶活力单位为 3 000 ATU/粒)]和重组水蛭素注射液(批号:031101,规格:1.0 mg/mL)均由重庆富进生物制药公司提供。

1.3 动物

健康合格一级 Beagle 犬 24 只,体质量(7.0 ± 0.8) kg,6 月龄,♀ ♂ 各半,由四川养麝研究所提供,质量合格证号和环境设施合格证号分别为“川实动管第 63、64 号”。

2 方法

2.1 给药方案与血样采集

2.1.1 单次给药方案 参照文献[6-8],采用随机对照设计,取 12 只 Beagle 犬,适应性喂养 1 周后进行实验。按随机数字表分为单次 ig 组和单次 iv 组,每组 6 只犬,实验前禁食 12 h 后,根据人用剂量换算,于次日早晨 8:00 分别单次 ig 或单次 iv 0.2 mg/kg 重组水蛭素肠溶胶囊或注射液。单次 iv 组犬分别于给药前和给药后 2、5、10、20、40、60、120、240、480 min 经前肢静脉取血 2 mL; 单次 ig 组犬分别于给药前和给药后 60、120、180、240、360、480、840、1 440 min 经前肢静脉取血 2 mL。血样用 3.8% 枸橼酸钠抗凝,分离血浆, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,待测。

2.1.2 多次给药方案 参照文献[9-10],单次给药方案结束后,12 只 Beagle 犬清洗 2 周后开始多次 ig 重组水蛭素肠溶胶囊,给药剂量为 0.2 mg/kg,于每天早晨 8:00 时 ig 1 次,连续给药 7 d,记为多次 ig 组。于每次给药前经前肢静脉取血 2 mL 用于测定谷浓度,分别于给药前和给药 7 d 后 60、120、180、240、360、480、840、1 440 min 经前肢静脉取血 2 mL,同“2.1.1”项下方法处理后保存。

2.2 血药浓度的测定

按照笔者前期研究方法——ELISA 法^[11]测定各组犬各时间点重组水蛭素的血药浓度。

2.3 数据处理方法

采用 DAS 2.0 软件进行药动学房室模型拟合,计算药动学参数。药动学参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 单次给药的药-时曲线

单次 iv、单次 ig 组犬给药后体内重组水蛭素的药-时曲线见图 1。

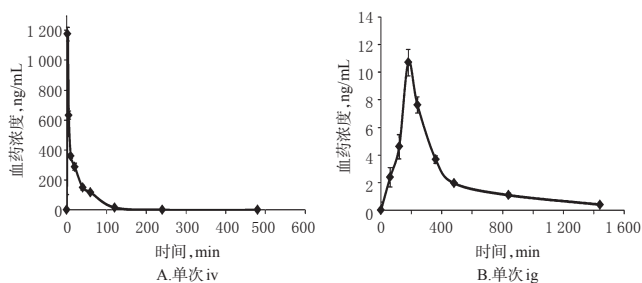


图 1 单次给药组犬体内重组水蛭素的药-时曲线

Fig 1 Concentration-time curve *in vivo* of recombinant hirudin in dogs of single administration groups

结果表明,单次 ig 组犬体内重组水蛭素的 t_{peak} 为 (2.105 ± 0.243) h; 单次 ig 组和单次 iv 组犬体内重组水蛭素的 $t_{1/2\beta}$ 分别为 (8.660 ± 2.965)、(2.642 ± 0.920) h; $\text{AUC}_{0-1440\text{ min}}$ 分别为 (55.250 ± 4.386)、(372.980 ± 27.872) $\text{ng} \cdot \text{h} / \text{mL}$ 。重组水蛭素肠溶胶囊的绝对生物利用度(F)为 (14.908 ± 1.868)%,表明重组水蛭素肠溶胶囊可在一定程度被吸收入血。

3.2 多次给药的药-时曲线

3.2.1 第 1~6 天谷浓度 犬给药第 1~6 天的重组水蛭素谷浓度均低于检测下限(0.250 ng/mL),个别可测到浓度者也未表现出累积趋势。

3.2.2 第 7 天血药浓度 多次 ig 组犬体内重组水蛭素的药-时曲线见图 2。

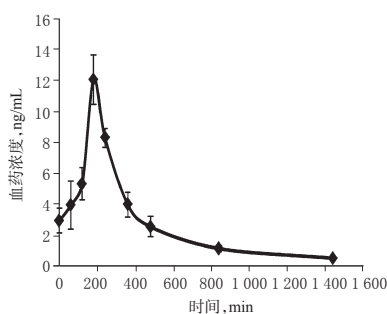


图 2 多次 ig 组犬体内重组水蛭素的药-时曲线

Fig 2 Concentration-time curve *in vivo* of recombinant hirudin in dogs of multiple ig group

3.3 药动学房室模型

3 种给药方式下,犬体内重组水蛭素的药动学房室模型拟合结果见表 1。

由表 1 可知,当房室模型为二室模型,权重因子为 $1/C^2$ 时,其 AIC 最小, R^2 越接近 1,表明 Beagle 犬体内药物浓度随时间的变化符合二室模型,权重系数 $1/C^2$ 拟合较佳。

3.4 药动学参数

单次和多次 ig 组犬体内重组水蛭素的药动学参数见表 2。

表1 3种给药方式下犬体内重组水蛭素的药动学房室模型拟合结果

Tab 1 Pharmacokinetic compartment model fitting results of dogs *in vivo* by 3 administration ways

房室模型	权重因子	单次 iv 组		单次 ig 组		多次 ig 组	
		AIC	R ²	AIC	R ²	AIC	R ²
一室模型	1	49.463	0.693	36.280	0.344	32.083	0.804
	1/C	21.261	0.987	21.651	0.895	17.612	0.968
	1/C ²	-7.268	0.999	6.796	0.984	3.868	0.994
二室模型	1	24.735	0.987	40.280	0.344	25.268	0.949
	1/C	-1.867	0.999	25.651	0.895	21.612	0.968
	1/C ²	-28.827	1.000	5.796	0.987	2.915	0.997

表2 单次和多次 ig 组犬体内重组水蛭素的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters *in vivo* of recombinant hirudin in dogs of single and multiple ig groups ($\bar{x} \pm s$)

参数	单次 ig 组 (n=6)	多次 ig 组 (n=12)
$t_{1/2\alpha}$, h	1.399 ± 0.146	1.359 ± 0.346
$t_{1/2\beta}$, h	8.660 ± 2.965	14.870 ± 2.710
K_{21} , L/h	0.249 ± 0.189	0.121 ± 0.174
K_{10} , L/h	0.217 ± 0.046	0.288 ± 0.179
K_{12} , L/h	0.128 ± 0.070	0.053 ± 0.119
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	59.489 ± 5.780	60.269 ± 5.344
AUC _{0-1440 min} , ng·h/mL	55.250 ± 4.386	58.978 ± 6.002
c_{max} , ng/mL	10.700 ± 0.872	12.050 ± 1.587
t_{peak} , h	2.105 ± 0.243	3.000 ± 0.000
CLs, L/(kg·h)	4.042 ± 0.533	3.339 ± 0.290

4 讨论

本研究前期建立了 ELISA 法测定 Beagle 犬血浆中重组水蛭素的浓度,且经验证,内源性物质不干扰重组水蛭素的测定。该方法特异性高,回收率、精密度和定量下限以及样品稀释后再测定结果均符合新药药动学的实验要求。

本实验比较了单次 iv 重组水蛭素注射液和单次 ig 重组水蛭素肠溶胶囊在犬体内的药物动力学特征。结果发现,重组水蛭素无论 ig 还是 iv,在犬体内均符合二室模型,单次 ig 的 t_{peak} 为(2.105 ± 0.243) h,表明药物吸收迅速。重组水蛭素肠溶胶囊的 F 为(14.908 ± 1.868)%,表明重组水蛭素肠溶胶囊可一定程度被吸收入血。本实验还比较了单次 ig 和多次 ig 重组水蛭素肠溶胶囊在犬体内的药动学特征。结果发现,单次 ig 和多次 ig 后犬体内重组水蛭素的 c_{max} 差异无统计学意义($P > 0.05$);虽多次 ig 后的 AUC_{0-1440 min} 和 AUC_{0-∞} 与单次 ig 相比略有提高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),表明重组水蛭素肠溶

胶囊每天服药 1 次,在体内不产生蓄积,连续服药也不会改变重组水蛭素肠溶胶囊的药动学特征。

本研究采用 ELISA 法测定了 Beagle 犬血浆中的重组水蛭素,首次报道了单次、多次口服重组水蛭素肠溶胶囊在 Beagle 犬体内的药动学情况,并计算获得重组水蛭素肠溶胶囊的绝对生物利用度,为重组水蛭素的临床研究提供了参考。

参考文献

- [1] Kaiser B, Callas D, Walenga JM, *et al.* Synthetic and recombinant antithrombin drugs[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 1998, doi:10.1517/13543784.7.6.963.
- [2] MoW, Song HY. Research advance on clinical application of recombinant hirudin[J]. *Foreign Med Sci: Sect Pharm*, 2004, 31(2):82-86.
- [3] Liu XW, Song HF, Tang ZM, *et al.* Pharmacokinetics and partial thrombo platin time after intravenous recombinant hirudin variant-2 in rhesus monkeys[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(9):842-846.
- [4] 黄玉荣,李全胜,刘昌孝.重组水蛭素在大鼠体内的药动学研究[J]. *中草药*, 2005, 36(9):1352-1356.
- [5] 张玉杰,王筱亮,吴建梅,等.重组水蛭素-2 脂质体的制备及大鼠鼻腔给药药代动力学[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(9):801-804.
- [6] 陈万一,周远大,康纪平,等.青藤碱在 Beagle 犬体内的药动学和绝对生物利用度研究[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(2):468-471.
- [7] 龚小红,赵梦杰,袁岸,等.尼奥宁在 Beagle 犬体内的药动学及其生物利用度研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(13):2656-2660.
- [8] 张建明,吴江,方晓玲.吡罗昔康环糊精包合物在 Beagle 犬体内的药物动力学研究[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(12):1240-1243.
- [9] 况扶华,华璐,田蕾,等.托拉塞米片多次给药药动学研究[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(9):693-695.
- [10] 陈伟,孟令阔,樊冬娇,等.盐酸小檗碱单次和多次给药在 Beagle 犬体内的药动学[J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28(7):512-516.
- [11] 杨辉,周远大,何海霞. ELISA 法研究重组水蛭素在比格犬体内的药动学[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(10):941-945.

(收稿日期:2016-11-03 修回日期:2016-12-29)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅