

大鼠多次口服双环醇和拉米夫定后对血浆药代动力学的相互影响

谷 雨 王宝莲 李 燕

摘 要 **目的** 研究大鼠多次口服双环醇和拉米夫定后对两药血浆药代动力学的影响。**方法** SD 大鼠分别口服双环醇(200mg/kg)和拉米夫定(15mg/kg),每日 1 次,连续 7 天。末次给药后 16h 一次口服拉米夫定(15mg/kg)或双环醇(200mg/kg)。应用 LC-MS 和 HPLC 法测定血浆中双环醇和拉米夫定浓度,计算药代动力学参数。**结果** 正常组和双环醇(200mg/kg)给药组大鼠一次口服拉米夫定(15mg/kg)后血浆浓度均于给药后 40min 达峰,达峰浓度分别为 2.68mg/L 和 2.99mg/L; $AUC_{(0-1)}$ 分别为 10.535mg/(L·h) 和 10.176mg/(L·h)。正常组和拉米夫定给药组大鼠一次口服双环醇(200mg/kg)后血药浓度分别于给药后 4h 和 3h 达峰,达峰浓度分别为 10.215mg/L 和 8.984mg/L; $AUC_{(0-1)}$ 分别为 54.998 μ g/(L·h) 和 42.342mg/(L·h)。**结论** 大鼠多次口服双环醇或拉米夫定后对两药血浆药代动力学参数无显著相互影响。

关键词 双环醇 拉米夫定 药代动力学 相互作用

Study on Pharmacokinetic Interaction of Lamivudine and Bicyclol in Rats. Gu Yu, Wang Baolian, Li Yan. Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, The Institute of Materia Medica, Beijing 100050, China

Abstract **Objective** To investigate the pharmacokinetic interaction of lamivudine and bicyclol after multiple dosing in rats. **Methods** LC-MS and HPLC analysis were used to determine the plasma concentration of lamivudine and bicyclol in rats after oral dosing once a day for 7 days. **Results** After an oral administration of lamivudine (15mg/kg), the Cmax and AUC in control and bicyclol (200mg/kg $\times$ 7) treated rats were 2.68mg/L, 2.99mg/L and 10.535mg/(L·h) and 10.176mg/(L·h), respectively. When bicyclol (200mg/kg) was given orally to control and lamivudine (15mg/kg $\times$ 7) treated rats, the Cmax and $AUC_{(0-1)}$ were 10.215mg/L, 8.984mg/L and 54.998 μ g/(L·h) and 42.342mg/(L·h). No significant difference on Tmax of both bicyclol and lamivudine was found in treated rats. **Conclusion** There is no significant difference on pharmacokinetic parameters of bicyclol and lamivudine in rats after multiple dose of lamivudine and bicyclol.

Key words Bicyclol; Lamivudine; Pharmacokinetic; Interaction

慢性病毒性肝炎是严重危害我国人民健康的慢性传染病之一。由于乙肝的发病机制涉及病毒复制、免疫炎症以及纤维化等复杂病理过程,因此临床治疗多采用抗病毒药和保肝药联合应用^[1,2],可达到抑制病毒复制和肝细胞保护作用的综合疗效。以往研究中,由于联合用药导致的不良反应和疗效降低时有发生,其中代谢性药物相互作用是重要机制之一。因此,联合用药时药物之间是否发生相互作用并导致体内药代动力学和疗效改变,是选择联合用药方案时需考虑的重要因素之一。

拉米夫定是目前治疗慢性乙型肝炎疗效肯定的抗病毒药物,可通过抑制 HBV-DNA 聚合酶,从而抑

制 HBV 的复制^[3]。双环醇是具有我国自主知识产权的国家一类抗肝炎新药,具有显著的抗肝损伤作用^[4,5]。目前,临床已有两者联合应用的治疗方案^[6,7]。本研究旨在探讨大鼠多次口服拉米夫定或双环醇后是否影响两药的体内药代动力学,从药代动力学角度为拉米夫定与双环醇联合治疗慢性乙型肝炎的安全性合疗效提供依据。

材料与方法

1. 材料:(1) 动物:健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重 160 ~ 180g,购自北京维通利华试验动物有限公司。(2) 药物和试剂:双环醇、拉米夫定均由北京协和药厂提供,用时以 0.5% CMC 溶液配制。内标法莫替丁购于中国药品生物制品检定所,纯度均 > 99%,乙腈为色谱纯。(3) 仪器与设备:美国 Agilent (USA) LC/MSD Trap XCT 液相色谱质谱联用仪,配有四元梯度泵,自动进样器,柱温箱,脱气机,电喷雾离子源 (ESI) 以及 Mass Control 和 Data Analysis 数据处理软件;Agi-

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项课题(2008ZX09201-008)

作者单位:100050 北京协和医学院/中国医学科学院药物研究所

通讯作者:李燕,电子信箱:yanli@imm.ac.cn

lent 1100 型高效液相色谱;包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列紫外检测器及 HP 化学工作站。

2. 方法: (1) 实验设计: 将 36 只大鼠随机分为 4 组, 每组 9 只。两给药组分别灌胃给予拉米夫定 15mg/kg 和双环醇 200mg/kg, 每天 1 次, 连续 7 天, 两组正常对照组给同体积赋形剂。实验前禁食 12h, 不禁水。拉米夫定给药组与其对照组大鼠口服双环醇 200mg/kg 后 5min、10min、20min、40min、1h、2h、3h、4h、6h、8h、12h、24h 后自眼眦静脉取血 0.6ml 经肝素抗凝, 离心分离血浆, 应用 HPLC 法检测血浆双环醇含量; 双环醇组与其对照组大鼠口服拉米夫定 15mg/kg 后 5min、10min、20min、40min、1h、2h、3h、4h、6h、8h、12h、24h 后自眼眦静脉取血 0.6ml, 经肝素抗凝, 离心分离血浆, 应用。用 DAS 软件计算两药血浆药代动力学参数, 并通过 T 检验对血浆药代动力学参数进行比较。(2) 检测条件: 拉米夫定: 流动相: 90: 10 (V/V) [水 (1% 甲酸): 乙腈]; 流速: 0.2ml/min; 进样量 5 μ l。检测模式为 MRM, 质谱参数为: 毛细管电压 (Capillary) 4.5kV, 毛细管出口电压 (Capillary Exit) 60V, 雾化气压力 (Nebulizer): 40 psi, 干燥气流量: 9L/min, 干燥气温度: 350 $^{\circ}$ C; 用于监测的离子分别为 m/z230 $\rightarrow$ 112 (拉米夫定) 和 m/z 338 $\rightarrow$ 259 (法莫替丁)。双环醇: 色谱柱: Supelco (250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C 流动相: 甲醇 - 水 (V: V = 66: 34; 流速: 0.7ml/min; 紫外检测波长: 230nm。(3) 血样处理方法: 拉米夫定: 将 50 μ l 血浆与 20 μ l 内标工作液混合后, 立即加入甲醇 130 μ l, 震荡混匀 2min, 后于 14000r/min $\times$ 5min, 离心 2 次, 取上清 5 μ l 进样。双环醇: 取 50 μ l 血浆与 10 μ l 内标溶液 (40 μ g/ml) 混匀, 加入乙腈 60 μ l 震荡混匀 2min 后, 14000g $\times$ 5min 离心 2 次, 取上清进样 50 μ l, 进行 HPLC 分析。(4) 特异性: 拉米夫定: 为考察所选内标和血浆内源性杂质对血药浓度测定的影响, 分别对空白血浆、空白血浆外加拉米夫定和内标莫替丁以及大鼠给药后血浆样品进行检测。双环醇: 分别对空白血浆、空白血浆外加双环醇及内标联苯双酯和大鼠给药后血浆样品进行测定。(5) 标准曲线制备: ①拉米夫定标准曲线: 标准品溶液制备: 精密称取拉米夫定标准品 2mg, 置于 2ml 容量瓶, 甲醇溶解定溶, 制备成拉米夫定储备液 (1mg/ml)。准确量取储备液, 加甲醇稀释成拉米夫定系列浓度工作液, 分别为 20、50、200、500、1000、2000ng/ml。内标溶液制备: 精密称取法莫替丁标准品 2mg, 置于 2ml 容量瓶, 甲醇溶解定溶, 制备成法莫替丁内标溶液 (1mg/ml)。准确量取储备液, 加甲醇稀释成 2.5 μ g/ml 标准液, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。标准曲线制备: 取空白血浆 50 μ l, 分别加入系列浓度拉米夫定标准储备液 50 μ l, 终浓度为 20、50、200、500、1000、2000ng/ml。内标法莫替丁 (2.5 μ g/ml) 20 μ l, 加入 80 μ l 甲醇, 按照血浆样品方法处理并测定; ②双环醇标准曲线: 标准品溶液制备: 精密称取双环醇标准品 2mg, 置于 2ml 容量瓶, 甲醇溶解定溶, 制备成双环醇储备液 (1mg/ml)。准确量取储备液, 加甲醇稀释成双环醇系列浓度工作液, 分别为 0.5、1.2、4、6、8、10 μ mol/L。内标溶液制备: 精密称取联苯双酯标准品 2mg, 置于 2ml 容量

瓶, 甲醇溶解定溶, 制备成联苯双酯内标溶液 (1mg/ml)。准确量取储备液, 加甲醇稀释成 40 μ g/ml 标准液, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。标准曲线制备: 取空白血浆 50 μ l, 分别加入浓度为 1.25、2.5、5、10、20、40、80、160 μ g/ml 双环醇标准储备液 10 μ l 和内标联苯双酯 (40 μ g/ml) 10 μ l, 加入 50 μ l 乙腈, 按血浆样品方法处理并测定。(6) 回收率与精密度: 拉米夫定: 在标准曲线范围内, 选择拉米夫定低、中、高 3 个浓度 (50、200、1000ng/ml) 血浆样品各 5 份, 按上述方法处理后进行测定。以实测浓度与加入浓度之比乘以 100%, 计算回收率。每个浓度样品在同一天内测定 5 次, 连续测定 5 天, 计算日内及日间精密度。双环醇: 在标准曲线范围内, 选择双环醇低、中、高 3 个浓度 (1.4、16 μ g/ml) 血浆样品各 5 份, 按上述方法处理血浆后进行测定。以实测浓度与加入浓度之比乘以 100%, 计算回收率。每个浓度样品在同一天内测定 5 次, 连续测定 5 天, 计算日内及日间精密度。

结 果

1. 方法学的确立: (1) 方法专属性: 拉米夫定: 在选定的色谱质谱条件下, 拉米夫定和内标法莫替丁采用 MRM (多反应监测) 扫描模式测定, 监测反应为: 拉米夫定 230 $\rightarrow$ 112, 法莫替丁 338 $\rightarrow$ 259, 血浆杂质对测定无明显干扰。空白血浆、空白血浆外加拉米夫定、内标法莫替丁和大鼠给药后血浆色谱图见图 1。双环醇: 空白血浆样品 (A)、空白血浆外加双环醇标准品及内标联苯双酯样品 (B)、大鼠给药后血浆样品 (C) 图谱见图 2。结果可见双环醇和联苯双酯保留时间分别为 6.15min 和 8.08min, 与血浆杂质呈基线分离, 且未见明显杂质干扰。(2) 线性范围和最低检测线: 拉米夫定: 按拉米夫定“标准曲线制备”项操作, 以拉米夫定面积与内标峰面积之比 (以 Y 表示) 对拉米夫定浓度 (X) 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y = 0.9321X + 20.259$, $R^2 = 0.999$ 。结果表明, 拉米夫定与内标峰面积比在 20 ~ 2000ng/ml 浓度范围内呈良好线性关系, 最低检测限为 20ng/ml。双环醇: 按双环醇“标准曲线制备”进行操作, 以双环醇峰面积与内标峰面积之比 (以 Y 表示) 对双环醇浓度 (X) 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y = 0.1826X + 0.0404$, $R^2 = 0.9987$ 。结果表明, 双环醇与内标峰面积比在 0.25 ~ 32 μ g/ml 浓度范围内呈良好线性关系, 最低检测限为 0.25 μ g/ml。(3) 精密度及回收率: 在标准曲线范围内, 分别选择拉米夫定及双环醇低、中、高 3 个浓度 (拉米夫定: 50、200、1000ng/ml; 双环醇: 1.4、16 μ g/ml) 血浆样品, 测定日内、日间相对标准偏差均在 10% 以内, 回收率在 85% ~ 110% 之间。

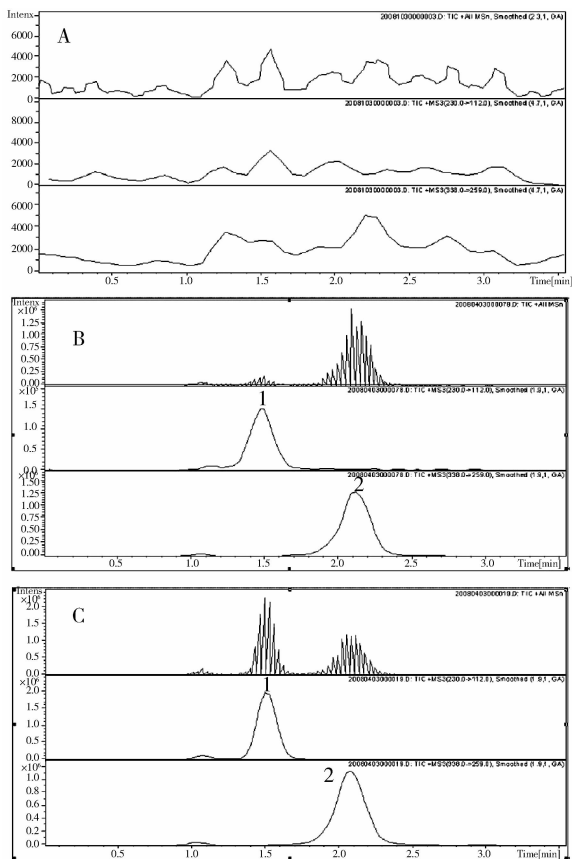


图 1 空白血浆、空白血浆外加拉米夫定、内标法莫替丁和大鼠给药后血浆色谱图

空白血浆 (A)、空白血浆外加拉米夫定及内标法莫替丁 (B)、大鼠给药后 3h 血浆样品 (C) LC-MS 扫描图 (MRM, 1. 拉米夫定 230→112; 2. 法莫替丁 338→259)

2. 双环醇多次给药大鼠口服拉米夫定后血药经时变化:大鼠多次口服双环醇[200mg/(kg×7)]后一次灌胃拉米夫定 15mg/kg, 正常组和双环醇组大鼠血浆拉米夫定浓度均于给药后 40min 达峰, 达峰浓度分别为 2.68mg/L, 2.99mg/L, AUC 分别为 10.535mg/(L·h), 10.176mg/(L·h), 两组间各药代动力学参数(表 1)无明显差异。血浆经时变化见图 3, 血浆药代动力学参数见表 1。

3. 拉米夫定多次给药大鼠口服双环醇后血药时曲线:大鼠多次口服拉米夫定[15mg/(kg×7)]后灌胃双环醇 200mg/kg, 正常组和双环醇组大鼠血浆双环醇浓度分别于给药后 4h 和 3h 达峰, 达峰浓度分别为 10.215mg/L 和 8.984mg/L, AUC 分别为 54.998μg/(L·h)和 42.342mg/(L·h), 两组各药代动力学参数(表 2)无明显差异。药物血浆经时变化见图 4, 血浆药代动力学参数见表 2。

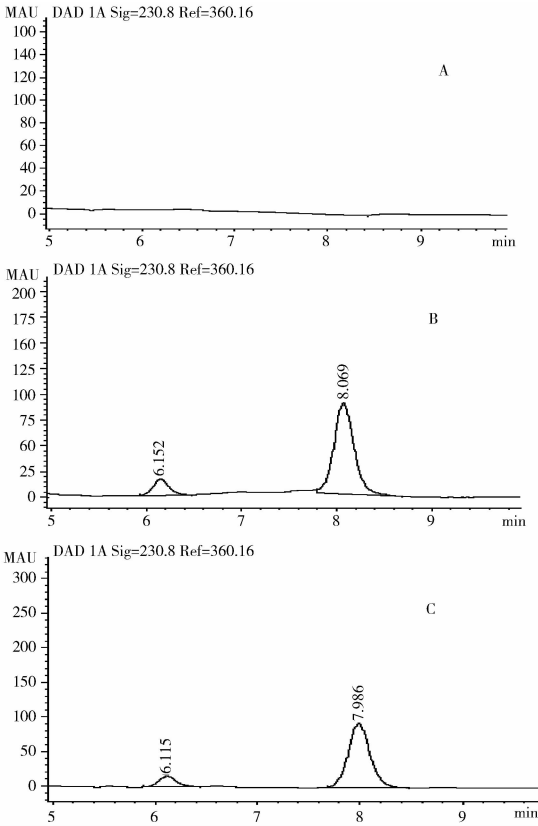


图 2 空白血浆样品、空白血浆外加双环醇标准品及内标联苯双酯样品、大鼠给药后血浆样品图谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆外加双环醇及内标联苯双酯; C. 大鼠给药后血浆样品色谱图 (联苯双酯 t_R = 6.152, 双环醇 t_R = 8.080)

表 1 双环醇多次给药大鼠口服拉米夫定后血浆药代动力学参数

参数	单位	正常组	双环醇给药组
$t_{1/2\alpha}$	h	2.311	1.854
AUC(0-t)	mg/(L·h)	10.535	10.176
MRT(0-t)	h	3.659	3.325
Tmax	h	0.666667	0.666667
V_z/F	L/kg	3.811	4.145
CL _z /F	L/(h·kg)	1.424	1.474
Cmax	mg/L	2.6802	2.9898

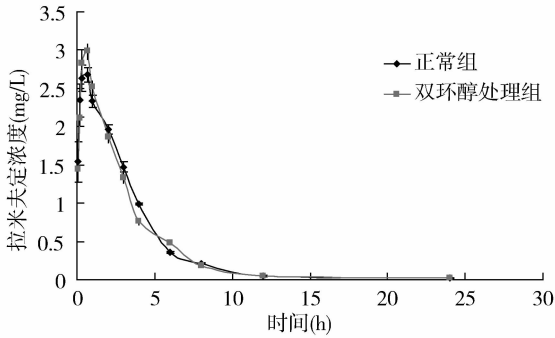


图 3 双环醇多次给药大鼠口服拉米夫定后血药经时变化

表 2 拉米夫定多次给药大鼠口服双环醇后
血浆药代动力学参数

参数	单位	正常组	拉米夫定诱导组
$t_{1/2\alpha}$	h	1.547	0.519
AUC(0-t)	mg/(L·h)	54.998	42.342
MRT(0-t)	h	6.639	8.176
Tmax	h	4	3
Vz/F	L/kg	12.498	23.808
CLz/F	L/(h·kg)	3.63	4.693
Cmax	mg/L	10.21500395	8.984193

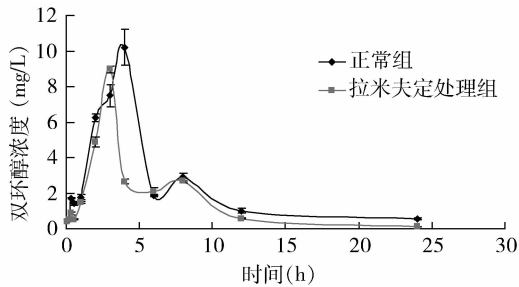


图 4 拉米夫定多次给药大鼠口服
双环醇后血药经时变化

讨 论

据统计,全球每年有近 100 万人死于 HBV 感染的相关疾病,主要为肝硬化和原发性肝癌,其发生与 HBV 的持续复制密切相关^[8,9]。因此,抗病毒治疗是慢性乙型肝炎治疗的关键。目前,拉米夫定是临床应用较多的抗病毒药物之一,长期用药还可减少肝脏失代偿的不良后果^[10]。双环醇具有显著的保肝降酶临床疗效。因此,两者的联合用药方案成为治疗慢性乙型肝炎的思路之一。

虽然联合用药预期可达到作用互补、提高疗效的治疗目的,但基于药代动力学的药物相互作用也不容忽视。为了解拉米夫定和双环醇给药后在药代动力学的相互影响,本文应用 LC-MS/HPLC 方法,研究了大鼠多次口服拉米夫定和双环醇后对两药血浆药代动力学的影响。结果显示:大鼠口服双环醇 [200mg/(kg·d)] 连续 7 天后一次灌胃药拉米夫定

15mg/kg,虽然 Cmax 略有增加,AUC_(0-t) 略有降低,但均无统计学差异,提示双环醇多次给药对拉米夫定主要药代动力学参数均无明显影响,这对联合用药时拉米夫定能维持其有效抑制病毒浓度十分重要。与此同时,大鼠口服拉米夫定 [15mg/(kg·d)] 连续 7 天后灌胃双环醇 200mg/kg,虽然血浆达峰浓度和 AUC_(0-t) 均有降低趋势,但无统计学差异。

综上所述,大鼠多次口服拉米夫定或双环醇后对两药体内药代动力学无明显相互影响,上述结果可为临床两药合用的疗效和安全性提供一定的参考依据。

参考文献

- 1 Perrillo RP Marcellin P. Effect of newer oral antiviral agents on future therapy of chronic hepatitis B. *Antivir Ther*,2010,15(1):13-22
- 2 En-Qiang Chen, Li-Chun Wang, Jun Lei, et al. Meta-analysis: Adefovir dipivoxil in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus. *Virology Journal*,2009, 6: 163
- 3 Telegdy L. Treatment of hepatitis B. *Orv Hetil*,2004,145(45):2293-2296
- 4 Li Y. Pharmacological study and clinical application of bicyclol [J]. *Infect Dis Inf*,2002, 15(2):60-61
- 5 于英男,郭江,李焯,等. 双环醇对刀豆蛋白 A 引起肝损伤小鼠肝脏基因表达谱的影响. *药学报*,2008,43(6):596-600
- 6 GT Liu. Bicyclol: a novel drug for treating chronic viral hepatitis B and C. *Med Chem*,2009,5(1):29-43
- 7 万学发,杨再娇,张黎明,等. 拉米夫定单独或联合双环醇治疗慢性乙型肝炎的临床研究. *中华医院感染学杂志*,2006, 16(7): 811-813
- 8 Jonathan Chao, Ellen T Chang, Samuel KS So. Hepatitis B and liver cancer knowledge and practices among healthcare and public health professionals in China: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 2010, 10:98
- 9 Doerig C, Antonino A, Pache I, et al. Management of chronic hepatitis B. *Rev Med Suisse*,2010, 27,6(233):168-170, 172-173
- 10 Yu ming Wang, Ying zi Tang. Antiviral therapy for hepatitis B virus associated hepatic failure. *Hepatolary Pancreat Dis Int*,2009,8(1): 17-24

(收稿:2010-03-23)

(修回:2010-05-10)

日本合成使造血干细胞增生的化合物

日本一家生物工程风险企业与日产化学工业公司日前宣布,两家公司的联合研究小组开发出使造血干细胞有效增生的化合物。这种化合物名为“NR-101”,能与造血干细胞结合,促进造血干细胞活跃增生。该化合物与人体内存在的小血小板生成素的作用类似,但其促进造血干细胞增生的能力比后者更强。脐带血中含有的造血干细胞数量不到骨髓造血干细胞的 1/10,长期以来,很多脐带血无法用于移植。研究人员认为,利用 NR-101,能够解决脐带血供应不足问题,可以为更多白血病患者提供治疗。