

【 药动力学研究 】

阿哌沙班在大鼠体内药动学/药效学研究

任利翔¹, 王婉秋², 林鹤¹, 光海红², 邢立国^{1*}

1. 沈阳化工研究院有限公司安评中心, 辽宁 沈阳 110021

2. 沈阳化工研究院有限公司医药研究室, 辽宁 沈阳 110021

摘要: **目的** 考察阿哌沙班大鼠体内药动学并评价其与药效学的相关性。**方法** 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定不同时间阿哌沙班血药浓度并绘制血药浓度-时间曲线,同时测定各时间点凝血酶原时间(PT)延长倍数并绘制药效-时间曲线,对药动及药效进行相关性分析。**结果** 阿哌沙班以2 mg/kg 剂量 iv 给予大鼠,血药浓度时间曲线下面积(AUC_{0-∞})、半衰期($t_{1/2z}$)分别为(4 016.07±1 160.46) μg·h/L、(2.95±1.59) h;以10 mg/kg 剂量 ig 给药, AUC_{0-∞}、 $t_{1/2z}$ 、峰浓度(C_{max})、达峰时间(t_{max})、生物利用度(F)分别为(17 973.48±3 145.30) μg·h/L、(1.52±0.36) h、(4 949.12±615.38) μg/L、(1.00±0.71) h、89.5%。阿哌沙班以10 mg/kg 剂量 ig 给药后0.5~2.0 h 可显著延长PT,以各时间点PT 延长倍数对血药浓度作图呈良好的线性关系。**结论** 阿哌沙班大鼠 ig 给药 F 高,吸收迅速,延长PT 的效应与血药浓度呈现良好的相关性。

关键词: 阿哌沙班; 药动学; 药效学; 凝血酶原时间

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)09-1290-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.09.018

Pharmacokinetic-pharmacodynamic study of apixaban in rats

REN Li-xiang¹, WANG Wan-qiu², LIN He¹, GUANG Hai-hong², XING Li-guo¹

1. Safety Evaluation Center, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd, Shenyang 110021, China

2. Pharmaceutical Research Laboratory, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd, Shenyang 110021, China

Abstract: Objective To study pharmacodynamics and pharmacokinetics of apixaban in rats and investigate the correlation between them. **Methods** The UPLC-MS/MS method was applied to determining the plasma concentration of apixaban and draw the concentration-time curve. Meanwhile, the extension rate of prothrombin time (PT) was determined to draw the effect-time curve. Then the relationship between concentration and effect could be evaluated. **Results** After iv administration of apixaban (2 mg/kg) in rats, the main pharmacokinetic parameters AUC_{0-∞} and $T_{1/2z}$ were (4 016.07 ± 1 160.46) μg·h/L and (2.95 ± 1.59) h, respectively. After ig administration of apixaban (10 mg/kg), the main pharmacokinetic parameters AUC_{0-∞}, $T_{1/2z}$, C_{max} , T_{max} and bioavailability were (17 973.48 ± 3 145.30) μg·h/L, (1.52 ± 0.36) h, (4 949.12 ± 615.38) μg/L, (1.00 ± 0.71) h and 89.5%, respectively. Apixaban (10 mg/kg) significantly increased PT and the effect lasted about 2 h. The changes of apixaban plasma concentration and PT extension rate were synchronous. **Conclusion** Apixaban has the characteristics of high oral bioavailability and rapid absorption. There is a significant correlation between PT extension rate and its plasma concentration after ig administration of 10 mg/kg in rats.

Key words: apixaban; pharmacokinetics; pharmacodynamics; prothrombin time

近些年研究发现,抑制Xa因子是一种有效且安全的抗凝策略。Xa因子是凝血级联反应中的关键调节因子,位于凝血酶上游,是较凝血酶更为高效

的抗凝作用靶点。此外,抑制Xa因子并不影响已有的凝血酶水平,少量的凝血酶足以激活血小板凝血酶高亲和力受体,保证止血的生理功能,具有较

收稿日期: 2017-02-10

作者简介: 任利翔(1980—),男,高级工程师,博士,研究方向为药物活性评价。Tel: 024-62353466 E-mail: renlixiang@sinochem.com

*通信作者 邢立国,男,教授级高工。Tel: 024-62353435 E-mail: xingliguo@sinochem.com

好的安全性^[1]。阿哌沙班是继利伐沙班之后，第二个可口服的、直接、可逆、高选择性的 Xa 因子抑制剂，临床用于髋关节或膝关节择期置换术的成年患者，预防静脉血栓栓塞事件^[2]。

本研究旨在建立一种快速、灵敏的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法，测定静脉及口服给药后大鼠血药浓度，计算其药动学参数及生物利用度。并以凝血酶原时间 (PT) 为药效学指标，测定 ig 给药后各时间点 PT 的变化，分析 PT 与血浆药物浓度变化的相关性，为临床合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 实验仪器

Quattro-micro API 电喷雾串联四级杆质谱仪、Acquity UPLC、Masslynx 4.1 工作站，美国 Waters 公司；STA-COMPACT 全自动凝血测定仪，法国思塔高。

1.2 药品与试剂

阿哌沙班 (质量分数 98%，批号 124982B)，购自阿达玛斯试剂；利拉利汀 (质量分数 99%，批号 L127331)，购自阿拉丁试剂。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠，雄性，体质量 180~220 g，购自辽宁长生生物技术有限公司，动物生产许可证号为 SCXK (辽) 2015-0001。

2 方法

2.1 大鼠药动学实验

2.1.1 色谱条件 色谱柱 BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；进样室温度 20 °C；进样量 5 μL；流动相采用 0.1% 甲酸水溶液-甲醇体系，起始流动相比例 4:1，梯度洗脱，到 2.5 min 时流动相比例为 1:19。

2.1.2 质谱条件 电喷雾电离源：ESI；检测方式：正离子；电喷雾电压 2 000 V；锥孔电压 40 V；离子源温度 120 °C；气化温度 350 °C；脱溶剂气 (N₂) 体积流量为 600 L/h；气帘气 (N₂) 体积流量为 50 L/h；碰撞能 22 eV；MRM 方式扫描；离子通道：阿哌沙班 *m/z* 460.04~442.9，内标利拉利汀 *m/z* 473.3~420.2。

2.1.3 样品预处理 精密吸取待测血浆 100 μL，加内标利拉利汀标准溶液 10 μL 混合，加入 390 μL 甲醇，涡旋混合 1 min，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液 200 μL 进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.1.4 给药方案 雄性 SD 大鼠 12 只，随机分组，

每组 6 只。禁食过夜，自由饮水。将阿哌沙班以 DMSO:丙二醇:生理盐水 (1:1:8) 溶解，iv 及 ig 给药浓度分别为 0.2、1.0 mg/mL，给药体积 10 mL/kg。iv 给药组于给药前及给药后 0.083、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、6.000、8.000、24.000 h，ig 给药组于给药前及给药后 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、24.00 h 眼眶后静脉丛采血 300 μL，肝素抗凝，5 000 r/min 离心 5 min，分离血浆冻存。

2.1.5 血药浓度测定 冻存血浆按“2.1.3”项下方法处理后测定大鼠血浆中阿哌沙班浓度，采用 DAS2.1 软件对血药浓度数据进行处理。

2.2 大鼠血浆 PT 测定

药动与药效研究若采用同份血样，其结果将更加直观，但药动样品采用肝素抗凝，而 PT 测定采用枸橼酸钠抗凝，同时间点两次采血量过大会对动物血容量及生理状态产生影响，故将 ig 给药组大鼠在药动学研究后代谢一周用于药效学研究，尽量避免个体差异对相关性的影响。动物禁食过夜，自由饮水，按“2.1.4”项 ig 给药组方法给药采血，3.2%柠檬酸钠抗凝，10 000 r/min 离心 3 min，分离血浆冻存。按照试剂盒方法测定 PT 值。计算每只动物给药后各时间点 PT 值较给药前的延长倍数。

延长倍数=给药后 PT 值/给药前 PT 值

2.3 数据处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 统计学软件 *t* 检验对各组数据进行组内统计比较。

3 结果

3.1 药动学实验结果

在该检测条件下，阿哌沙班与内标利拉利汀均具有良好的响应，专属性强，回收率、精密度等均符合生物样品检测要求，本文重点探讨 PK/PD 间的相关性，探索 PT 作为替代效应指标的可行性，揭示阿哌沙班这个新的抗凝血药物的作用特点，部分方法学验证的方法和结果另行发表，不宜公开。

以阿哌沙班浓度 *x* 为横坐标，阿哌沙班与利拉利汀峰面积之比 *y* 为纵坐标，采用加权最小二乘法进行回归^[3]，得回归方程 $y=0.011x+0.039$ ($r=0.999$ ，线性范围 10~1 000 ng/mL)，由于检测浓度范围较广，ig 给药组于给药后 8 h 及之后、iv 给药组于给药后 2 h 及之后各采血点样品采用回归方程 $y=0.011x+0.039$ ($r=0.999$)，线性范围为 10~1 000 ng/mL；其他时间点采用回归方程 $y=0.016x-0.362$

($r=0.998$), 线性范围为 200~10 000 ng/mL。

各给药组主要药动学参数见表 1, 平均血药浓度-时间曲线见图 1。阿哌沙班以溶液形式 ig 给药后吸收

迅速 ($t_{max}=1.00\pm 0.71$ h) 且口服绝对生物利用度 [$F=AUC_{ig}/(5\times AUC_{iv})$] 达到 89.5%, 但其半衰期 ($t_{1/2z}$) 较短, 给药 6 h 血药浓度降至峰浓度 20% 以下。

表 1 阿哌沙班大鼠体内主要药动学参数 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of apixaban in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

药动学参数	单位	iv 2 mg/kg 阿哌沙班	ig 10 mg/kg 阿哌沙班
MRT _{0-∞}	h	2.42±0.82	2.71±0.47
AUC _{0-∞}	μg·h·L ⁻¹	4 016.07±1 160.46	17 973.48±3 145.30
CL _z /F	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.54±0.19	0.57±0.09
V _z /F	L·kg ⁻¹	2.57±2.25	1.23±0.28
t _{1/2z}	h	2.95±1.59	1.52±0.36
C _{max}	μg·L ⁻¹	/	4 949.12± 615.38
t _{max}	h	/	1.00±0.71

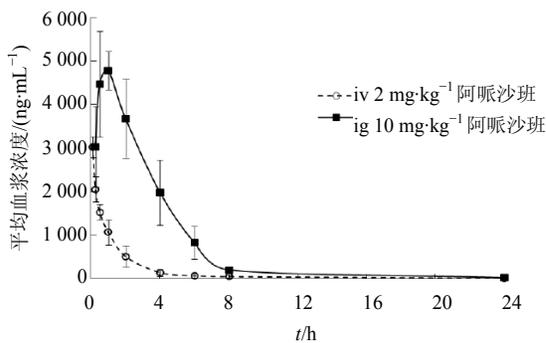


图 1 阿哌沙班对大鼠 iv (2 mg·kg⁻¹) 或 ig (10 mg·kg⁻¹) 给药后平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 Mean plasma concentration-time curves after iv (2 mg·kg⁻¹) or ig (10 mg·kg⁻¹) administration of apixaban in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.2 药效学结果及 PK/PD 拟合

与给药前比较, ig 给予阿哌沙班 10 mg/kg 后 0.5、1.0、2.0 h 均可显著延长 PT ($P<0.05$), 给药后 4 h 无统计学差异, 给药后 6 h 恢复到基础水平。以 PT 延长倍数对时间作图的曲线走势与血药浓度对时间作图相似 (图 2), 以各时间点 PT 延长倍数对血药浓度作图呈良好的线性关系 (图 3), 其线性方程为 $y=0.000 5x+0.546 8$, $R^2=0.974 3$ 。

4 讨论

阿哌沙班是一个直接、高选择性的 Xa 因子抑制剂, 从药学特性来说具有理想抗凝药的特征^[4]。根据本研究结果, 在药动学特点方面: 阿哌沙班口服给药 F 好; 吸收迅速, t_{max} 仅为 1 h; 表观分布容积较小 ($V_z/F=1.23$ L/kg), 提示药物主要分布在血液循环内, 既有利于发挥抗凝药效又能减少药物进入其他

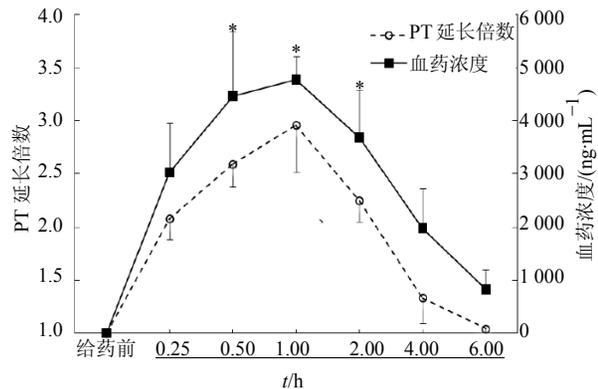


图 2 阿哌沙班 10 mg·kg⁻¹ ig 给药后大鼠血药浓度-时间曲线及 PT 延长倍数-时间曲线 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves and PT extension rate-time curves after ig administration of apixaban (10 mg·kg⁻¹) in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

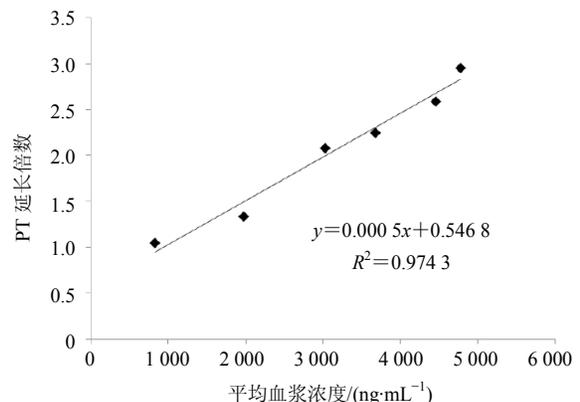


图 3 阿哌沙班 10 mg·kg⁻¹ ig 给药后对大鼠血浆 PT 延长倍数及血药浓度相关性分析 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 3 Relationship between PT extension rate and plasma concentration after ig administration of apixaban (10 mg·kg⁻¹) in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组织产生脱靶点效应；系统清除率小 $[CL_z/F=0.57\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})]$ ，降低了药物间相互作用的可能性；此外较短的 $T_{1/2z}$ 有利于超剂量用药后的解救，但需要提高给药频率以保持稳定的血药浓度。上述药动学特点，有利于主要药效的充分发挥，避免药物副作用及药物间相互作用。

药物效应与其靶部位的药物浓度相关，但靶部位的药物浓度往往无法直接测定，因此研究 PK 和 PD 的相互关系并建立药物浓度-效应方程，对于临床合理用药具有重要意义。选择与作用机制相关，并且稳定的、可连续定量的替代效应指标，寻找其与药物浓度的相关性是成功建立药物浓度-效应方程的关键^[5-6]。

阿哌沙班作为直接的 Xa 因子抑制剂，Xa 因子活性应当作为首选的效应指标。有文献^[7]报道，阿哌沙班抗 Xa 因子活性与抗血栓活性呈良好的相关性 ($R^2=0.94$)，与血药浓度亦呈良好的相关性 ($R^2=0.90$)。但是，由于 Xa 因子活性测定试剂昂贵、仪器特殊，限制了其在临床的应用。PT 和 APTT 是临床常规的凝血检测指标，文献报道^[7-8]，阿哌沙班体内和体外对 PT 较 APTT 具有更好的敏感性，PT 作为效应指标适用于大鼠、家兔和人类。本研究选用药物对 PT 的延长作为效应指标，考察了药动学及药效学之间的相关性。结果表明，阿哌沙班 ig 给药的药动时间曲线与药效时间曲线趋势相同，血药浓度与 PT 延长倍数呈良好的相关性 ($R^2=0.97$)。该结果表明，阿哌沙班吸收入血后快速作用于 Xa 因子继而延长 PT，延长 PT 的效应与血药浓度呈现明显的依赖关系。根据文献报道^[7]，体外将大鼠 PT 延长 1 倍的阿哌沙班浓度为 3.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，根据本研究拟合的公式

计算为 2.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，数值基本一致。因此，认为阿哌沙班对 PT 的延长作用与血浆药物浓度具有很好的相关性，提示可通过监测 PT 变化反映药物浓度。但是，PT 延长倍数与抗血栓药效作用或出血副作用间的具体量化关系需要进一步研究。

参考文献

- [1] Wong P C, Pinto D J, Zhang D. Preclinical discovery of apixaban, a direct and orally bioavailable factor Xa inhibitor [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2011, 31(4): 478-92.
- [2] Deeks E D. Apixaban: a review of its use in the prevention of venous thromboembolism after knee or hip replacement surgery [J]. *Drugs*, 2012, 72(9): 1271-1291.
- [3] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题 [J]. *药物分析杂志*, 1996, 16(5): 343-346.
- [4] 黄仲义. 口服凝血因子 Xa 直接抑制剂阿哌沙班的临床药理学 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2013, 32(7): 530-533.
- [5] Sheiner L B, Steimer J L. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug development [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40(1): 67-95.
- [6] Derendorf H, Lesko L J, Chaikin P, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development [J]. *J Clin Pharmacol*, 2000, 40(12 Pt 2): 1399-1418.
- [7] Wong P C, Crain E J, Xin B, et al. Apixaban, an oral, direct and highly selective factor Xa inhibitor: *in vitro*, antithrombotic and anti-hemostatic studies [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6: 820-829.
- [8] Schumacher W A, Bostwick J S, Stewart A B, et al. Effect of the direct factor Xa inhibitor apixaban in rat models of thrombosis and hemostasis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55(6): 609-616.