

文章编号：(2009)04-0328-10

氯吡格雷片比格犬体内的药物动力学

胡维民, 张文颖, 程刚, 邹梅娟

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的:** 采用液相色谱-串联质谱法, 对受试制剂氯吡格雷片和参比制剂波立维[®]进行比格犬体内药物动力学及生物利用度对照研究。**方法:** 以氯雷他定为内标物质, 采用双周期两制剂交叉实验设计, 对6只比格犬给药, 并对其体内血药浓度进行LC-MS/MS测定。**结果:** 受试制剂和参比制剂中氯吡格雷的达峰时间 t_{max} 分别为 (1.7 ± 0.7) h (均值 \pm 标准差, 下同)和 (1.9 ± 0.6) h, 最大血药质量浓度 ρ_{max} 分别为 $(1637.3 \pm 382.1) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(1663.0 \pm 472.2) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 血药质量浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 $(7622.8 \pm 2548.2) \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(7876.6 \pm 2562.0) \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 $(8128.5 \pm 2664.9) \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(8563.4 \pm 2679.6) \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以 AUC_{0-t} 计算, 与参比制剂相比, 受试制剂的相对生物利用度为 $(99.3 \pm 25.5)\%$ 。**结论:** 根据生物利用度和生物等效性试验的要求, 受试制剂与参比制剂波立维[®]比较, AUC_{0-t} 、 ρ_{max} 、 t_{max} 符合生物等效性要求, 但个体差异很大。

关键词: 药剂学; 药物动力学; 生物利用度; 高效液相-串联质谱; 氯吡格雷

中图分类号: R 944 **文献标志码:** A

氯吡格雷(结构见图1)是一种用于急性冠脉综合征的抗血小板临床常用药物, 能选择性的抑制ADP与血小板受体的结合, 抑制激活ADP与糖蛋白GPII b/IIIa复合物, 从而抑制血小板的聚集^[1]。

它在体外无活性, 通过肝脏进行生物转化。其活性代谢物很不稳定, 血浆中不能检测; 而氯吡格雷口服后, 其母体在血浆中质量浓度非常低($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 级)。氯吡格雷在235 nm处有紫外最大吸收, 其羧酸盐衍生物消除半衰期为8 h, 多次口服75 mg后血药浓度约在1 h后达峰值。

文献[2]报道采用GC-MS方法检测人血浆与尿液中氯吡格雷及其非活性代谢物的含量; Taubert等^[3]、Lainesse等^[4]、Nirogi等^[5]采用LC-MS/MS方法检测人血浆中氯吡格雷及其非活性代谢物的含量。国内尚未有其检测或体内药物动力学、生物利用度的研究报道。本文作者以氯雷他定为内标, 采用LC-MS/MS的方法来定量检测血浆中的原药质量浓度, 研究氯吡格雷片中氯吡格雷体内吸收特征, 并与参比制剂硫酸氯吡格雷片(波立维[®])比较, 考察其生物利用度及2种制剂的生物等效性。本文作者的目的是完善氯吡格雷体内药物动力学与生物利用度研究, 对其新剂型的开发研制提供更多的参考数据。

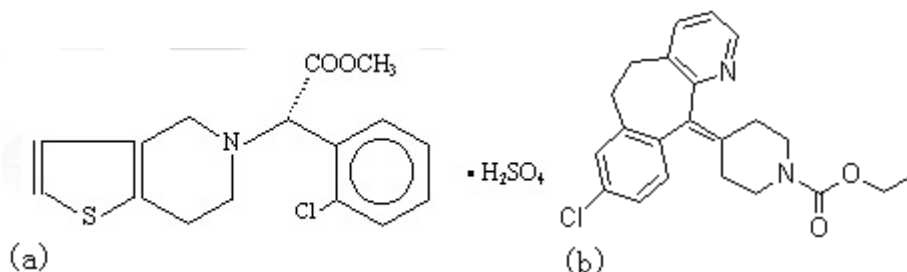


Fig. 1 Chemical structures of (a) clopidogrel bisulfate and (b) loratadine (I. S.)

1 仪器与材料

LC-10ADvp 输液泵(日本 Shimadzu 公司), SIL-HT_A 自动进样器(日本 Shimadzu 公司), TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联质谱仪(配备 APCI 源, Xcalibur 1.4 数据采集软件, LCQuan 定量处

收稿日期: 2008-12-31

作者简介: 胡维民(1982-), 男(回族), 山东济宁人, 硕士研究生, E-mail silverfoxonline@yahoo.com.cn; 程刚(1963-), 男(汉族), 辽宁康平人, 教授, 博士, 主要从事药剂学及生物药剂学研究, Tel. 024-23986326, E-mail chenggang63@hotmail.com。

理软件, 美国 Thermo 公司), TG-328A 型分析天平 (上海天平仪器厂), LD5-2A 型离心机 (北京医用离心机厂), CAY-1 型液体快速混合器 (北京长安仪器厂), TurboVap 蒸发仪 (美国 Zymark 公司)。

硫酸氢氯吡格雷 (韩国 Dae he chemical 公司, 批号: WS06102, 纯度质量分数为 75.98%), 氯雷他定 (内标, 四川省食品药品检验所, 批号: 100615-200401, 纯度质量分数为 99.2%), 甲醇 (色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 甲酸 (分析纯, 沈阳化学试剂厂), 波立维[®] (参比制剂, 法国 Sanofi Winthrop 公司, 批号: 2119, 规格: 75 mg), 硫酸氢氯吡格雷片 (受试制剂, 自制, 批号: 20070830, 规格: 75 mg)。

健康纯种比格犬 6 只, 均为雄性, 日龄 210 d, 平均体质量 6.2 kg。

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱 (Diamonsil, 150 mm×4.6 mm, 5 μm, 北京迪马公司), 预柱: EasyGuard C₁₈ 保护柱 (8 mm×4.0 mm, 北京迪马公司), 流动相: 甲醇-水-甲酸 (体积比为 90.0:10.0:0.1), 流速: 0.5 mL·min⁻¹, 柱温: 室温, 进样量: 20 μL。

2.1.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 (ESI 源), 源喷射电压: 4.2 kV, 毛细管温度: 320 °C, 鞘气 (N₂) 压力: 30 Pa, 辅助气 (N₂) 压力: 85 Pa, 碰撞气 (Ar) 压力: 0.133 Pa。

碰撞诱导解离 (CID) 电压: 20 eV (氯吡格雷)、0 eV (氯雷他定), 检测方式: 正离子, 扫描方式: 选择反应监测 (SRM), 离子反应: m/z 322 → m/z 212 (氯吡格雷)、 m/z 383 → m/z 267 (氯雷他定), 扫描时间: 0.3 s。

2.1.3 标准溶液的制备

氯吡格雷储备液 精密称取盐酸氯吡格雷 16.5 mg (相当于氯吡格雷 12.5 mg), 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 500 mg·L⁻¹ 的氯吡格雷储备液 I; 取 2.0 mL 储备液 I, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (体积比为 50:50) 稀释并定容至刻度, 获得质量浓度为 40 mg·L⁻¹ 的储备液 II。

氯吡格雷标准溶液 量取相应的储备液或标准溶液, 以甲醇-水 (体积比为 50:50) 稀释, 配制成质量浓度为 2.0、5.0、10.0、25.0、100.0、400.0、1000.0 和 1600.0 μg·L⁻¹ 的氯吡格雷标准系列溶液。

内标溶液 精密称取氯雷他定 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 1 000 mg·L⁻¹ 的储备液 I; 取 0.25 mL 储备液 I, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 获得质量浓度为 2.5 mg·L⁻¹ 的储备液 II。取 2.0 mL 储备液 II, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 获得质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的内标溶液。

各储备液、标准系列溶液及内标溶液均以相应体积、经过校正的量瓶配制, 并于 4 °C 冰箱内保存备用。

2.1.4 血浆样品的处理

取血浆样品 100 μL, 分别加入内标溶液 (100 μg·L⁻¹ 氯雷他定) 50 μL 和 1M NaOH 溶液 100 μL, 乙醚-正己烷 (体积比为 4:1) 提取溶剂 3 mL, 涡流混合 1 min, 振荡 10 min, 离心 5 min (3 500 r·min⁻¹), 分取上清液于另一个试管中, 于 20 °C 空气流下吹干, 残留物加入 200 μL 流动相, 涡流混合, 取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.1.5 方法专属性

氯吡格雷和内标氯雷他定在 ESI 电离方式下, 主要生成 [M+H]⁺ 准分子离子, 分别为 m/z 322 和 m/z 383。选择性对氯吡格雷和氯雷他定 [M+H]⁺ 进行产物离子扫描分析, 氯吡格雷主要生成 m/z 212

的碎片离子, 氯雷他定主要生成 m/z 267 的碎片离子 (见图 2), 分别将 m/z 212 和 m/z 267 作为定量分析时监测氯吡格雷和氯雷他定的产物离子。

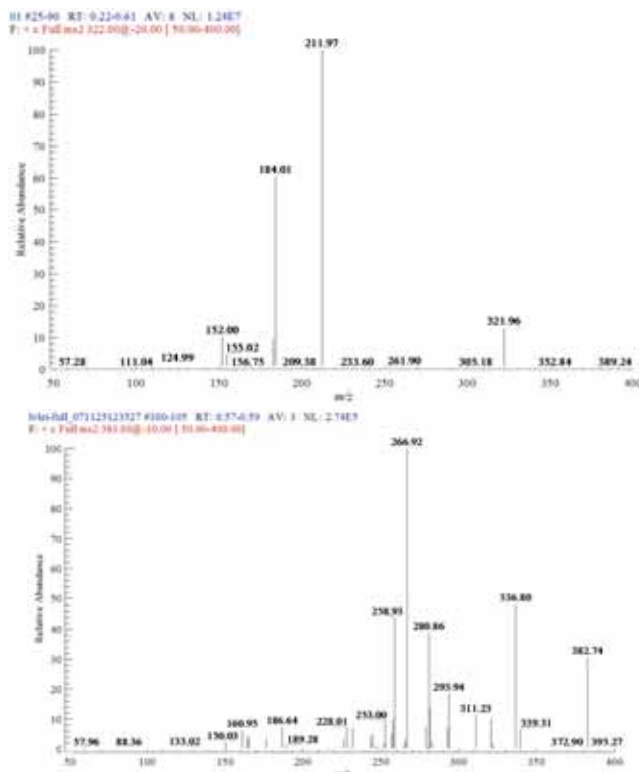


Fig.2 Full-scan positive ion ACPI product ion mass spectra of clopidogrel and loratadine (IS)

分别取 6 只比格犬的空白血浆 100 μ L, 除不加内标溶液外, 其余按“2.1.4”条操作, 得色谱图 3; 将一定浓度的氯吡格雷标准溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图 4, 氯吡格雷的保留时间为 5.28 min, 内标氯雷他定的保留时间为 4.81 min; 取比格犬口服给药后的血浆样品, 依同法操作, 得色谱图 5。结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰氯吡格雷和内标氯雷他定的测定。

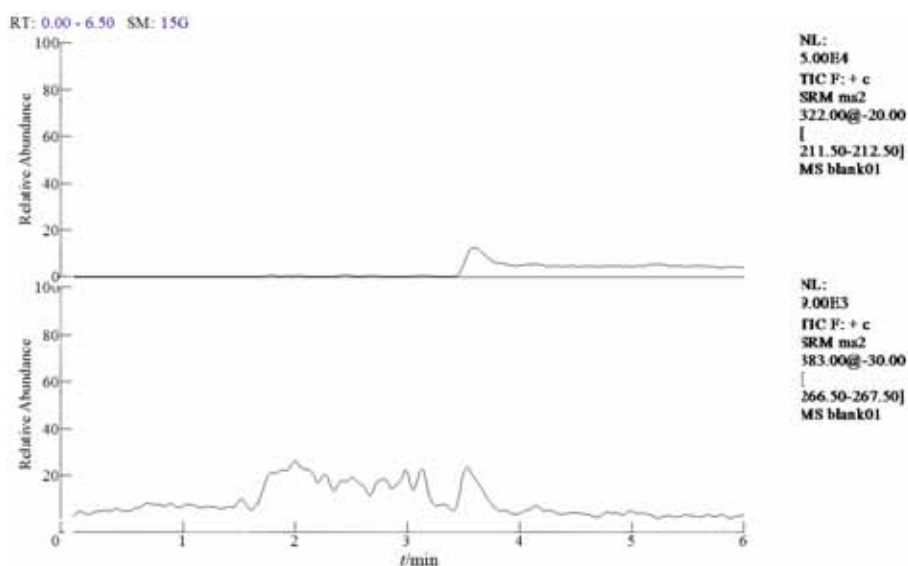


Fig.3 SRM chromatograms of clopidogrel and loratadine from analysis of blank (drug and IS free) beagle dog plasma

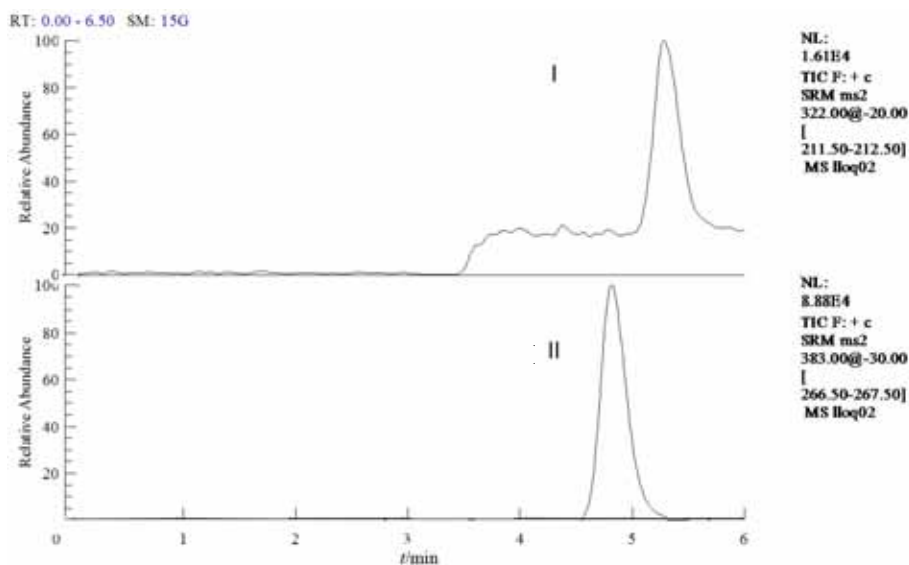


Fig.4 SRM chromatograms of clopidogrel and loratadine from analysis of zero sample (drug $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ spiked with IS $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) beagle dog plasma

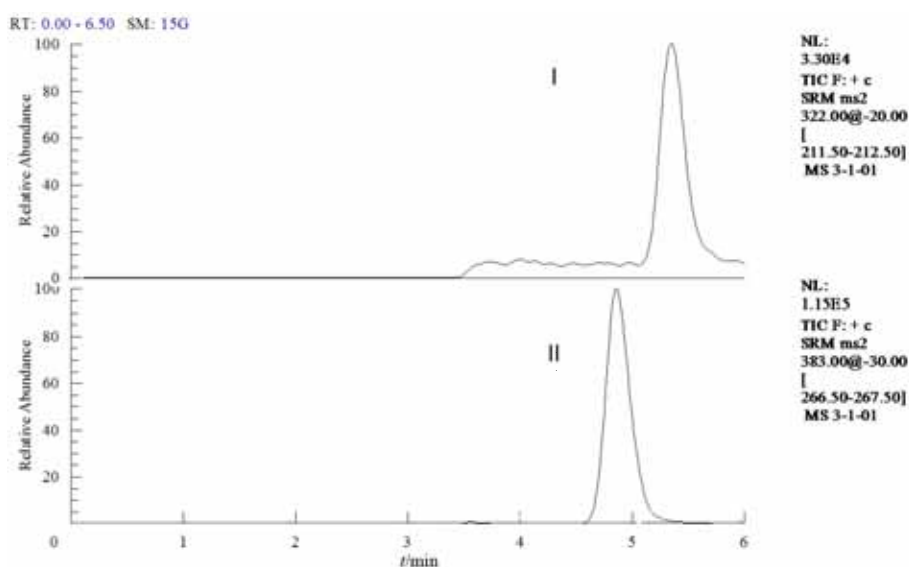


Fig.5 SRM chromatograms of clopidogrel and loratadine from analysis of No. 3 beagle dog plasma sample after 0.5 h administered
Peak I – clopidogrel, Peak II – loratadine

2.1.6 标准曲线与定量下限

标准曲线 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 加入氯吡格雷标准系列溶液 $50 \mu\text{L}$, 配制成相当于氯吡格雷质量浓度为 2.0 、 5.0 、 10.0 、 25.0 、 100.0 、 400.0 、 1000.0 和 $2000.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品, 按“血浆样品的处理”项下操作, 每一浓度进行双样本分析, 进样 $50 \mu\text{L}$, 记录色谱图。以氯吡格雷质量浓度为横坐标, 氯吡格雷与内标的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得标准曲线 (见图 6) 为 $Y=0.0297X+0.0048$ ($r^2 > 0.99$)。根据标准曲线, 氯吡格雷的线性为 $2.0\sim 2000.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

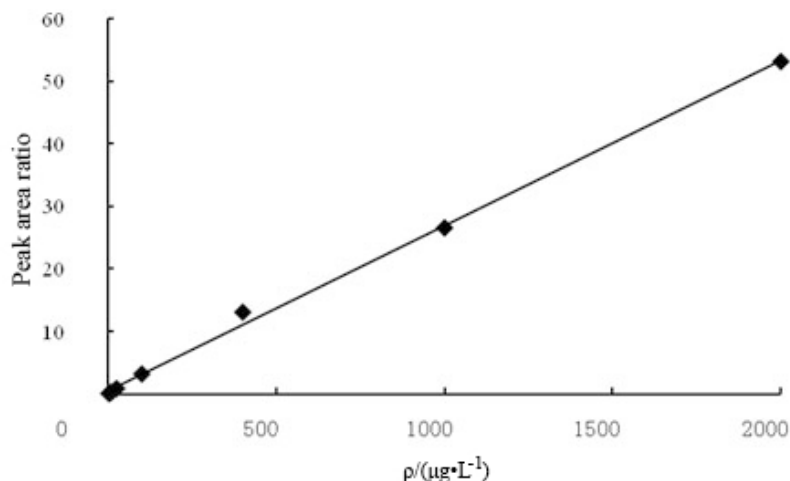


Fig.6 Calibration curve of clopidogrel from analysis of plasma samples using LC-MS/MS method (on the first day of method validation)

定量下限 取空白血浆 100 μL ，配制成氯吡格雷血浆质量浓度为 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品，在方法确证第三天进行 6 样本分析，并根据当日标准曲线计算每一样本测得质量浓度。求得氯吡格雷定量下限质量浓度的日内精密度 (RSD) 为 10.0%，准确度 (RE) 为 4.0%。结果表明所建立的 LC-MS/MS 法测定血浆中氯吡格雷的定量下限可达 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.7 方法精密度与准确度

取空白血浆 100 μL ，按“2.1.6”条方法配制低、中、高 3 个质量质量浓度（氯吡格雷质量质量浓度分别为 5.0、100.0、1600.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的质量控制 (QC) 样品，每一质量质量浓度进行 6 样本分析，连续测定 3 d d，根据当日的标准曲线，计算 QC 样品的测得质量浓度。根据 QC 样品的测定结果计算方法的准确度与精密度，结果见表 1。

Table 1 Accuracy and precision of the method for determining clopidogrel concentrations in plasma samples

$\rho_{\text{added}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{found}}(\bar{x} \pm s)/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%	RE/%
Within-day ($n=6$)			
5.0	5.1 \pm 0.5	9.5	2.4
100.0	98.9 \pm 8.3	8.4	-1.1
1600.0	1424.7 \pm 61.8	4.3	-11.0
Between-day ($n=18$)			
5.0	4.9 \pm 0.4	8.1	-1.9
100.0	97.9 \pm 8.1	8.2	-2.1
1600.0	1501.2 \pm 108.0	7.2	-6.2

2.1.8 提取回收率

取空白血浆 100 μL ，按“2.1.6”条方法配制低、中、高 3 个质量浓度（氯吡格雷血浆质量质量浓度分别为 5.0、100.0、1600.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的样品，每一质量质量浓度进行 6 样本分析；同时另取空白血浆 100 μL ，除不加氯吡格雷标准溶液和内标溶液外，其他按“2.1.4”条操作，向获得的上清液中加入相应质量浓度的氯吡格雷标准溶液 50 μL 和内标溶液 50 μL ，涡流混合，22 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干，残留物以流动相溶解后进样分析，获得相应峰面积（66 次测定的平均值）。以每一质量质量浓度 22 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率，数据见表 2。

Table 2 Recoveries of clopidogrel and loratadine (n=6)

$\rho_{\text{added}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{found}}(\bar{x} \pm s)/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%
Clopidogrel (n=6)		
5.0	71.8 ± 9.6	13.4
100.0	78.3 ± 6.5	8.3
1600.0	68.1 ± 5.2	7.6
Internal standard (n=18)		
50.0	74.3 ± 9.1	12.2

2.1.9 样品稳定性

分别考察氯吡格雷血浆样品处理后室温放置 24 h 的稳定性、血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环的稳定性和血浆样品于-20°C 冷冻放置 15 d 的稳定性。

取空白血浆 100 μL , 按“2.1.6”条的方法配制氯吡格雷低、中、高 3 个质量浓度(氯吡格雷血浆质量浓度分别为 5.0、100、1600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的 QC 样品, 每一质量浓度进行 3 样本分析, 结果见表 3。

数据表明, 血浆样品处理后室温放置 24 h 内稳定 (RE 在 $\pm 5.0\%$ 之内), 血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环后稳定 (RE 在 $\pm 6.0\%$ 之内), 血浆样品于-20 °C 冷冻放置 15 d 稳定 (RE 在 $\pm 9.3\%$ 之内)。

Table 3 Stability results of clopidogrel plasma sample

$\rho_{\text{added}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{found}}(\bar{x} \pm s)/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%	RE/%
Room 24 h Stability			
5.0	4.8 ± 0.1	3.0	-5.0
100.0	98.5 ± 5.8	5.9	-1.5
1600.0	1550.8 ± 14.7	14.7	-3.1
Freeze-thaw stability			
5.0	5.3 ± 0.2	3.3	6.0
100.0	103.7 ± 9.1	8.8	3.7
1600.0	1606.4 ± 82.5	5.1	1.4
15 Days stability			
5.0	5.0 ± 0.5	10.3	-0.5
100.0	90.7 ± 4.6	5.1	-9.3
1600.0	1540.7 ± 49.1	3.2	-3.7

2.1.10 血浆样品的测定与质量控制

比格犬血浆样品按“2.1.4”条操作, 每分析批建立一条标准曲线, 同时分析低、中、高多样本的质控样品, 并穿插于比格犬血浆样品测定中。根据当日标准曲线求算比格犬血浆样品质量浓度和质控样品质量浓度, 质控样品测定结果的 $\text{RE} \leq \pm 15\%$ (定量下限质量浓度点 $\text{RE} \leq 20\%$), 最多允许 1/3 不在同一质量浓度的质控样品结果超限, 则当日数据方可接受。共测试了 1 个分析批样品, 质量浓度为 5.0、100、1600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控样品 RE 分别为 2.9%、6.2%和 2.0%。

2.2 动物实验设计

实验对象 健康纯种比格犬 6 只, 均为雄性, 日龄 210 d, 平均体质量 6.2 kg。

分组 按随机交叉对照设计, 受试动物随机分为 2 组。

给药剂量 口服给药, 受试制剂和参比制剂均给 1 片 (规格: 75 mg)。

服药方法 受试动物禁食过夜 (10 h 以上), 于次日清晨 7 点给药, 并强制饮水 25 mL。服药后 2 h 方可饮水, 4 h 后统一进食。

采集血样 每个受试动物服药间隔为 2 min。于给药后 0.50、0.75、1.00、1.50、1.75、2.00、2.50、3.00、4.00、6.00、8.00、12.00 和 24.00 h 分别自前腿静脉采血 2 mL, 置肝素处理过的试管中, 3500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 取血浆置-20 °C 冰柜保存待测。受试动物取血顺序同服药顺序。

2.3 比格犬体内药物动力学结果

受试动物服用参比制剂和受试制剂后,平均血浆药物质量浓度-时间曲线如图7所示。将各时间点药物质量浓度数据用DAS 2.0软件处理,计算吸收速率常数 k_a 、消除速率常数 k_e 、表现分布容积 V_d 和血浆清除率 CL ,采用梯形法计算 AUC_{0-t} 值和 $AUC_{0-\infty}$ 值,以半对数作图法,由消除相的质量浓度点计算 $t_{1/2}$, t_{max} 和 ρ_{max} 采用实测值,所得参数列于表4。

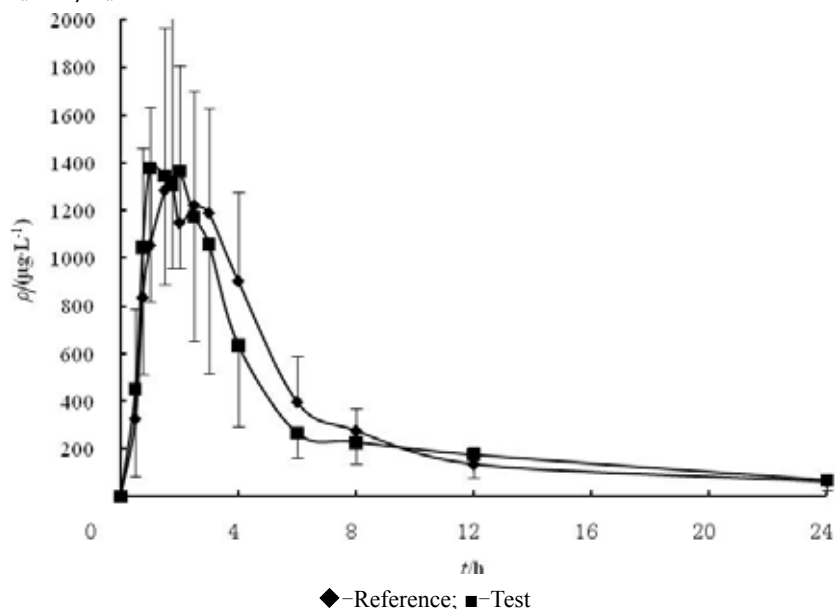


Fig.7 Average concentration-time curves of six beagle dogs

Table 4 Pharmacokinetic parameters of clopidogrel after peroral administration

		$t_{max}/$ h	$\rho_{max}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$t_{1/2}/$ h	$k_e/$ h^{-1}	$V_d/$ ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$CL/$ ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)	k_a h^{-1}	$AUC_{0-t}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	$AUC_{0-\infty}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)
Reference drug	Mean	1.9	1 663.0	8.0	0.212	74.534	13.221	7.035	7 876.6	8 563.4
	SD	0.6	472.2	4.3	0.059	61.130	6.927	10.351	2 562.0	2 679.6
Test drug	Mean	1.7	1 637.3	6.7	0.234	58.547	12.799	8.042	7 622.8	8 128.5
	SD	0.7	382.1	1.1	0.071	23.131	4.443	6.725	2 548.2	2 664.9

2.4 生物利用度对比结果

2.4.1 AUC 检验结果

氯吡格雷的数据处理及实验结果,用梯形法计算的2种制剂的 AUC_{0-t} 见表5,以根据受试制剂和参比制剂中氯吡格雷的 AUC_{0-t} 计算相对生物利用度,其结果表明2种制剂生物等效。

Table 5 Analytical results of AUC_{0-t} after administration of clopidogrel

Beagle	Phase	Test drug		Reference drug		$F/\%$
		AUC_T	$\ln AUC_T (X_T)$	AUC_R	$\ln AUC_R (X_R)$	
1	T/R	5279.6	8.6	4109.5	8.3	1.3
2	T/R	10915.7	9.3	11230.9	9.3	1.0
3	T/R	4122.5	8.3	6144.8	8.7	0.7
4	T/R	7547.5	8.9	9316.5	9.1	0.8
5	T/R	9398.0	9.1	7214.9	8.9	1.3
6	T/R	8473.7	9.0	9243.1	9.1	0.9
\bar{x}		7622.8	8.9	7876.6	8.9	99.3
s		2548.2	0.4	2562.0	0.4	25.5

三因素方差分析 对表5中数据进行三因素方差分析(周期、制剂、个体), 得表6的方差分析结果。说明制剂间、周期间无显著性差异, 个体间有显著性差异。

Table 6 Variance analysis results of AUC_{0-t}

Variance analysis	SS	DF	MS	F	P ($\alpha=0.05$)
Between-preparation	0.00	1.00	0.00	0.09	0.78
Between-phase	0.00	1.00	0.00	0.04	0.85
Between-individual	1.17	5.00	0.23	5.60	0.04
Total variation	1.34	11.00	0.12		
Total error	0.17	4.00	0.04		

2.4.2 ρ_{\max} 检验结果

氯吡格雷的数据处理及实验结果, 受试片和参比 ρ_{\max} 测定的实测结果见表7, 以参比制剂 ρ_{\max} 与受试制剂 ρ_{\max} 比较, 其结果表明二者之间无显著性差异。

Table 7 Analytical results of C_{max} after administration of clopidogrel

Beagle	Phase	Test drug		Reference drug	
		$\rho_{\max T}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\ln\rho_{\max T} (X_T)$	$\rho_{\max R}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\ln\rho_{\max R} (X_R)$
1	T/R	1346.4	7.2	720.8	6.6
2	T/R	1969.6	7.6	1970.1	7.6
3	T/R	997.5	6.9	1738.5	7.5
4	T/R	1774.1	7.5	1866.7	7.5
5	T/R	1858.7	7.5	1735.0	7.5
6	T/R	1877.4	7.5	1947.1	7.6
\bar{x}		1637.3	7.4	1663.0	7.4
SD		382.1	5.9	472.2	6.2

三因素方差分析 对表8中数据进行三因素方差分析(周期、制剂、个体), 得表8的方差分析结果。说明周期间和制剂间无显著性差异, 个体间存在显著性差异。

Table 8 Variance analysis results of ρ_{\max}

Variance analysis	SS	DF	MS	F	P ($\alpha=0.05$)
Between-preparation	0.01	1.00	0.01	0.26	0.64
Between-phase	0.01	1.00	0.01	0.27	0.63
Between-individual	1.04	5.00	0.21	4.99	0.03
Total variation	1.23	11.00	0.11		
Total error	0.17	4.00	0.04		

2.4.3 t_{\max} 检验结果

采用非参数的配对 Wilcoxon 法对 t_{\max} 进行了等效性评价。结果见表9。结果显示, 受试制剂与参比制剂间的 t_{\max} 无差异。

Table 9 Nonparametric test results of t_{\max}

	Reference drug	Testing drug	P
$\bar{x}\pm s$	1.88 \pm 0.59	1.67 \pm 0.74	> 0.05
Max-Min	3.00-1.50	3.00-1.00	
Median	1.6	1.6	

3 结论

本实验中作者以6只雄性纯种比格犬为研究对象, 采用 LC-MS/MS 法测定血浆中氯吡格雷质量

浓度, 比较氯吡格雷片(受试)与波立维[®](参比)的药动学参数, 实验结果表明受试制剂和参比制剂中氯吡格雷的达峰时间 t_{\max} 分别为 (1.7 ± 0.7) h 和 (1.9 ± 0.6) h, 最大血药质量浓度 ρ_{\max} 分别为 (1637.3 ± 382.1) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 (1663.0 ± 472.2) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 消除半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 (6.7 ± 1.1) h 和 (8.0 ± 4.3) h, 吸收速率常数 k_a 分别为 (8.0 ± 6.7) h^{-1} 和 (7.0 ± 10.4) h^{-1} , 消除速率常数 k_e 分别为 (0.2 ± 0.1) h^{-1} 和 (0.2 ± 0.1) h^{-1} , 表观分布容积 V_d 分别为 (58.5 ± 23.1) $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 (74.5 ± 61.1) $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, 血浆清除率 CL 分别为 (12.8 ± 4.4) $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 (13.2 ± 6.9) $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 以梯形法计算, 血药质量浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 (7622.8 ± 2548.2) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 (7876.6 ± 2562.0) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 (8128.5 ± 2664.9) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 (8563.4 ± 2679.6) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以 AUC_{0-t} 计算, 与参比制剂相比, 受试制剂的相对生物利用度为 $(99.3 \pm 25.5)\%$ 。

4 讨论

a. 由于氯吡格雷是一种前药, 其在体内通过肝脏代谢为有活性的硫醇代谢物和无活性的羧酸代谢物(图6), 导致其母体氯吡格雷在体内的质量浓度极低, 达到 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 级, 普通检测手段均无法测出, 因此采用高效液相串联质谱法, 以检测比格犬体内的母体药物氯吡格雷的质量浓度。

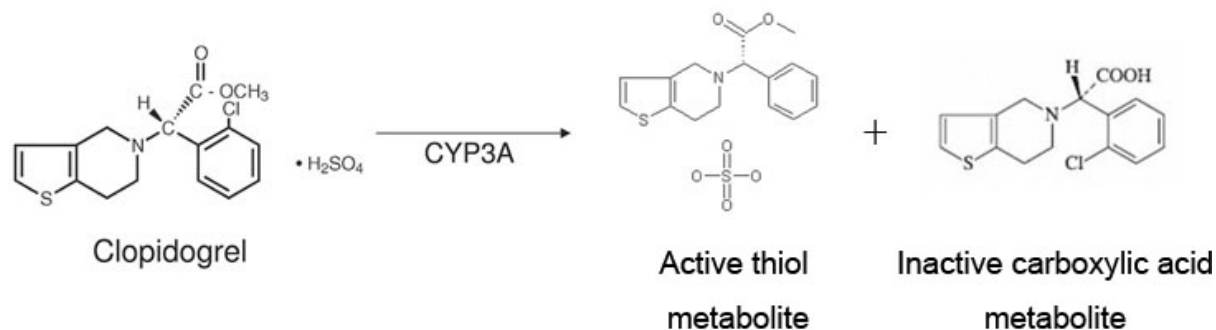


Fig.6 The metabolizing process of clopidogrel *in vivo*

b. 现有文献已有对氯吡格雷在大鼠体内的非临床研究和人体的临床药物动力学研究, 未见有非啮齿类动物的药物动力学及生物利用度研究。本实验中作者采用比格犬为实验对象, 从很大程度上补充完善了氯吡格雷非临床研究数据, 对于今后新剂型的研究有重要的意义。

c. 文献报道多次口服氯吡格雷片 75 mg 后血药浓度约在 1 h 后达峰值, 以此为依据设计预实验采样时间点为口服后 0.17、0.33、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、24.00 h。结果显示“0.17、0.33 h”2 点由于血药浓度非常低, 无继续采样的意义; 达峰时间在 2h 左右, 依据采样原则, 在此时间点前后添加“1.75、2.5 h”2 点, 使 t_{\max} 更准确。而最终的实验结果证明, 依据预实验对采样时间点进行修正, 的确达到了很好的效果。

d. 根据生物利用度和生物等效性试验的要求, 受试制剂与参比制剂波立维[®]比较, 经方差分析, AUC_{0-t} 和 ρ_{\max} 符合生物等效性要求, 但个体间差异很大。对 t_{\max} 进行非参数检验, 结果表明符合生物等效性要求, 但个体间差异很大。且有报道显示^[9], 氯吡格雷片与个别药物合用有出血的风险。结合上述研究可提示, 在临床使用氯吡格雷片时有必要进行临床药物浓度监测 (TDM)。

参考文献:

- [1] ROBINSON A, HILLIS J, NEAL C, et al. The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 848: 344-354.
- [2] LAGORCE P, PEREZ Y, ORTIZ J, et al. Assay method for the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 1998, 720: 107-117.
- [3] TAUBERT D, KASTRATI A, HARLFINGER S, et al. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of high loading dose [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2004, 92:311.
- [4] LAINESSE A, OZALP Y, WONG H, et al. Bioequivalence study of clopidogrel bisulfate film-coated tablets [J].

- Arzneimittel-Forschung / Drug Research, 2004, 54: 600.
- [5] RAMAKRISHNA VS N, VISHWOTTAM N K, MANOJ S, et al. Quantification of clopidogrel in human plasma by sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20: 1695-1700.
- [6] SONU S S, KULDEEP S, DEEPAK B, et al. Estimation of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in Wistar rat plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 821: 173-180.
- [7] MITAKOS A, PANDERI I. A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 28: 431-438
- [8] HANNA K, PIOTR R, MIROSLAWA B K. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41: 533-539.
- [9] PLAVIX[®] - clopidogrel bisulfate tablets. <http://products.sanofi-aventis.us/plavix/plavix.html>.

Pharmacokinetics of clopidogrel tablets in beagle dogs

HU Wei-min, ZHANG Wen-ying, CHENG Gang, ZOU Mei-juan

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To study the pharmacokinetics and bioavailability of clopidogrel bisulfate tablets in beagle dogs using LC/MS/MS method, using PLAVIX[®] (clopidogrel bisulfate tablets, Sanofi Winthrop Industrie) as the reference. **Methods** Using loratadine as the internal standard, double phase crossover experiment between two preparations was designed, and the plasma concentrations of six beagle dogs *in vivo* were determined. **Results** The time to peak (t_{max}) of clopidogrel in testing and reference preparations were (1.7 ± 0.7) h (Mean \pm SD, the same below) and (1.9 ± 0.6) h, the maximum concentration (ρ_{max}) in plasma were $(1\ 637.3 \pm 382.1)$ and $(1\ 663.0 \pm 472.2)$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Calculated with trapezoidal rule, the area under concentration-time curve (AUC_{0-t}) were $(7\ 622.8 \pm 2\ 548.2)$ and $(7\ 876.6 \pm 2\ 562.0)$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ were $(8\ 128.5 \pm 2\ 664.9)$ and $(8\ 563.4 \pm 2\ 679.6)$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Based on AUC_{0-t} , the bioavailability of the testing drug was $(99.3 \pm 25.5)\%$ compared to the reference drug. **Conclusion** According to the regulations of bioavailability and bioequivalence, it was concluded that comparing to reference drug PLAVIX[®], the bioequivalence data (AUC_{0-t} , ρ_{max} and t_{max}) of the testing drug are acceptable, but have significant difference among individuals. **Key words:** pharmaceuticals; pharmacokinetics; bioavailability; LC-MS; clopidogrel

(责任编辑 曹霞)