

• 基础实验研究论著 •

硫酸氢氯吡格雷片人体相对生物利用度和生物等效性的评价

赵红娜, 杨 漫, 张娅喃, 王晓琳, 张 丹, 刘 曼, 刘会臣[△]

(航天中心医院临床药理室, 北京 100049)

摘要:目的 考察硫酸氢氯吡格雷片受试制剂和参比制剂的人体相对生物利用度, 并评价两者的生物等效性。方法 32 名健康男性志愿者随机交叉单剂量口服硫酸氢氯吡格雷片的受试制剂和参比制剂 75 mg, 用 LC-MS/MS 法测定给药后血浆样本中氯吡格雷酸的浓度, 用 DAS 软件计算其药代动力学参数, 并评价两种制剂的相对生物利用度及生物等效性。结果 测定人血浆中氯吡格雷酸的线性范围是 10~7 000 ng/mL, 定量下限为 10 ng/mL; 氯吡格雷酸和内标氯吡格雷酸-d4 的平均提取回收率分别为 88.1% 和 89.6%; 批内、批间 RSD 均小于 8.0%, RE 在(±8.0%) 以内。受试制剂和参比制剂的 AUC_{0-t} 分别为 $(11\ 235.17 \pm 2\ 250.63) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 和 $(10\ 835.07 \pm 1\ 994.46) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(11\ 606.80 \pm 2\ 323.53) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(11\ 201.94 \pm 1\ 953.69) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, $C_{\max}$ 分别为 $(4\ 724.07 \pm 1\ 399.60) \text{ ng/mL}$ 和 $(4\ 621.96 \pm 1\ 193.52) \text{ ng/mL}$, $T_{\max}$ 分别为 $(0.68 \pm 0.15) \text{ h}$ 和 $(0.70 \pm 0.23) \text{ h}$, $t_{1/2}$ 分别为 $(8.21 \pm 3.26) \text{ h}$ 和 $(8.00 \pm 1.44) \text{ h}$ 。受试制剂的相对生物利用度 F_{0-t} 和 $F_{0-\infty}$ 分别为 $(103.7 \pm 9.6)\%$ 、 $(103.4 \pm 8.4)\%$ 。结论 两种制剂的吸收速度和吸收程度相当, 具有生物等效性。

关键词: 硫酸氢氯吡格雷; 氯吡格雷酸; 生物利用度; 生物等效性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)10-1201-02

Relative bioavailability and bioequivalence of clopidogrel hydrogen sulfate tablets in healthy volunteers

Zhao Hongna, Yang Man, Zhang Yanan, Wang Xiaolin, Zhang Dan, Liu Man, Liu Huichen[△]

(Department of Clinical Pharmacology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China)

Abstract: Objective To evaluate the relative bioavailability and bioequivalence of two clopidogrel hydrogen sulfate tablets in healthy volunteers. Methods A single oral dose of 75 mg clopidogrel hydrogen sulfate test and reference tablets were given to 32 healthy male volunteers in a randomized, two-way crossover study. Clopidogrel acid concentrations in plasma were determined by LC-MS/MS. With use of DAS software, the pharmacokinetic parameters were calculated and the bioequivalence of the two preparations was evaluated. Results Clopidogrel acid was linear in the range of 10—7 000 ng/mL, with the lower of quantification of 10 ng/mL. The average recovery of clopidogrel acid and internal standard clopidogrel acid-d4 were 88.1% and 89.6%, respectively. Both intra- and inter-batch RSD were lower than 8.0%, and RE was within ±8.0%. The main pharmacokinetic parameters of test and reference preparations were as follows: AUC_{0-t} $(11\ 235.17 \pm 2\ 250.63) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(10\ 835.07 \pm 1\ 994.46) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ $(11\ 606.80 \pm 2\ 323.53) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(11\ 201.94 \pm 1\ 953.69) \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, $C_{\max}$ $(4\ 724.07 \pm 1\ 399.60) \text{ ng/mL}$ and $(4\ 621.96 \pm 1\ 193.52) \text{ ng/mL}$, $T_{\max}$ $(0.68 \pm 0.15) \text{ h}$ and $(0.70 \pm 0.23) \text{ h}$; $t_{1/2}$ were $(8.21 \pm 3.26) \text{ h}$ and $(8.00 \pm 1.44) \text{ h}$, respectively. The F_{0-t} and $F_{0-\infty}$ of test tablet were $(103.7 \pm 9.6)\%$ and $(103.4 \pm 8.4)\%$, respectively. Conclusion The absorption rate and extent of the two preparations are comparative, and the two preparations are bioequivalent.

Key words: clopidogrel hydrogen sulfate; clopidogrel acid; bioavailability; bioequivalence

氯吡格雷为噻吩并吡啶类前体药物, 通过与血小板 P2Y₁₂ 受体结合而抑制二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集。临床上广泛应用于心肌梗死、脑梗死等心脑血管疾病的治疗。在体内约有 10%~15% 的氯吡格雷经细胞色素 P450 氧化代谢为巯基活性代谢产物, 而大部分氯吡格雷由酯酶水解为非活性代谢产物氯吡格雷酸^[1-4]。氯吡格雷血药浓度较低^[5], 其活性代谢产物稳定性差, 需衍生化后测定^[6]; 氯吡格雷酸作为主要代谢物, 血药浓度高, 稳定性好, 易于测定, 可用于间接反映氯吡格雷的药代动力学特征及评价相关制剂的生物等效性, 旨在为新药报批与临床合理用药提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 32 名健康受试者均为男性, 年龄为 (24 ± 3) 岁, 体质量为 $(63.8 \pm 6.0) \text{ kg}$, 身高为 $(1.70 \pm 0.06) \text{ m}$, 体质量指数为 $(22.0 \pm 1.6) \text{ kg/m}^2$ 。试验前进行病史询问和体格检查, 血常规、尿常规、肝肾功能及心电图检查等均正常。无既往

病史、药物过敏史和药物依赖史, 试验前 2 周及试验期间未服用任何药物, 试验前 1 周及试验期间禁烟酒或含葡萄柚的饮料, 试验期间统一饮食。受试者了解试验目的、方法、意义以及可能发生的不良反应后签署知情同意书。试验方案经航天中心医院医学伦理委员会批准。

1.2 药品与试剂 硫酸氢氯吡格雷片(受试制剂, 规格: 每片 75 mg, 批号: 2127581, 某制药公司); 硫酸氢氯吡格雷片(参比制剂, 规格: 每片 75 mg, 批号: 2683, 商品名: 波立维, 法国 SANOFI WINTHROP INDUSTRIE)。氯吡格雷酸对照品(纯度: 98%, 加拿大 TRC 公司, 批号: 2-GJR-91-1); 氯吡格雷酸-d4 对照品(内标, 纯度: 96%, 加拿大 TRC 公司, 批号: 3-AAH-100-1)。甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵为色谱纯, 水为超纯水。空白健康人血浆(K2EDTA 抗凝)购自美国 Bioreclamation 公司。

1.3 给药方案及血样采集 本试验采用单中心、均衡、随机、开放、单剂量、两种制剂、两周期、两个顺序交叉试验设计, 依据

32 名受试者入组顺序将其随机分为 2 组,交叉服用受试制剂或参比制剂,清洗期为 7 d。受试者于试验的前 1 d 吃清淡晚餐后禁食不禁水,试验当日早晨空腹口服受试制剂或参比制剂,给药剂量均为 75 mg,用温开水 250 mL 送服,用药后保持上身直立状态 2 h,其后可自由饮水,用药后约 4 h 和 10 h 进食午餐和晚餐。于用药前和用药后 0.167、0.333、0.500、0.667、0.833、1.000、1.333、1.667、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、16.0、24.0、36.0 h 于上肢静脉取血 5 mL,置预冷的 EDTA-K₂ 真空采血管中,离心(2 120×g,4 ℃)5 min,取血浆快速冷冻后置-80 ℃冰箱中保存备测。所有操作均在避光条件下进行。

1.4 血药浓度测定 采用已建立好的 LC-MS/MS 法,测定 32 名受试者空腹口服受试制剂和参比制剂 75 mg 后不同时间血浆中氯吡格雷酸的浓度。精密量取 50 μL 血浆于预冷的 1.2 mL 96 孔板中,加入 50 μL 乙腈-水(1:1)、20 μL 内标溶液及 400 μL 预冷的乙腈,将 96 孔板盖紧后于 1 200 r/min 漩涡混合 5 min,4 ℃离心 5 min(6000 g),分取 30 μL 上清液于另一预冷的 1.2 mL 96 孔板中,加入 300 μL 预冷的 0.1%甲酸水溶液,将 96 孔板封口并于 1 200 r/min 漩涡混合 5 min,进样 10 μL 作 LC-MS/MS 分析。人血浆样本以乙腈沉淀蛋白后,选用 Phenomenex Synergi Polar-RP 色谱柱(50 mm×3.0 mm,4 μm),以乙腈-甲醇-水-甲酸(25:25:50:0.1)(内含 2 mmol/L 甲酸铵)为流动相,流速为 0.5 mL/min。选用多重反应监测(MRM)扫描方式进行监测,电喷雾离子化源,正离子方式,选择离子监测反应分别为 m/z 308.1 198.1(氯吡格雷酸)和 m/z 312.1 202.1(氯吡格雷酸-d4)。测定人血浆中氯吡格雷酸的线性范围是 10~7 000 ng/mL,定量下限为 10 ng/mL;氯吡格雷酸和内标氯吡格雷酸-d4 的平均提取回收率分别为 88.1%和 89.6%;批内、批间 RSD 均小于 8.0%,RE 在(±8.0%)以内。氯吡格雷酸在人血浆样本及储备液、标准系列溶液中,各种条件下保存均稳定。

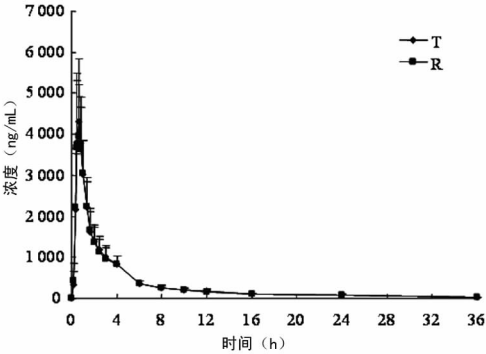
1.5 药代动力学参数计算及生物等效性评价 应用 LC-MS/MS 方法测定氯吡格雷酸血药浓度,并采用 DAS 2.1.1 软件计算 32 名受试者口服受试制剂和参比制剂后氯吡格雷酸的主要药代动力学参数,以及受试制剂相对于参比制剂的相对生物利用度。将两种制剂的血药浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t}、AUC_{0-∞})和峰浓度(C_{max})对数转换后进行方差分析和 90%置信区间计算,评价受试制剂和参比制剂的生物等效性;生物等效标准为受试制剂和参比制剂的 AUC_{0-t}、AUC_{0-∞} 和 C_{max} 几何均值比的 90%置信区间分别落在 80%~125%、80%~125%和 75%~133%之内。达峰时间(T_{max})采用配对 Wilcoxon 法检验。

2 结 果

2.1 血药浓度-时间曲线及药动学参数 32 名受试者口服硫酸氢氯吡格雷片受试制剂和参比制剂 75 mg 后氯吡格雷酸的平均血药浓度-时间曲线见图 1,主要药动学参数见表 1。

2.2 生物等效性分析 采用 DAS2.1.1 软件,硫酸氢氯吡格雷片受试制剂和参比制剂的 AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、C_{max} 经对数转换后进行方差分析,结果表明受试制剂和参比制剂间 AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、C_{max} 差异无统计学意义。90%置信区间检验结果表明受试制剂和参比制剂的 AUC_{0-t}、AUC_{0-∞} 几何均值比值分别为 103.3%、103.1%,其 90%置信区间分别为 100.7%~106.0%、100.9%~105.3%,均在 80%~125%的范围内;C_{max}

几何均值比值为 101.0%,其 90%置信区间为 93.3%~109.3%,在 75%~133%的范围内。受试制剂和参比制剂的 T_{max} 采用配对 Wilcoxon 法检验,结果表明受试制剂和参比制剂间 T_{max} 差异无统计学意义。



T:受试制剂;R:参比制剂。

图 1 硫酸氢氯吡格雷片受试制剂和参比制剂的平均血药浓度-时间曲线

表 1 硫酸氢氯吡格雷片受试制剂和参比制剂的药动学参数(±s)

参数	受试制剂	参比制剂
C _{max} (ng/mL)	4 724.07±1 399.60	4 621.96±1 193.52
t _{max} (h)	0.68±0.15	0.70±0.23
t _{1/2} (h)	8.21±3.26	8.00±1.44
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	11 235.17±2 250.63	10 835.07±1 994.46
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	11 606.80±2 323.53	11 201.94±1 953.69
F _{0-t} (%)	103.7±9.6	—
F _{0-∞} (%)	103.4±8.4	—

—:无数据。

2.3 安全性评价 32 名人组受试者均完成实验。共发生 11 人 17 例次不良事件,包括牙龈出血、口腔出血、鼻衄、血尿、胆红素血症、白细胞减少、视觉异常、角膜炎、紧张症反应。除视觉异常、角膜炎、紧张症反应外,其余不良事件均判断为与试验用药“很可能有关”或“可能有关”,即为不良反应。上述不良反应均为轻度,除 1 例鼻衄用纱布填塞止血外,其余不良反应均未作处理,随访至结果正常。

3 讨 论

作为疗效良好的抗血小板药物,氯吡格雷片在我国抗血栓药物中销量最大,特别是在心血管介入术后抗凝治疗中,是无可争议的一线药品。对硫酸氢氯吡格雷片原创药的成功仿制,从根源上保证了此类药品的市场供应,为了保障药物的安全有效性,要做好药物上市前的生物等效性评价。本试验研究结果表明,某制药公司研制的硫酸氢氯吡格雷 75 mg 片(受试制剂)与法国 SANOFI WINTHROP INDUSTRIE 生产,赛诺菲安万特(杭州)制药有限公司分装的硫酸氢氯吡格雷 75 mg 片(参比制剂)的吸收速度和吸收程度相当,具有生物等效性。

参考文献

[1] Close SL. Clopidogrel pharmacogenetics; metabolism and drug interactions[J]. Drug Metabol Drug Interact, 2011, 26(2): 45-51.
[2] Delavenne X, Basset T, Zufferey P, et al. Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel(下转第 1205 页)

6)刺激肝细胞产生的一种急性时相反应蛋白(APP),是一种非特异度的高敏感度炎症标志物,在急性炎症、组织损伤、感染、AMI时,血清中CRP明显增高。CRP能激活补体,促进粒细胞、巨噬细胞的运动和吞噬,减少一氧化氮(NO)的释放和内皮素-1的增加,从而导致血管内皮细胞损伤,促进血管内皮细胞增生、迁移、动脉内膜增厚,促进AS的形成发展与动脉血栓形成,增加心脑血管事件的危险^[18]。大量的临床研究资料表明,hs-CRP水平与心脑血管粥样硬化密切相关,当hs-CRP低于2.0 mg/L时,发生心血管疾病的危险性很低,而当hs-CRP高于3.0 mg/L时,发生心血管疾病的危险性明显增加,故认为hs-CRP可作为AS等心脑血管炎症疾病的独立危险因素^[5-7,13-14,17-18]。本研究显示,ACS、ST、CI组患者血清hs-CRP水平明显高于对照组;且与它们的发病危险呈正相关,可见hs-CRP在心脑血管事件中起着非常重要的作用,它可作为心脑血管事件危险评估的独立危险因素。

理想的心脑血管事件诊断的生化标志物应具有高度敏感度和特异度,并且出现早、持续时间长、检测周期短,但目前的生化标志物没有一项能完全达到要求,这就需要将早期标志物和确定标志物联合应用。有研究表明,即使在cTnT阴性的情况下,hs-CRP也可作为强有力的AMI的预警器,即cTnT和hs-CRP的协调应用对AMI的预测具有重要意义^[19]。本研究显示,单项指标cTnT、Hcy和hs-CRP对心脑血管事件早期诊断的阳性检出率分别为45.08%、68.85%、86.88%,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。同时表明,多指标联检有助于提高疾病诊断的阳性率,其中3项指标中任一指标阳性即作为阳性的敏感度最高,达96.72%;但3项指标均为阳性才视为诊断阳性的敏感度较低,只有44.26%,但特异度可达100%,这可以把阳性患者的误诊率降到最低。而cTnT、Hcy和hs-CRP三者联检的敏感度和特异度之和最大,且血清Hcy和cTnT、hs-CRP水平与心脑血管事件的发生均呈显著正相关,说明这3项指标联合检测对心脑血管事件的早预测与预防、早发现、早治疗具有非常重要的临床价值。

参考文献

- [1] Jaffe A S, Ravkilde J, Roberts R, et al. It's time for a change to troponin standard[J]. Circulation, 2000, 102(11): 1216-1220.
- [2] Babuin L, Jaffe AS. Troponin: The biomarker of choice for the detection of myocardial injury[J]. Can Med Assoc J, 2005, 173(10): 1191-1202.
- [3] 周正阳. 同型半胱氨酸与动脉粥样硬化病变研究的历史与现状概述[J]. 川北医学院学报, 2009, 24(1): 1-7.

- [4] Di Napoli M, Papa F, Bocola V. C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor[J]. Stroke, 2001, 32(4): 917.
- [5] 郑伦和, 刘翠银, 梅雄. 超敏C-反应蛋白检测在不同类型冠心病中的改变[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(1): 85-86.
- [6] 张新军. C-反应蛋白作为急性冠脉综合症的危险预测因子[J]. 国外医学: 临床生化与检验分册, 2002, 23(3): 173-175.
- [7] Auer J, Berent R, Lassnig E, et al. C-reactive protein and coronary artery disease[J]. Jpn Heart J, 2002, 43(6): 607-619.
- [8] 张海英, 罗刚. 肌钙蛋白对不稳定型心绞痛近期预后[J]. 中国实用内科杂志, 2001, 5(1): 85-87.
- [9] 文业华. cTnT及hs-cTnT检测在急性心肌梗死早期诊断中的临床价值评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 700-701.
- [10] 息子新, 钟秋莉, 李秋梅. cTnT在急性心肌梗死诊断中的价值[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(6): 38-40.
- [11] Perna ER, Macin SM, Cimbaro Canella JP, et al. Minor myocardial damage detected by troponin T is a powerful predictor of long-term prognosis in patients with acute decompensated heart failure[J]. Int J Cardiol, 2005, 99(2): 253-260.
- [12] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. N Engl Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [13] 刘恩华, 陈怀敏, 刘志普. 血清同型半胱氨酸、高敏C-反应蛋白水平与心脑血管事件危险相关性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(4): 214-216.
- [14] 黄秀兰. 急性冠状动脉综合征相关炎性生化标志物研究进展[J]. 华夏医学, 2006, 19(5): 1042-1043.
- [15] Humphrey L L, Fu R, Rogers K, et al. Homocystein level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis[J]. Mayo Clin Prog, 2008, 88(11): 1203-1212.
- [16] Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis[J]. JAMA, 2002, 228(16): 2015-2022.
- [17] 倪立新, 薛飞, 袁建新. 血浆同型半胱氨酸、超敏C反应蛋白与脑部大动脉粥样硬化性狭窄的相关性[J]. 中国微循环, 2008, 12(6): 365-367.
- [18] De Ferranti S, Rifai N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions[J]. Clin Chim Acta, 2002, 317(1/2): 1-15.
- [19] 董磊, 张晓鹏, 陈薇. 心肌损伤标志物研究进展[J]. 科技导报, 2008, 26(3): 80-85.

(收稿日期: 2012-12-28)

(上接第1202页)

- active metabolite[J]. J Sep Sci, 2010, 33(13): 1968-1972.
- [3] Mullangi R, Srinivas NR. Clopidogrel: review of bioanalytical methods, pharmacokinetics/pharmacodynamics, and update on recent trends in drug-drug interaction studies[J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(1): 26-41.
- [4] 李智, 解华, 田月洁. 基因多态性与氯吡格雷的合理用药[J]. 中国药师, 2010, 13(12): 1729-1733.

- [5] Mitakos A, Panderi I. A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations[J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 28(3/4): 431-438.
- [6] Takahashi M, Pang H, Kawabata K, et al. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(4): 1219-1224.

(收稿日期: 2012-12-08)