

# 大鼠口服硫酸氢氯吡格雷的多晶型吸收特点研究

于晓彦<sup>†</sup>, 陈芊茜<sup>†</sup>, 白晓宇, 田 硕, 孙加琳, 吕 扬<sup>\*</sup>, 杜冠华<sup>\*</sup>

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 本文采用多种分析检测技术对硫酸氢氯吡格雷的 4 种晶型物质进行了表征, 并采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatogram, HPLC) 技术测定大鼠血浆中硫酸氢氯吡格雷及其代谢产物的含量, 研究了大鼠口服硫酸氢氯吡格雷 4 种不同晶型的吸收特点。结果显示大鼠灌胃给予硫酸氢氯吡格雷后血浆中可以检测到反应吸收过程的代谢产物, 硫酸氢氯吡格雷 4 种晶型的代谢产物曲线下面积有显著性差异。故认为硫酸氢氯吡格雷的不同晶型物质表现出不同的药代动力学特征, 提示晶型物质状态不同可能会影响药物的体内作用。

**关键词:** 硫酸氢氯吡格雷; 晶型; 药代动力学

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1268-05

## Absorption dynamic characteristics of clopidogrel bisulfate polymorphs in rat

YU Xiao-yan<sup>†</sup>, CHEN Qian-xi<sup>†</sup>, BAI Xiao-yu, TIAN Shuo, SUN Jia-lin, LÜ Yang<sup>\*</sup>, DU Guan-hua<sup>\*</sup>

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Four crystalline forms of clopidogrel bisulfate were characterized by analytical techniques. Aiming to research the absorption characteristics of clopidogrel bisulfate polymorphs after taken orally by rat, and to estimate the influence of crystal form to pharmacodynamic action, four crystalline forms of clopidogrel bisulfate were administered intragastrically to rats, and high performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure the contents of clopidogrel bisulfate and its metabolite in rat plasma. The metabolite of clopidogrel bisulfate was detected in rat plasma. There were significant deviations among four crystalline forms in the areas under curve of the metabolite of clopidogrel bisulfate. We concluded that the different crystal forms of clopidogrel bisulfate showed different pharmacokinetic characteristics, which might affect pharmacodynamic action.

**Key words:** clopidogrel bisulfate; crystal form; pharmacokinetics

硫酸氢氯吡格雷 (clopidogrel bisulfate) 是噻吩并吡啶类抗血小板药物, 在 1997 年被美国 FDA 批准用于新发生的中风、心肌梗死或已确诊的周围动脉病, 以降低其死亡率<sup>[1, 2]</sup>。硫酸氢氯吡格雷的活性代谢产物可以选择性、不可逆地与血小板膜表面二磷酸腺苷 (ADP) 受体结合, 阻断 ADP 对腺苷酸环化酶

的抑制作用, 从而促进 cAMP 依赖的舒血管物质刺激磷酸蛋白 (VASP) 磷酸化, 抑制纤维蛋白原受体 (GP II b/IIIa) 活化进而抑制血小板聚集<sup>[3]</sup>。其活性代谢物为硫酸氢氯吡格雷经氧化水解而成的一种硫醇衍生物, 该化合物极不稳定, 血浆中检测不到。硫酸氢氯吡格雷血浆中的浓度很低 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$  水平), 其定量需要高灵敏度的生物分析方法。硫酸氢氯吡格雷无活性的羧酸代谢物 (SR26334, 结构式见图 1) 在血液循环中具有较高浓度, 常用于作为硫酸氢氯吡格雷药动学研究的标志物<sup>[1, 4, 5]</sup>。

多晶型现象是指一种化学物质存在两种或者两

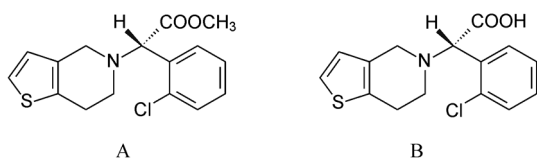
收稿日期: 2011-05-10.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09302-003, 2009ZX09501-021).

<sup>†</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup>通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn;

Tel / Fax: 86-10-63165212, E-mail: luy@imm.ac.cn



**Figure 1** Chemical structures of clopidogrel bisulfate (A) and its carboxylic acid metabolite SR26334 (B)

种以上的不同固体物质状态<sup>[6]</sup>, 药物的临床疗效作用与晶型物质状态有着密切的关系, 不同晶型物质可能会影响药物的生物利用度、临床疗效与安全性。因此, 当多晶型药物研制成固体口服制剂时, 需要对药物晶型物质状态进行系统研究, 选择一种临床治疗作用佳、晶型稳定、药品质量可控的优势晶型物质开发成药物, 具有重要的科学意义和应用价值<sup>[7]</sup>。

本实验采用 HPLC 法检测大鼠血浆中硫酸氢氯吡格雷及其代谢产物的含量, 研究大鼠经口服给予硫酸氢氯吡格雷不同晶型固体物质后吸收代谢特点, 为口服硫酸氢氯吡格雷提供生物利用度相关的生物学研究数据。

## 材料与方法

**晶型样品与制备方法**<sup>[8, 9]</sup> 晶 I 型: 将氯吡格雷硫酸氢盐 2 g 溶于甲醇 (4 mL) 中, 所得溶液滴加到乙醚 (300 mL) 中, 过滤干燥即得。晶 II 型: 在室温下将硫酸氢氯吡格雷 1 g 溶于乙腈 (6 mL) 中, 所得溶液滴加到乙醚 (350 mL) 中, 过滤干燥。晶 IV 型: 在回流温度 60 °C 下, 将硫酸氢氯吡格雷 3 g 回流溶于异丙醇 (60 mL) 中, 所得溶液冷却至室温, 减压干燥。晶 VII 型 (无定形): 在室温下将氯吡格雷硫酸氢盐 500 mg 溶于甲醇 (10 mL) 后, 加入水 10 mL, 减压干燥。

**试剂** 甲醇 (美国 Fisher 公司, 色谱纯), 乙腈 (美国 Honeywell 公司, 色谱纯), 异丙醇、三氟乙酸、乙酸乙酯为市售分析纯。

**仪器** 粉末 X 射线衍射仪 (日本 Rigaku D/max 2550); 差示扫描量热分析仪 (瑞士 Mettler DSC); 熔点仪 (中国 YRT-3); 傅立叶变换红外-近红外光谱仪 (美国 Perkin Elmer Spectrum 400); 液相色谱系统 (美国 Aglient 公司 Aglient1200); 氮吹仪 (北京康林公司 N-EVAP-TM111); 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司)。

**实验动物** 雄性 Wistar 大鼠 16 只, 体重 200~230 g, 购于北京维通利华公司, 合格证号: SCXK (京) 2006-0009。

**实验方法** 大鼠随机分为 4 组, 每组 4 只, 常规条件饲养, 自由饮水, 禁食 12 h 后, 每组分别用固体灌胃器给予硫酸氢氯吡格雷晶 I 型、晶 II 型、晶 IV 型及晶 VII 型, 剂量为 100 mg·kg<sup>-1</sup>。取血时间点: 于给药前及给药后 5、15、30 min 和 1、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48 h 由眼球后静脉丛取血 300~500 μL, 置肝素化 Ep 管中。

参考文献<sup>[10, 11]</sup>方法处理样品: 肝素抗凝静脉血于室温 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取血浆 100 μL, 加入乙酸乙酯 1 300 μL, 漩涡振荡 3 min, 13 400 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上层有机相 1 200 μL, 氮气挥干。用含水 40 μL、甲醇 40 μL 和乙腈 20 μL 的混合液 100 μL 溶解残留物, 漩涡振荡 1 min 后, 13 400 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min。取上清液 20 μL 进行 HPLC 检测。

HPLC 条件: 检测系统: Agilent 1200; 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 用乙腈与 0.05% TFA 水溶液进行梯度洗脱, 梯度洗脱条件见表 1; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 220 nm。

**Table 1** The conditions of gradient elution

| Time /min | Acetonitrile /% | 0.05% TFA/% |
|-----------|-----------------|-------------|
| 0.00      | 10.0            | 90.0        |
| 2.00      | 10.0            | 90.0        |
| 7.00      | 55.0            | 45.0        |
| 10.00     | 55.0            | 45.0        |
| 13.00     | 10.0            | 90.0        |

## 结果

### 1 硫酸氢氯吡格雷 4 种晶型表征

**1.1 粉末 X 射线衍射分析 (PRXD)** 对硫酸氢氯吡格雷的 4 种晶型样品进行粉末 X 射线衍射实验, 并获得粉末 X 射线衍射图谱, 与专利<sup>[8, 9]</sup>发布的晶型粉末衍射图谱一致 (图 2)。

**1.2 差示扫描量热分析 (DSC)** 对硫酸氢氯吡格雷的 4 种晶型样品进行 DSC 实验, DSC 图谱表明 4 种晶型样品均未分解, 也不存在其他转晶峰或溶剂峰, 4 种晶型的 DSC 吸热峰差异较大 (图 3)。

**1.3 红外光谱分析 (IR)** 对硫酸氢氯吡格雷的 4 种晶型样品进行红外吸收光谱实验, 采用衰减全反射技术 (ATR) 直接测定, 收集数据的波长范围为 4 000~650 cm<sup>-1</sup>, 由 MIR 光谱可见 4 种晶型在 1 500~650 cm<sup>-1</sup> 的指纹区间均存在较明显差异 (图 4)。

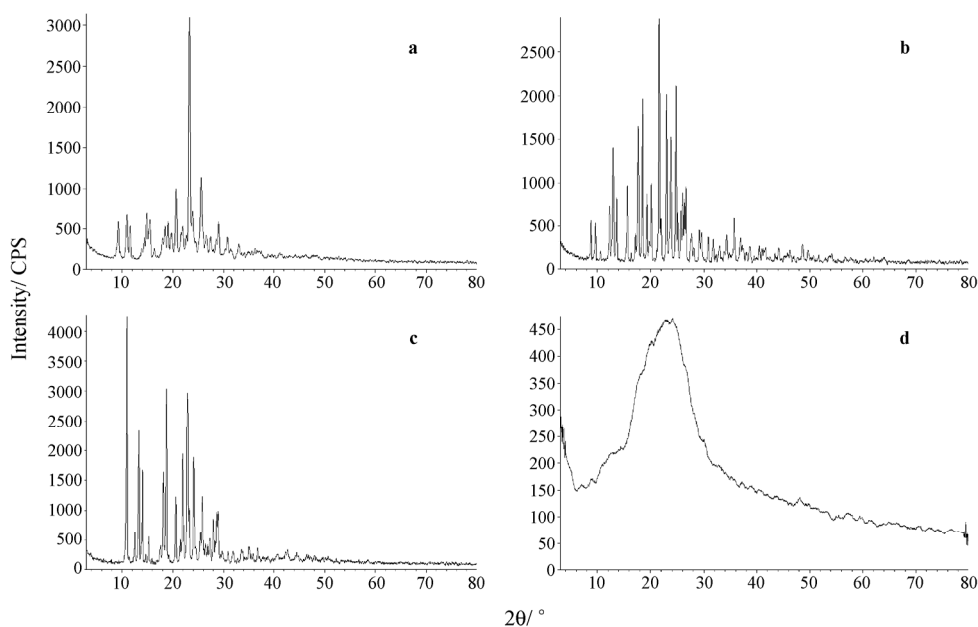


Figure 2 PXRD patterns of clopidogrel bisulfate. a: Form I; b: Form II; c: Form IV; d: Form VII

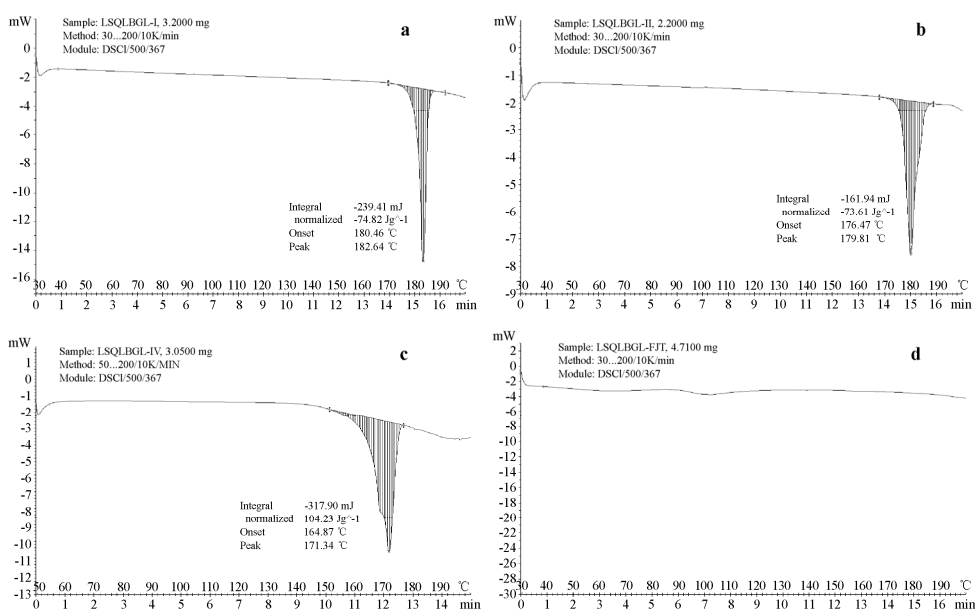


Figure 3 DSC spectra of clopidogrel bisulfate. a: Form I; b: Form II; c: Form IV; d: Form VII

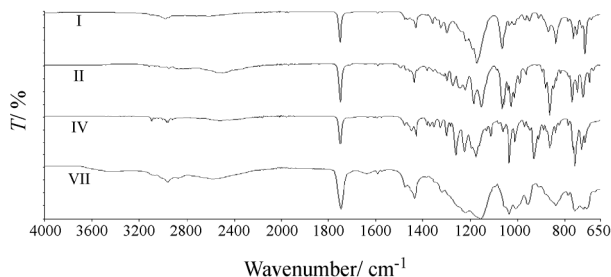


Figure 4 IR spectrums of clopidogrel bisulfate

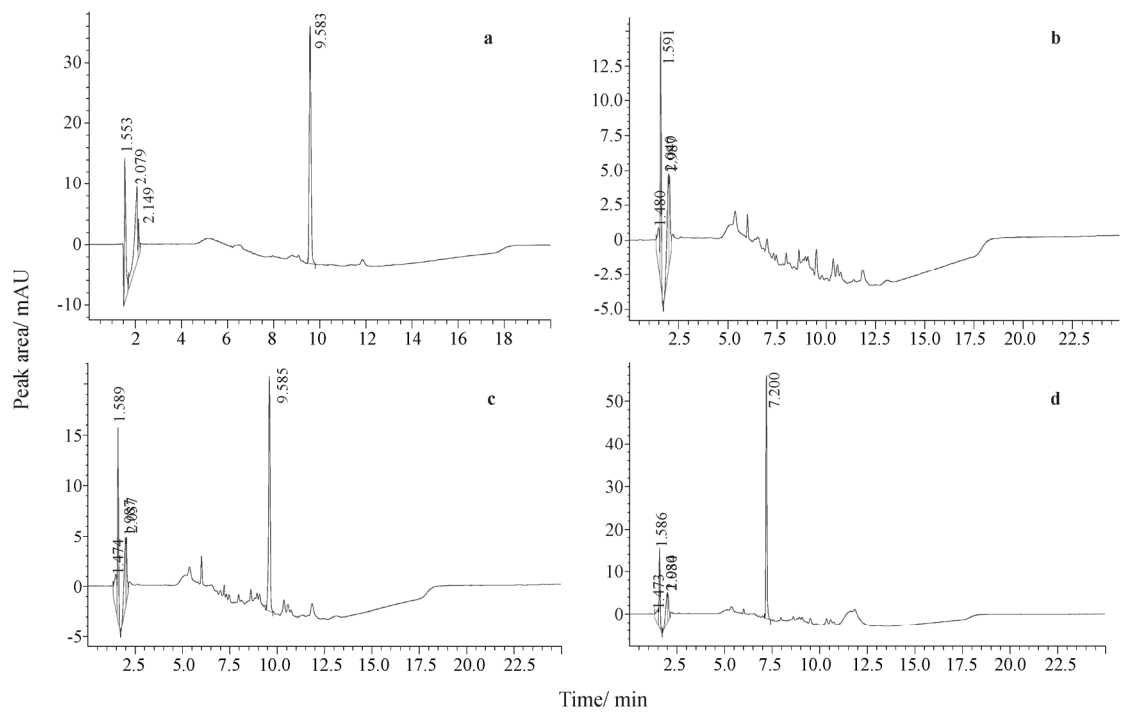
**1.4 熔点分析** 对硫酸氢氯吡格雷 4 种晶型进行了熔点测定, 结果如表 2 所示。

Table 2 Melting point of clopidogrel bisulfate

| Sample               | Incipient melting point/°C | Final melting point/°C | Melting range/°C |
|----------------------|----------------------------|------------------------|------------------|
| Form I               | 180.3                      | 181.1                  | 0.8              |
| Form II              | 178.5                      | 178.8                  | 0.3              |
| Form IV              | 164.6                      | 165.1                  | 0.5              |
| Form VII (amorphous) | 171.5                      | 176.2                  | 4.7              |

## 2 被检物质 HPLC 图谱特征

硫酸氢氯吡格雷在大鼠空白血浆中样品的 HPLC 图谱表现为在 9.5 min 左右有吸收峰, 该峰不受血浆中物质干扰 (图 5)。

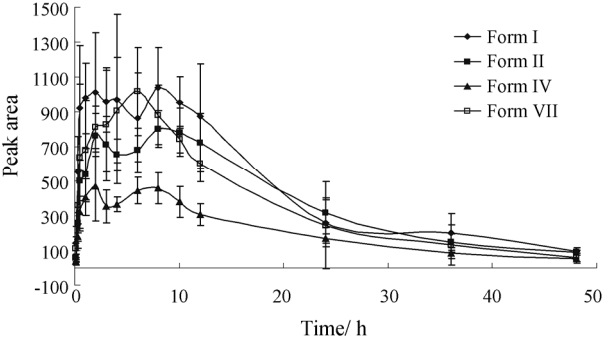


**Figure 5** HPLC chromatograms of clopidogrel bisulfate and its carboxylic acid metabolite. a: Clopidogrel ( $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); b: Plasma; c: Plasma spiked with clopidogrel ( $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); d: Plasma after clopidogrel bisulfate administration

硫酸氢氯吡格雷的 4 种晶型经固体灌胃给药后, 各时间点血液样品在 9.5 min 处均未检测到药物原形, 与空白血浆和空白血浆加入硫酸氢氯吡格雷相比, 在 7.3 min 出现符合药代动力学特点的吸收峰 (图 5d), 该吸收峰给药后迅速出现, 峰面积随时间变化, 可以反映药物吸收的程度和速度。根据文献<sup>[4, 5, 12]</sup>推测可能是硫酸氢氯吡格雷吸收后被迅速代谢为主要代谢产物 SR26334, 可用以描述各晶型之间的吸收差异。

3 各晶型药物代谢产物的血药浓度特征

大鼠灌胃给予硫酸氢氯吡格雷后, 血中代谢产物 SR26334 晶 I 型、晶 II 型在 8 h 达到峰值, 晶 IV 型在 2 h 达峰, 晶 VII 型在 6 h 达峰。通过专业软件 DAS3.0.7 计算, 硫酸氢氯吡格雷代谢产物 SR26334 色谱峰面积-时间曲线下面积 (AUC) 晶 I 型最高, 晶 II 型、晶 VII 型次之、晶 IV 型最小。结果见表 3、图 6 所示。



**Figure 6** The mean chromatographic peak area-time curves of the metabolite (SR26334) of clopidogrel bisulfate in four crystal forms ( $n = 4$ )

讨论

本研究采用专利技术方法制备获得了硫酸氢氯吡格雷的 4 种晶型物质, 并联合应用了粉末 X 射线衍射技术、差示扫描量热法、熔点分析和红外光谱分析等分析方法对这 4 种晶型物质进行表征, 结果显示粉

**Table 3** Pharmacokinetic differences between different crystal forms of clopidogrel bisulfate ( $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| Pharmacokinetic parameter | Form I                       | Form II                      | Form IV                     | Form VII                     |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| $t_{1/2}$ /h              | $10.945 \pm 2.121$           | $10.971 \pm 1.765$           | $13.883 \pm 1.571$          | $8.054 \pm 1.078$            |
| $t_{\max}$ /h             | $3.75 \pm 3.096$             | $7.5 \pm 4.123$              | $4 \pm 2.309$               | $4.5 \pm 1.915$              |
| $AUC_{0-48\text{ h}}$     | $22\,473.624 \pm 1\,809.817$ | $18\,725.398 \pm 3\,228.607$ | $9\,837.619 \pm 1\,693.734$ | $18\,175.655 \pm 4\,508.742$ |
| Peak-area <sub>max</sub>  | $1\,358.275 \pm 218.733$     | $835.05 \pm 118.357$         | $542.6 \pm 120.574$         | $1\,056.275 \pm 256.594$     |

末 X 射线衍射法、差示扫描量热法、熔点法和红外光谱法等不同分析技术均可有效表征和区分不同晶型物质状态,并为生物学的晶型物质药代动力学研究提供了晶型物质基础。

通过对硫酸氢氯吡格雷 4 种晶型物质的药物代谢研究,结果证明大鼠口服晶型物质后在生物体内代谢迅速,体内检测不到原形药物,在给药 5 min 后能检测到代谢产物 SR26334,该代谢产物的峰浓度及 AUC 与剂量间呈线性量效相关<sup>[13]</sup>,故采用高效液相色谱技术测定大鼠血浆峰面积变化,从而反映该药物的吸收特征。本研究在动物给药方式上保证了口服固体给药特征,为正确评价晶型物质的生物学特征提供了技术保证。

从血浆中 SR26334 的色谱峰平均峰面积与时间曲线可以看出,大鼠分别口服 4 种晶型的硫酸氢氯吡格雷后,晶 I 型经吸收后的代谢产物曲线下峰面积最大,甚至达到晶 IV 型的 2.23 倍;数据比对结果表明晶 I 型的吸收量最大,且达峰时间长达 8 h,属硫酸氢氯吡格雷的优势晶型物质。另外,硫酸氢氯吡格雷晶 I 型、晶 II 型、晶 IV 型的代谢产物在 2 h 均达到第 1 个峰值,随后略降,8 h 达到第 2 个峰值,出现了双峰,推测可能存在肠肝循环现象,而晶 VII 型则没有这种现象。

晶型种类不同的化合物,由于分子在空间构象与排列规律及分子间作用力的不同,分别处于不同的能量状态,故在进入消化道开始溶解、吸收的过程会有差异,进而影响其代谢、排泄。

综上所述,对硫酸氢氯吡格雷的不同晶型物质的固体给药方式的药代动力学特征研究,证明晶型物质可能会影响药物的体内作用,因此,本研究在优势药用晶型物质选择和药物的合理应用中具有重要的科学信息提示作用。

## References

- [1] Fan HW, Zou JJ, Lin S, et al. Simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Chin J New Drug Clin Rem (中国新药与临床杂志), 2008, 27: 811–815.
- [2] Hu WM, Zhang WY, Cheng G, et al. Pharmacokinetics of clopidogrel tablets in Beagle dogs [J]. Chin J Pharm (中国药剂学杂志), 2009, 4: 328–337.
- [3] Ni HC, Fan WH. Clopidogrel—a new antiplatelet agent [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2001, 10: 888–891.
- [4] Hanna K, Piotr R, Mirosława BK. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41: 533–539.
- [5] Dhara KR, Bhagwat P, Amrit P, et al. Characterization of degradation products of amorphous and polymorphic forms of clopidogrel bisulphate under solid state stress conditions [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52: 332–344.
- [6] Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJ. Crystalline solids [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 48: 3–26.
- [7] Pang YN, Yin GK. Drugs with pleiomorphism [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2000, 15: 197–199.
- [8] Lifushici-Lilun R, Kovalevski-Yisai E, Witsel S, et al. Polymorph of clopidogrel bisulfatein: CN, 1923835A [P]. 2007-03-07.
- [9] Mao HF, Pan XH. A method of preparing clopidogrel bisulfatein crystal form I: CN, 100503615C [P]. 2009-06-24.
- [10] Sonu 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]. J Chromatog B, 2005, 821: 173–180.
- [11] Achlleas M, Irene P. Determination of the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2004, 505: 107–114.
- [12] Effat S, Hassan J, Abbas KZ, et al. Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatog, 2006, 20: 1309–1314.
- [13] Caplain H, Donat F, Gaud C, et al. Pharmacokinetics of colpidogrel [J]. Semin Thromb Hemost, 1999, 25 (Suppl 2): S25–S28.