

# 应用血栓弹力图评价氯吡格雷血药浓度与凝血功能的相关性<sup>Δ</sup>

万盟<sup>1\*</sup>,朱余兵<sup>1</sup>,叶飞<sup>2</sup>,邹建军<sup>1</sup>,张倩<sup>1</sup>,张雪萌<sup>1</sup>,陶宜富<sup>3#</sup>(1.南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院药学部,南京 210006;2.南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院心内科,南京 210006;3.南京市药品集中采购托管中心,南京 210019)

中图分类号 R969.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)14-1911-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.14.12

**摘要** 目的:考察氯吡格雷血药浓度与凝血功能的相关性。方法:选择我院2014年6月—2015年6月经皮冠状动脉介入治疗术后的急性冠状动脉综合征患者126例,术前服用维持剂(硫酸氢氯吡格雷75 mg+阿司匹林100 mg),qd,连续服用5 d;术前1 d顿服负荷剂量(硫酸氢氯吡格雷300 mg+阿司匹林100 mg);术后继续服用维持剂。于术后服用维持剂量的第2日,采用液相色谱-串联质谱法测定患者体内氯吡格雷的血药浓度,采用血栓弹力图仪测定患者血凝块形成时间[第一块纤维蛋白凝块形成的时间(R)+血凝块强度达到20 mm振幅的时间(K)],纤维蛋白和血凝块加固速度(以Angle表示)及纤维蛋白凝块最终强度(MA),采用Pearson检验进行相关性分析。结果:患者体内氯吡格雷的平均血药浓度为(82.3±20.1)ng/L,(R+K)为(7.8±2.4)min,Angle为(64.1±8.7)°,MA为(60.7±7.2)mm;氯吡格雷血药浓度与(R+K)呈正相关( $r=0.671, P<0.01$ ),与Angle呈负相关( $r=-0.556, P<0.01$ ),与MA不相关( $r=-0.073, P>0.05$ )。结论:随着氯吡格雷血药浓度的升高,(R+K)延长,而纤维蛋白和血凝块加固速度降低。

**关键词** 血栓弹力图;氯吡格雷;液相色谱-串联质谱法;血药浓度;相关性

## Evaluation of the Correlation of Plasma Concentrations of Clopidogrel with Coagulation Function by Thrombelastography

WAN Meng<sup>1</sup>, ZHU Yubing<sup>1</sup>, YE Fei<sup>2</sup>, ZOU Jianjun<sup>1</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>, ZHANG Xuemeng<sup>1</sup>, TAO Yifu<sup>3</sup>(1.Dept. of Pharmacy, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University/Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, China; 2.Dept. of Cardiology, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University/Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, China; 3.Nanjing Centralized Drugs Procurement and Management Center, Nanjing 210019, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the correlation of plasma concentrations of clopidogrel with coagulation function. METHODS: 126 acute coronary syndrome (ACS) patients underwent PCI were selected from our hospital during Jun. 2014-Jun. 2015. They were given maintenance dose (clopidogrel hydrogen sulfate 75 mg+aspirin 100 mg) before operation, qd, for consecutive 5 d; given loading dose (clopidogrel hydrogen sulfate 300 mg+aspirin 100 mg) at a draught one day before operation; given maintenance dose again after operation. On the second day of giving maintenance dose after operation, plasma concentration of clopidogrel was determined by LC-MS/MS; thrombelastography (TEG) was used to determine blood clot formation time [the formation time of first piece fibrae sanguis (R)+the time of blood clot strength reaching 20 mm (K)], fibrae sanguis and blood clot consolidation time (expressed by Angle) and fibrae sanguis and blood clot final strength (MA). Pearson test was adopted for relationship analysis. RESULTS: Average plasma concentration of clopidogrel was (82.3±20.1) ng/L, (R+K) was (7.8±2.4) min, Angle was (64.1±8.7)° and MA was (60.7±7.2) mm. Plasma concentration of clopidogrel was positively correlated with (R+K) ( $r=0.671, P<0.01$ ) and negatively correlated with Angle ( $r=-0.556, P<0.01$ ). There was no correlation between plasma concentration of clopidogrel and MA ( $r=-0.073, P>0.05$ ). CONCLUSIONS: As plasma concentration of clopidogrel increased, blood clot formation time prolonged while fibrae sanguis and blood clot consolidation speed decreased.

**KEYWORDS** Thrombelastography; Clopidogrel; LC-MS/MS; Plasma concentration; Correlation

急性冠状动脉综合征(Acute coronary syndrome, ACS)患者或经皮冠脉介入治疗(Percutaneous coronary intervention, PCI)后必须进行抗血小板治疗,氯吡格雷与阿司匹林的双联

Δ 基金项目:南京药学会-常州四药医院药学科研基金项目(No.2014YX002)

\* 药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:025-87726282。E-mail:wanmeng1985@sina.cn

# 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:临床药学、药事管理。电话:025-86275063。E-mail:taoyifu@126.com

抗血小板药物治疗方案能有效预防、减少并发症的发生,是国际公认的常规治疗方案<sup>[1]</sup>。但由于氯吡格雷的低反应性[可能与遗传因素、基础血小板反应性、疾病状态、肝脏细胞色素P<sub>450</sub>(CYP)3A4同工酶的代谢活性及药物之间的相互作用等相关]<sup>[2]</sup>,使部分患者即使接受常规抗血小板治疗,临床上仍不能有效防止血栓事件的发生,且不能有效抑制血小板聚集,从而导致患者血小板功能异常,增加其出血风险或导致冠状动脉支架内再狭窄及支架血栓的形成。氯吡格雷经胃肠道吸收后在人体内迅速代谢,其活性代谢物与原型药物的血药浓度极

低<sup>[3-4]</sup>,其定量检测需要高灵敏度的生物分析方法。目前,已有较多文献报道采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中氯吡格雷的浓度<sup>[5]</sup>。该方法简便、重复性好、灵敏度高,可满足血药浓度较低的氯吡格雷的检测<sup>[6-7]</sup>。血栓弹力图(Thromboelastograms, TEG)可对凝血、血小板聚集、纤溶等变化进行全过程动态监测,对凝血时间有明确的预测价值,是一种床边快速检测血小板功能的方法<sup>[8]</sup>。本研究应用TEG评价PCI术后服用氯吡格雷的ACS患者的凝血功能,同时采用LC-MS/MS法测定其血药浓度,以探讨氯吡格雷血药浓度与凝血功能的相关性,为ACS患者行PCI术后抗血小板药物治疗的疗效评价提供试验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择2014年6月—2015年6月于我院行PCI术,且经TEG检测血小板功能的ACS患者126例,其中男性69例,女性57例,平均年龄(68.8±11.7)岁。所有患者均知情同意并签署知情同意书。

纳入标准:(1)经检查确诊为ACS;(2)造影提示至少1支冠状动脉主要血管或主要分支>70%直径狭窄;(3)依从性良好,可坚持完成随访者。排除标准:(1)血小板计数>450×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>或<100×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>;(2)术前2周使用华法林等影响血小板聚集抑制率的药物;(3)存在阿司匹林或氯吡格雷使用禁忌证;(4)各种血液系统疾病、出血性疾病或有出血倾向;(5)伴有严重肝肾功能损害或恶性肿瘤。

### 1.2 材料

1.2.1 仪器 Themro Finnigan TSQ Quanoum Discovery Max型液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(包括Xcalibur高级色谱工作站,美国Thermo-Finnigan公司);5000型TEG凝血分析仪(美国Haemoscope公司);AB135-S型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);H1850R型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);TTL-30型超纯水器(北京同泰联科技发展有限公司)。

1.2.2 药品与试剂 硫酸氢氯吡格雷片(商品名:波立维,法国Sanofi-Aventis公司,批号:5A453,规格:75 mg/片);阿司匹林肠溶片(德国Bayer公司,批号:BJ24049,规格:100 mg/片);硫酸氢氯吡格雷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100819,纯度:99.5%);吡格列酮对照品(内标,北京万佳首化生物科技有限公司,批号:150113,纯度:99.6%);高岭土(含1% Kadin液)、激活剂、花生四烯酸、二磷酸腺苷均购自美国Haemoscope公司;甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯;空白血浆由南京市第一医院提供。

### 1.3 研究方法

1.3.1 药物治疗 PCI患者术前服用维持剂量(硫酸氢氯吡格雷75 mg+阿司匹林100 mg),qd,连续服用5 d;并于术前1 d顿服负荷剂量(硫酸氢氯吡格雷300 mg+阿司匹林100 mg);术后继续服用维持剂量。

1.3.2 TEG检测 所有患者行PCI术后,于服用维持剂量的第2日晨起静脉采血各2 ml,分别置于1个肝素抗凝管和3个枸橼酸抗凝管中作抗凝处理,2 h内应用TEG仪进行检测,并记录二磷酸腺苷(ADP)通道的第一块纤维蛋白凝块形成的时间(R)、血凝块强度达20 mm振幅的时间(K)、纤维蛋白和血凝块加固速度(以Angle表示)及纤维蛋白凝块最终强度(MA)等

参数。

1.3.3 色谱与质谱条件 色谱柱:Zorbax C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,3.5 μm);流动相:甲醇-0.1%甲酸(85:15, V/V);流速:0.2 ml/min;柱温:25℃;进样量:15 μl。采用气动辅助电喷雾离子化离子源,以选择性离子监测(SRM)方式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为m/z 322.1→212.0(氯吡格雷)、m/z 357.1→134.0(内标);喷雾电压:4 000 V;鞘层气体压力:10 AU;辅助气体压力:5 AU;毛细管温度:270℃;套管透镜补偿电压:157 V;碰撞压力:23.8 Pa;碰撞能量:-15 V。

1.3.4 溶液的制备 精密称取硫酸氢氯吡格雷对照品6.56 mg(相当于氯吡格雷5 mg)于50 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为100 mg/L的氯吡格雷贮备液;再将其稀释成质量浓度为0.1 mg/L的氯吡格雷标准溶液。精密称取内标对照品5 mg于10 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释得质量浓度为0.1 mg/L的内标溶液。

1.3.5 血浆样品处理 精密吸取空白血浆0.2 ml,置于EP管中,精密加入内标溶液50 μl,涡旋混匀30 s,加入乙醚1 ml,涡旋混匀3 min,4℃下以离心半径6.2 cm、转速16 000 r/min离心5 min;移取上层有机相置于另一EP管中,于40℃水浴下以氮气流吹干,加入流动相300 μl复溶;4℃下以离心半径6.2 cm、转速16 000 r/min离心5 min,取上清液,进样分析。

1.3.6 标准曲线的绘制 取空白血浆适量,加入氯吡格雷标准溶液适量,配制成质量浓度分别为50、100、300、1 000、3 000、5 000 ng/L的血浆样品,按“1.3.5”项下方法处理后,进样测定,记录色谱图。以待测物与内标峰面积比值(y)为纵坐标、待测物质量浓度(c)为横坐标进行线性回归。

1.3.7 方法学考察 具体方法参考本课题组前期试验内容<sup>[6-7]</sup>。

1.3.8 血药浓度的测定 于术后服用维持剂量第2日晨起时空腹静脉采血2 ml,经枸橼酸钠抗凝后,以离心半径9.2 cm、转速4 000 r/min离心5 min,取上清液,于-80℃保存,待测。取出冰冻保存的血浆样本,于37℃水浴下复融,精密吸取0.2 ml,按“1.3.5”项下方法处理后,进样测定。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件分析处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;相关性分析采用Pearson检验;相关系数(r)为正值表示两参数呈正相关,反之则呈负相关。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 方法专属性

在“1.3.3”条件下,氯吡格雷与内标的峰形良好,分离完全,内源性物质不干扰测定。典型色谱图见图1。

### 2.2 标准曲线及定量下限

按“1.3.6”下方法进样测定,得回归方程为 $y = 0.000 5c - 0.002$ ( $r = 0.995 7, n = 3$ )。结果表明,氯吡格雷的血药浓度在50~5 000 ng/L范围内线性关系良好,其定量下限为50 ng/L。

### 2.3 方法学考察结果<sup>[6-7]</sup>

参考本课题组前期研究结果。该方法的精密性、方法回收率、提取回收率、稳定性等均符合生物样品定量分析的要求<sup>[9]</sup>。

### 2.4 血药浓度的测定结果

患者体内氯吡格雷的血药浓度为53.7~185.1 ng/L,平均血药浓度为(82.3±20.1)ng/L,其个体差异较大。

### 2.5 氯吡格雷血药浓度与血凝块形成时间(R+K)的关系

126例患者的(R+K)在4.5~20.6 min范围内,平均值为

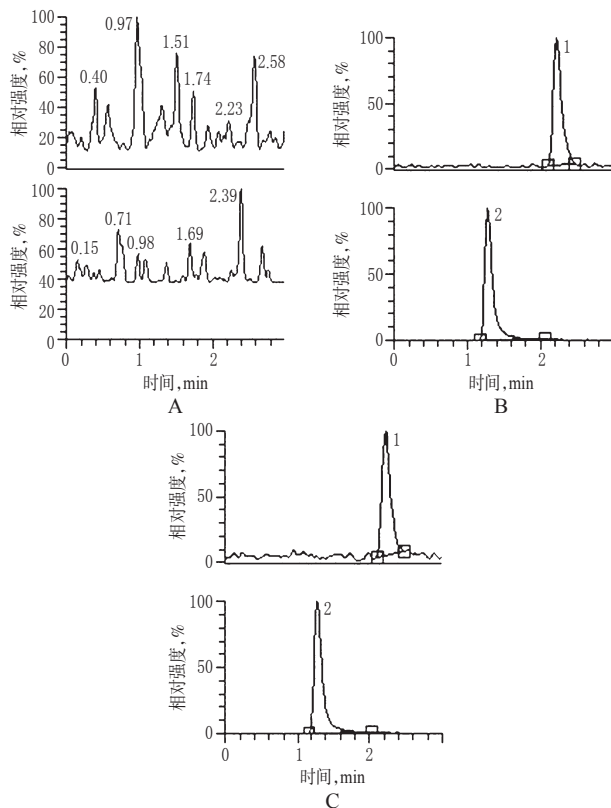


图1 典型色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+氯吡格雷(100 ng/L)+内标(0.1 mg/L);C.患者用药4 h后的血浆样本+内标;1.氯吡格雷;2.内标

Fig 1 Representative chromatograms

A.blank plasma;B.blank plasma +clopidogrel (100 ng/L)+internal standard (0.1 mg/L); C.plasma sample 4 h after administration + internal standard; 1.clopidogrel; 2.internal standard

(7.8 ± 2.4)min. Pearson 检验结果显示,随着氯吡格雷血药浓度的升高,(R+K)增加,血凝块形成时间延长,氯吡格雷血药浓度与血凝块形成时间呈正相关( $r=0.671, P=0.000 < 0.01$ ),回归方程为  $(R+K)=0.08144c+1.11$ 。氯吡格雷血药浓度与(R+K)的关系见图2。

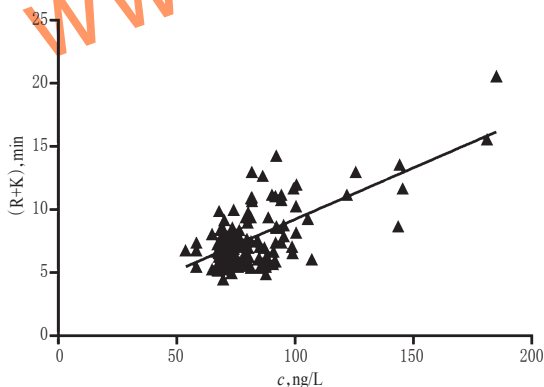


图2 氯吡格雷血药浓度与(R+K)的关系( $n=126$ )

Fig 2 Relationship of plasma concentration of clopidogrel with (R+K) ( $n=126$ )

## 2.6 氯吡格雷血药浓度与纤维蛋白和血凝块加固速度的关系

126 例患者的 Angle 为 24.8~80.7°, 平均值为 (64.1 ± 8.7)°。Pearson 检验结果显示,随着氯吡格雷血药浓度的升高,Angle 减小,纤维蛋白和血凝块加固速度减慢,氯吡格雷血

药浓度与纤维蛋白和血凝块加固速呈负相关( $r=-0.556, P=0.000 < 0.01$ ),回归方程为  $Angle=-0.2395c+83.77$ 。氯吡格雷血药浓度与 Angle 的关系见图3。

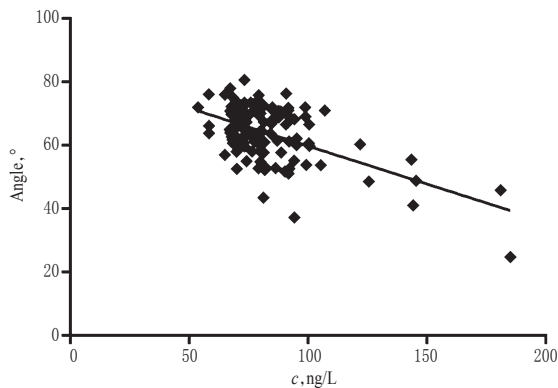


图3 氯吡格雷血药浓度与 Angle 的关系( $n=126$ )

Fig 3 Relationship of plasma concentration of clopidogrel with Angle ( $n=126$ )

## 2.7 氯吡格雷血药浓度与 MA 的关系

126 例患者的 MA 值为 38.1~78.1 mm, 平均值为 (60.7 ± 7.2)mm。Pearson 检验结果显示,随着氯吡格雷浓度的升高,MA 值小幅度减小,纤维蛋白凝块最终强度虽有一定的减弱趋势,但两者并无相关性( $r=-0.073, P=0.418 > 0.05$ )。氯吡格雷血药浓度与 MA 的关系见图4。

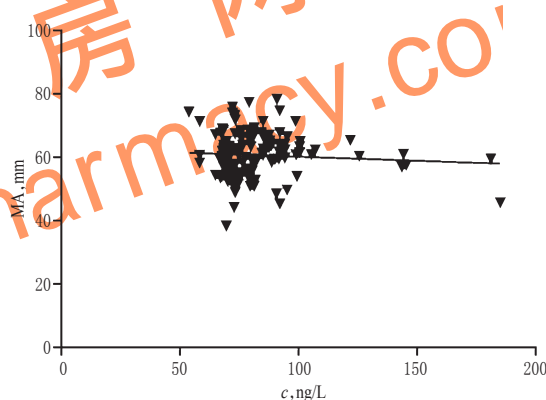


图4 氯吡格雷血药浓度与 MA 的关系( $n=126$ )

Fig 4 Relationship of plasma concentration of clopidogrel with MA ( $n=126$ )

## 3 讨论

随着 CURE、CREDO 两项大型试验的研究结果公布,氯吡格雷和阿司匹林的双联抗血小板治疗逐渐成为冠心病、尤其是 ACS 患者围术期标准的抗血栓治疗方案<sup>[10-11]</sup>。然而,临床上仍有 20% 左右的患者被证实即使运用了双联抗血小板保护,但还是会发生再缺血或再栓塞事件<sup>[12]</sup>。对于 PCI 术后抗血小板治疗的患者,支架内血栓聚集引起的支架再狭窄往往会造成极为严重的后果,致病致死率高达 20%~25%<sup>[13]</sup>。

氯吡格雷是一个非活性的前体药物,其吸收进入人体后经过肝脏代谢生成无活性的羧酸代谢物与有活性的代谢产物,活性代谢产物最终直接发挥抗血小板作用。有文献报道,约有 30% 的患者在服用氯吡格雷后,达不到抗血小板治疗的效果,并产生一定程度的抵抗作用<sup>[14]</sup>。其原因可能与肝脏 CYP (如 CYP3A4、CYP3A5、CYP2C9) 的个体化差异密切相关<sup>[15]</sup>。所以氯吡格雷及其代谢物的血药浓度监测对临床个体化用药



具有重大意义。通过对氯吡格雷血药浓度的测定可以分析未被转化的原药水平,并间接判断机体对氯吡格雷的代谢能力,进而快速分析是否存在抵抗现象。大量文献也将进入人体后的原型药物或代谢产物作为研究对象,进行药动学及生物等效性研究<sup>[16-18]</sup>。

本研究采用LC-MS/MS法检测人血浆中氯吡格雷原型药物的浓度,应用TEG快速、动态地监测患者的凝血过程,考察氯吡格雷血药浓度变化与凝血功能的相关性。结果显示,随着氯吡格雷血药浓度的升高,(R+K)增加( $r=0.671, P<0.01$ ),血凝块加固速率降低( $r=-0.556, P<0.01$ ),但与MA无明显相关性( $r=-0.073, P>0.05$ )。试验结果提示,经过代谢后,原型药物的血药浓度可能与临床疗效存在一定关联,推测由于代谢的个体差异影响了氯吡格雷与活性代谢物的血药浓度,从而原型药物也可以反映出用药后个体反应的差别,国内临床学者已有这方面的探讨<sup>[18]</sup>。所以,血浆中氯吡格雷的浓度,可从一定程度上反映患者药物代谢的情况,进而对药物代谢与临床效果进行评价。

本试验仅考察了原型药物血药浓度与凝血功能的相关性,由于氯吡格雷在体内需要经过酶代谢后才具有活性,因此开展氯吡格雷活性代谢物血药浓度检测,显得很有意义。在后续研究中,笔者将以氯吡格雷活性代谢物的血药浓度作为研究对象,考察氯吡格雷原型药物与体内活性代谢物浓度的关系,并充分评价其与凝血功能的量效关系,以期阐明氯吡格雷及其活性代谢物血药浓度与凝血功能的相关性提供参考。

#### 参考文献

[1] Wiviott SD, Steg PG. Clinical evidence for oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes[J]. *Lancet*, 2015, 386(9990):292.

[2] Vadász D, Sztrihá LK, Sas K, et al. Aspirin and clopidogrel resistance: possible mechanisms and clinical relevance. Part II: potential causes and laboratory tests[J]. *Ideggyogy Sz*, 2013, 66(1/2):15.

[3] Liang Y, Hirsh J, Weitz JI, et al. Active metabolite concentration of clopidogrel in patients taking different doses of aspirin: results of the interaction trial[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(3):347.

[4] Karaźniewicz-Łada M, Danielak D, Burchardt P, et al. Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53(2):155.

[5] Silvestro L, Gheorghie MC, Tarcomnicu I, et al. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma. Use of incurred samples to test back-conversion[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(30):3134.

[6] Zou JJ, Ding L, Tan J, et al. CYP2C19 681G>A polymorphism and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy Chinese volunteers[J]. *Pharmazie*, 2012, 67(9):792.

[7] 樊宏伟,邹建军,林松,等.LC-MS/MS法同时测定人血浆中氯吡格雷及其羧酸代谢物的浓度[J]. *中国新药与临床杂志*, 2008, 27(11):811.

[8] Hobson AR, Qureshi Z, Banks P, et al. Effects of clopidogrel on "aspirin specific" pathways of platelet inhibition[J]. *Platelets*, 2009, 20(6):386.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:363-368.

[10] Fox KA, Mehta SR, Peters R, et al. Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent ischemic events (CURE) trial[J]. *Circulation*, 2004, 110(10):1202.

[11] Best PJ, Steinhubl SR, Berger PB, et al. The efficacy and safety of short- and long-term dual antiplatelet therapy in patients with mild or moderate chronic kidney disease: results from the clopidogrel for the reduction of events during observation (CREDO) trial[J]. *Am Heart J*, 2008, 155(4):687.

[12] Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, et al. Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the prepare post-stenting study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(10):1820.

[13] Kuchulakanti PK, Chu WW, Torguson R, et al. Correlates and long-term outcomes of angiographically proven stent thrombosis with sirolimus- and paclitaxel-eluting stents[J]. *Circulation*, 2006, 113(8):1108.

[14] Notarangelo MF, Bontardelli F, Merlini PA. Genetic and nongenetic factors influencing the response to clopidogrel[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2013, doi:10.2459/jcm.0b013e328364bb04.

[15] Brackbill ML, Kidd RS, Abdoo AD, et al. Frequency of CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 variant alleles in patients receiving clopidogrel that experience repeat acute coronary syndrome[J]. *Heart Vessels*, 2009, 24(2):73.

[16] Zhang H, Lauver DA, Lucchesi BR, et al. Formation, reactivity and antiplatelet activity of mixed disulfide conjugates of clopidogrel[J]. *Mol Pharmacol*, 2013, 83(4):848.

[17] 孙增先,王海东,倪善红,等.UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中氯吡格雷及其代谢物的浓度[J]. *中国药房*, 2015, 26(35):4942.

[18] Peer CJ, Spencer SD, VanDenBerg DA, et al. A sensitive and rapid ultra HPLC-MS/MS method for the simultaneous detection of clopidogrel and its derivatized active thiol metabolite in human plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 880(1):132.

[19] 周超飞,任艺虹,宋玉乔,等.急性冠脉综合征患者氯吡格雷血药浓度与个体反应性差异的关系[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2014, 6(1):31.

(收稿日期:2015-12-14 修回日期:2016-01-18)

(编辑:张元媛)