

液相色谱-质谱联用法测定人血浆中氯吡格雷及其3种代谢产物的浓度^Δ

刘取瑞*,姚璞,杨波,王瑜,冯伟,孙凤军[#](陆军军医大学第一附属医院药剂科,重庆 400038)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2946-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.14

摘要 目的:建立同时测定人血浆中氯吡格雷(CLP)及其中间代谢产物2-氧-氯吡格雷(2-O-CLP)、非活性代谢产物氯吡格雷羧酸代谢物(CLPCA)和活性代谢产物氯吡格雷硫酸酯代谢物(CLPTM)浓度的方法。方法:选取陆军军医大学第一附属医院确诊为脑卒中的90名患者,早晨空腹口服1片氯吡格雷片(75 mg/片),于服药2 h后采集血样,将CLPTM经2-溴-3'-甲氧基苯乙酮衍生形成CLPTM-D后与其余3种待测物一起通过乙腈蛋白沉淀提取后,采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定其浓度。色谱柱为Agilent poroshell 120 EC-C₁₈,流动相为0.1%甲酸的乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液(90:10, V/V),采用多反应监测模式进行正离子检测,检测离子对分别为CLPCA质荷比(*m/z*) 308.1→198.1、CLP *m/z* 322.3→212.0、2-O-CLP *m/z* 338.3→155.0、CLPTM-D *m/z* 504.4→354.1、内标噻氯吡啶 *m/z* 264.0→154.1。结果:CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D和内标的保留时间分别为2.01、3.32、2.83、2.68、1.87 min,CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D检测质量浓度的线性范围分别为100~10 000、0.2~20、0.3~30、0.5~50 ng/mL(*r*均≥0.999 5),日内、日间精密度的RSD均≤9.5%(*n*=5),准确度为93.5%~98.9%(*n*=5),提取回收率为85.4%~95.9%(*n*=5),基质效应的CV为2.7%~6.2%(*n*=5)。稳定性(-80 ℃放置3个月、3次冷冻-解冻循环、4 ℃放置8 h)试验中,CLPCA、CLP、2-O-CLP和CLPTM-D的RE均≤10.0%(*n*=5)。结论:建立的LC-MS/MS法特异性强,测定结果准确可靠,可用于检测人血浆中CLP及其3种代谢产物的浓度。

关键词 液相色谱-串联质谱法;氯吡格雷;代谢产物;血浆浓度

Determination of Clopidogrel and Its Three Metabolites Concentrations in Human Plasma by LC-MS/MS

LIU Zhirui, YAO Pu, YANG Bo, WANG Yu, FENG Wei, SUN Fengjun (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of clopidogrel (CLP), its intermediate metabolite (2-O-CLP), inactive metabolite (CLPCA) and active metabolite (CLPTM) in human plasma. METHODS: Totally 90 patients diagnosed as stroke were selected from the First Affiliated Hospital of Army Medical University. They were given one CLP tablet (75 mg/tablet) orally on an empty stomach in the morning. Blood samples were collected 2 h after taking the tablet. CLPTM-D was formed by derivation of CLPTM with 2-bromo-3'-methoxyacetophenone and extracted by precipitation of acetonitrile protein together with the other three substances to be measured. LC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Agilent poroshell 120 EC-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile (0.1% formic acid) and water (0.1% formic acid) (90:10, V/V). The quantitation analysis was performed using multiple reaction monitoring at the specific ion transitions of *m/z* 308.1→198.1 (CLPCA), 322.3→212.0 (CLP), 338.3→155.0 (2-O-CLP), 504.4→354.1 (CLPTM-D) and 264.0→154.1 (ticlopidine, internal standard), respectively. RESULTS: The retention time of CLPCA, CLP, 2-O-CLP, CLPTM-D and internal standard were 2.01, 3.32, 2.83, 2.68, 1.87 min, respectively. The linear range of CLPCA, CLP, 2-O-CLP and CLPTM-D were 100-10 000, 0.2-20, 0.3-30, 0.5-50 ng/mL (all *r*≥0.999 5). The intra-day and inter-day RSD were all less than 9.5% (*n*=5). Accuracy ranged from 93.5%-98.9% (*n*=5), and extraction recovery was from 85.4% to 95.9% (*n*=5). The matrix effect ranged from 2.7%-6.2% (*n*=5). In stability tests (storing at -80 ℃ for 3 months, 3 freeze-thaw cycles, storing at 4 ℃ for 8 h), RE of CLP, CLPCA and CLPTM-D were all lower than 10.0% (*n*=5). CONCLUSIONS: Established LC-MS/MS method has the advantages of high specificity, accuracy and reliability, and can be used to detect the concentration of CLP and its three metabolites in human plasma.

KEYWORDS LC-MS/MS; Clopidogrel; Metabolites; Plasma concentration

^Δ 基金项目:重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(Nc.cstc2016shms-ztx10004)

* 主管药师。研究方向:药理学。电话:023-68765991。E-mail: zhirui_liu2013@163.com

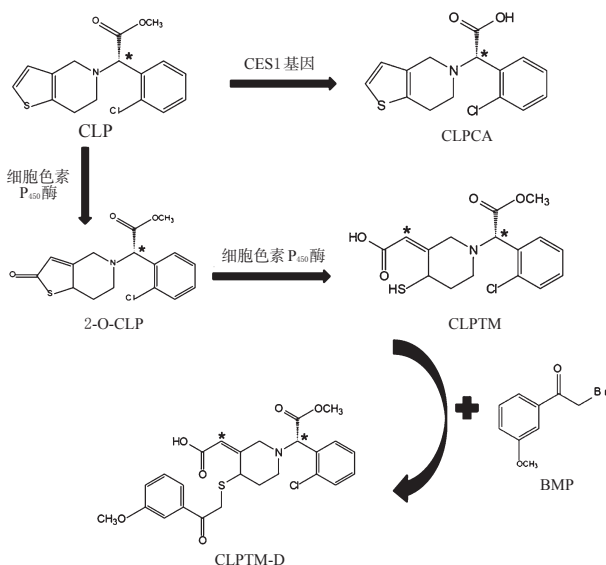
[#] 通信作者:副主任药师,博士。研究方向:治疗药物浓度监测。电话:023-68765991。E-mail: fengj_sun@163.com

氯吡格雷(Clopidogrel, CLP)是临床广泛使用的血小板受体抑制剂,主要用于脑卒中、急性冠状动脉综合征等循环障碍疾病的治疗。CLP为前体药物,本身不具活性,需经过代谢转化为活性形式才能发挥抗血小板作用。CLP经口服吸收后在肝脏内迅速代谢,其中约85%

通过羧酸酯酶(主要受CES1基因调控)水解为不具抗血小板活性的代谢产物——氯吡格雷羧酸代谢物(Clopidogrel carboxylic acid, CLPCA),余下约15%在细胞色素P₄₅₀酶的作用下依次生成中间代谢产物——2-氧-氯吡格雷(2-oxo-clopidogrel, 2-O-CLP)和活性代谢产物——氯吡格雷硫醇代谢物(Clopidogrel thiol metabolite, CLPTM),CLPTM可选择性地与血小板膜表面腺苷二磷酸受体P2Y₁₂结合从而抑制血小板的聚集^[1]。

药物体内代谢过程可能直接影响药物疗效的发挥^[2]。活性代谢产物CLPTM由于含有巯基极易被氧化,直接测定存在较大难度。Takahashi M等^[3]利用衍生化试剂2-溴-3'-甲氧基苯乙酮(2-bromo-3'-methoxyacetophenone, BMP)将CLPTM转化为相对稳定的硫醇代谢物衍生物(Derivatized clopidogrel thiol metabolite, CLPTM-D)后再测定其浓度,本研究也将采用此方法测定CLPTM的浓度。

目前国内外学者建立了多种CLP血药浓度检测方法,如文献[4-5]检测了CLP,文献[6-7]检测了2-O-CLP,文献[8-9]检测了CLPTM,文献[10-13]检测CLP及其1~2种代谢产物。但是这些研究均没有一并检测CLP及代谢产物CLPCA、2-O-CLP、CLPTM的浓度,以至于难以完全阐明CLP的体内代谢过程。因此,本研究将建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定人血浆中CLP及代谢产物CLPCA、2-O-CLP、CLPTM的浓度,以期CLP临床给药方案调整提供精准的数据支撑。CLP的体内代谢途径及CLPTM的衍生化过程见图1。



注: *代表手性中心

Note: * means chiral center

图1 CLP的体内代谢途径及CLPTM的衍生化过程

Fig 1 The *in vivo* metabolic process of CLP and the derivation of CLPTM

1 材料

1.1 仪器

LC-30 AD 超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); AB SCIEX Qtrap 5500 三重四级杆串联质谱仪(包括电喷雾离子源)和 Analyst 1.4.2 数据分析软件(美国 AB Sciex 公司); Legend Micro 17R 冷冻离心机(美国 Thermo 公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司); CPA225D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

CLP 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100819-201605,纯度:99%); 2-O-CLP 对照品(批号:2-GAB-58-1,纯度:98%); CLPCA 对照品(批号:3-YHU-79-2,纯度:98%) 和 CLPTM 对照品(批号:2-RIT-52-1,纯度:95%)均购于加拿大 TRC 公司;噻氯吡啶对照品(批号:BCBK5476V,纯度:99%)和衍生化试剂 BMP(批号:STBF4711V,纯度:98%)均购自美国 Sigma 公司;氯吡格雷片(深圳信立泰药业股份有限公司,批号:B190001,规格:75 mg);水为超纯水,乙腈和甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 受试者来源

本研究经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会审查批准,所有受试者均自愿参加并签署了知情同意书。经过严格筛选,选取90名确诊为脑卒中的患者参加试验,受试者年龄为42~75岁,半年内无内脏出血性疾病史,无严重肝、肾、心或其他疾病。

2 方法与结果

2.1 CLPTM-D的制备

2.1.1 衍生方法 在Takahashi M等^[3]研究的基础上,对CLPTM的衍生化方法进行微调。用乙腈配制得到质量浓度为2.5 mg/mL的CLPTM对照品溶液,取0.5 mL置于25 mL量瓶内,加入4 mL氯化铵溶液(100 mmol/L)和0.5 mL BMP乙腈溶液(100 mmol/L),室温下放置10 min后,用乙腈定容后得到CLPTM-D溶液,测得其质量浓度为50 μg/mL。

2.1.2 CLPTM-D的鉴定与纯度测定 将“2.1.1”项下衍生成的CLPTM-D溶液用乙腈稀释至100 ng/mL后进行LC-MS/MS分析,采用峰面积归一法计算,得到衍生物CLPTM-D的纯度为96.8%,满足定量分析要求。

2.2 溶液的制备

2.2.1 标准血浆样品的制备 取CLP、CLPCA和2-O-CLP对照品和CLPTM-D溶液适量,用乙腈溶解后得到4种待测物的贮备液。分别取贮备液适量,用空白血浆稀释至标准曲线所需浓度,其中CLPCA的质量浓度分别为100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000 ng/mL,CLP的质

量浓度分别为0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、10、20 ng/mL, 2-O-CLP的质量浓度分别为0.3、0.6、1.5、3.0、6.0、15、30 ng/mL, CLPTM-D的质量浓度分别为0.5、1.0、2.5、5.0、10、25、50 ng/mL。

2.2.2 内标溶液的制备 取噻氯吡啶对照品适量,用乙腈配制得到质量浓度为2 mg/mL的噻氯吡啶贮备液,并将其稀释至200 ng/mL作为内标溶液。

2.2.3 血浆样品溶液的制备 ①衍生化反应:取人全血4 mL至EDTA抗凝管中,迅速加入125 μ L BMP乙腈溶液(100 mmol/L),4 $^{\circ}$ C下3 000 r/min离心5 min后分离血浆。②血浆样品处理:取血浆样品100 μ L至1.5 mL EP管内,加入内标溶液20 μ L和乙腈1 000 μ L,涡旋30 s混匀,4 $^{\circ}$ C下13 000 r/min离心5 min,取上清液用0.22 μ m滤膜过滤后进行LC-MS/MS分析。

2.3 色谱条件与质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Agilent poroshell 120 EC-C₁₈(150 mm \times 3.0 mm,2.7 μ m);流动相:含0.1%甲酸的乙腈溶液-含0.1%甲酸水溶液(90:10, V/V);柱温:25 $^{\circ}$ C;进样器温度:4 $^{\circ}$ C;流速:0.35 mL/min;进样量:2 μ L。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源(ESI),多反应正离子检测模式进行定量检测;定量分析的检测离子对CLPCA质荷比(m/z)为308.1 \rightarrow 198.1,CLP m/z 为322.3 \rightarrow 212.0,2-O-CLP m/z 为338.3 \rightarrow 155.0,CLPTM-D m/z 为504.4 \rightarrow 354.1,噻氯吡啶(内标) m/z 为264.0 \rightarrow 154.1;CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D和内标的去簇电压(DP)分别为44.5、116.6、116.7、32.1、58.0 V;碰撞能量(CE)分别为23.9、22.0、34.2、24.1、25.1 eV。离子源参数设定如下,气帘气:25 psi;雾化气:40 psi;辅助加热气:60 psi;离子源温度:550 $^{\circ}$ C;离子源电压:4 000 V;碰撞活化解离设置为“Medium”。

2.4 专属性考察

取6名受试者的空白血浆,以及空白血浆加入CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D和受试者服药2 h后的血浆样品,除空白血浆不加内标外其余均按“2.2.3”项下方法处理后,进行LC-MS/MS分析。结果显示,CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D和内标的保留时间分别为2.01、3.32、2.83、2.68、1.87 min,且色谱峰峰形良好,基线平稳,血浆内源性物质及其他杂质不干扰内标和待测成分的测定,表明方法专属性良好。LC-MS/MS法的色谱图见图2。

2.5 线性关系与定量下限考察

取“2.2.1”项下不同质量浓度的CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D标准血浆样品,按“2.2.3”项下方法处理后,分别进行LC-MS/MS分析。以血浆中待测物质量浓度为横坐标(x),待测物与内标的峰面积比值为纵

坐标(y),用加权最小二乘法进行回归运算,求得回归方程。线性关系与定量下限结果见表1。

2.6 精密度与准确度考察

按“2.2.1”项下方法制备定量下限和低、中、高质量浓度4个水平的标准血浆样品,作为质控样品,其中CLPCA的质量浓度分别为100、300、5 000、8 000 ng/mL,CLP的质量浓度分别为0.2、0.6、10、12 ng/mL,2-O-CLP的质量浓度分别为0.3、0.9、15、24 ng/mL,CLPTM-D的质量浓度分别为0.5、1.5、25、40 ng/mL。再按“2.2.3”项下方法处理后,进行LC-MS/MS分析。分别考察3个分析批,每批、每个浓度5个样品。应用当日校正曲线计算各质控样品中CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D的浓度,考察批内、批间精密度和准确度。结果显示,CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D在各质量浓度水平的批内RSD在2.9%~9.5%之间($n=5$)、批间RSD在3.7%~8.9%之间($n=5$)、准确度在93.5%~98.9%之间($n=5$),均符合有关生物样品分析方法验证的要求。精密度和准确度结果见表2。

2.7 提取回收率和基质效应考察

2.7.1 提取回收率 按“2.6”项下方法制备低、中、高质量浓度的CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D质控样品,每个浓度平行制备5份,按“2.2.3”项下方法处理后,进行LC-MS/MS分析,测得待测物峰面积 A_1 ;另取空白血浆,按“2.2.3”项下方法处理后再加入相应质量浓度的对照品溶液,进行LC-MS/MS分析,测得待测物的峰面积 A_2 ,以 $A_1/A_2 \times 100\%$ 计算提取回收率。结果显示,CLPCA、CLP、2-O-CLP和CLPTM-D的提取回收率在85.4%~95.9%之间,CV均 $<8\%$ ($n=5$),表明提取方法对结果的影响小。提取回收率结果见表3。

2.7.2 基质效应 分别取6名受试者的空白血浆100 μ L,按“2.2.3”项下方法处理,取上清液,即得空白基质。向空白基质中分别加入低、高质量浓度的CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D的对照品溶液,使最终浓度与“2.6”项下低、高质量浓度的质控样品对应,每个浓度平行制备5份,进行LC-MS/MS分析,测定待测物的峰面积 A 。另制备与上述对应质量浓度的CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D对照品溶液,每个浓度平行制备5份,进行LC-MS/MS分析,测得待测物的峰面积 A' ,以 $A/A' \times 100\%$ 计算基质效应。结果显示,CLPCA、CLP、2-O-CLP和CLPTM-D的基质效应在90.3%~98.7%之间,CV均 $<7\%$ ($n=5$),表明在本方法色谱条件与质谱条件下可忽略基质效应的影响。基质效应结果见表3。

2.8 稳定性考察

按“2.6”项下方法配制低、高质量浓度的CLPCA、CLP、2-O-CLP、CLPTM-D质控样品,每个浓度平行制备5份,按“2.2.3”项下方法处理后,考察室温(25 $^{\circ}$ C)放置4

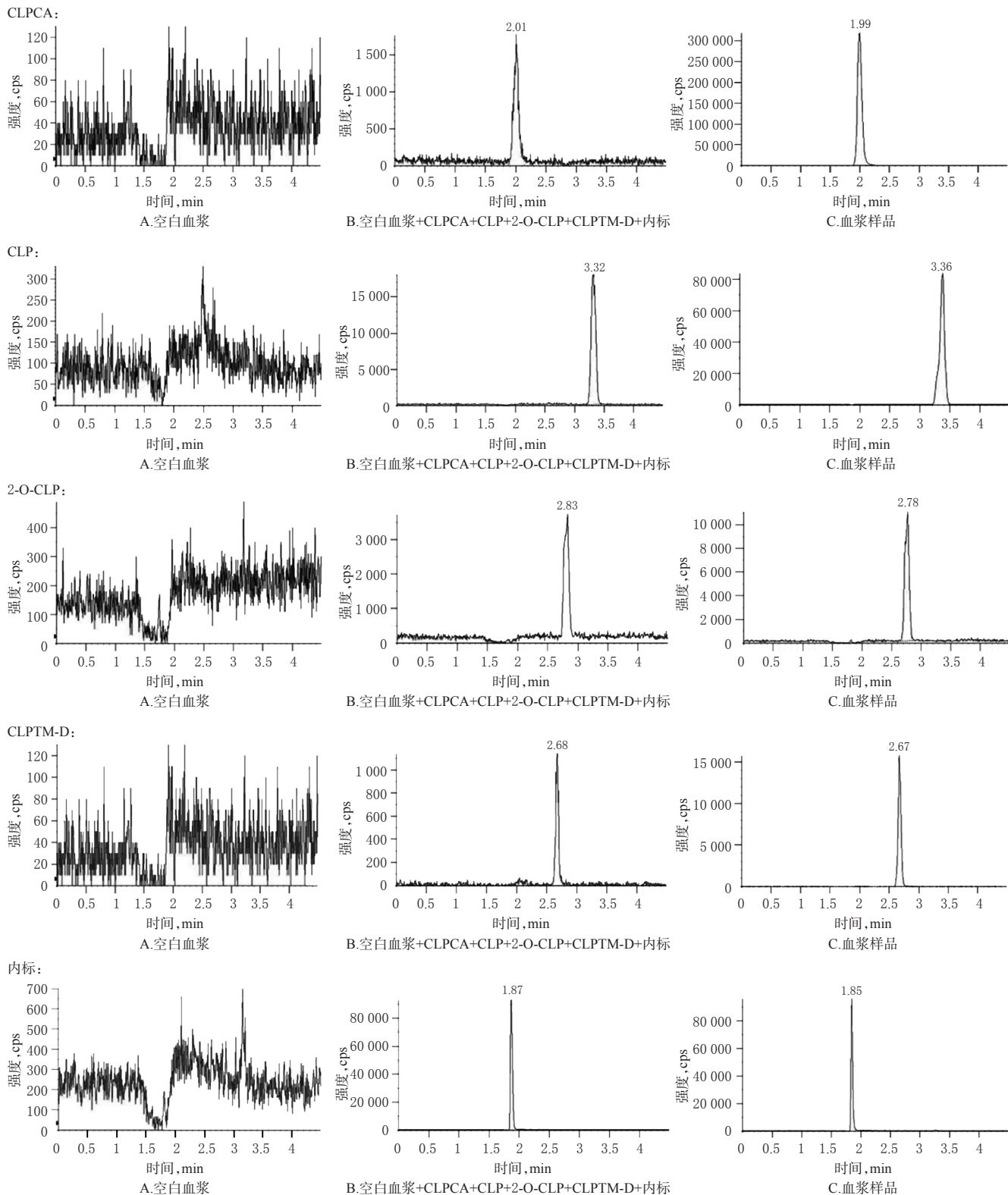


图2 LC-MS/MS法的色谱图

Fig 2 Chromatograms of LC-MS/MS method

h、-80℃冻存3个月、3次冷冻-解冻循环、4℃放置8h的稳定性。稳定性结果见表4。

由表4显示，-80℃放置3个月、3次冷冻-解冻循环、4℃放置8h条件下，CLPCA、CLP、2-O-CLP和CLPTM-D的RE均不大于10.0% (n=5)，满足生物样品

分析方法验证的要求。本研究选择在冰浴条件下4h内完成血浆样品的处理。

2.9 药动力学实验

90名受试者于给药日早上空腹口服1片氯吡格雷片(规格:75mg)，于服药2h后采集全血，按“2.2.3”项下

表1 线性关系与定量下限考察结果

Tab 1 Results of linear relations and quantitative lower limits

待测物	线性范围, ng/mL	回归方程	r	定量下限, ng/mL
CLPCA	100~10 000	y=0.000 326x-0.001 33	0.999 6	100
CLP	0.2~20	y=0.229x+0.011 2	0.999 9	0.2
2-O-CLP	0.3~30	y=0.085 7x+0.006 21	0.999 7	0.3
CLPTM-D	0.5~50	y=0.009 35x+0.000 08	0.999 5	0.5

表2 精密度和准确度结果(n=5)

Tab 2 Results of precision and accuracy tests (n=5)

待测物	理论浓度, ng/mL	实测浓度, ng/mL	批内RSD, %	批间RSD, %	准确度, %
CLPCA	100	98.74	3.5	8.4	97.7
	300	294.17	8.2	5.9	98.1
	5 000	4 732.21	5.2	4.3	94.6
	8 000	7 766.22	7.5	6.2	97.1
CLP	0.2	0.19	7.0	8.1	95.3
	0.6	0.58	2.9	4.2	96.5
	10	9.54	4.7	3.7	95.4
	16	14.96	4.9	5.5	93.5
2-O-CLP	0.3	0.30	5.5	6.1	98.9
	0.9	0.86	3.1	4.6	95.9
	15	14.30	4.9	6.0	95.3
	24	22.96	6.1	5.9	95.7
CLPTM-D	0.5	0.48	4.7	8.9	96.8
	1.5	1.47	3.4	6.7	97.8
	25	23.68	4.4	7.8	94.7
	40	37.53	9.5	7.6	93.8

表3 提取回收率和基质效应结果(n=5)

Tab 3 Results of extraction recovery and matrix effect tests (n=5)

待测物	理论浓度, ng/mL	提取回收率, %		基质效应, %	
		$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV
CLPCA	300	87.9±4.5	5.1	98.4±5.6	5.8
	5 000	85.4±2.5	2.9		
	8 000	95.0±3.6	3.8	93.5±2.6	2.7
CLP	0.6	90.5±3.5	3.9	98.7±4.1	4.3
	10	91.4±2.5	2.7		
	16	95.9±1.5	1.6	94.4±2.9	3.0
2-O-CLP	0.9	92.4±7.1	7.7	96.8±5.3	5.3
	15	86.7±1.4	1.6		
	24	91.1±2.1	2.3	98.1±5.1	5.2
CLPTM-D	1.5	84.9±3.1	3.7	91.6±6.2	6.2
	25	85.7±3.1	3.7		
	40	91.3±3.3	3.6	90.3±5.4	5.5

表4 稳定性结果(n=5)

Tab 4 Results of stability tests (n=5)

待测物	理论浓度, ng/mL	25 °C放置4h的RE, %	-80 °C放置3个月的RE, %	3次冷冻-解冻循环的RE, %	自动进样器4°C放置8h的RE, %
CLPCA	300	-0.1	3.8	-4.7	-2.9
	8 000	-3.8	6.6	3.1	-4.0
CLP	0.6	-1.6	-3.3	2.5	-3.7
	16	-2.1	1.5	1.3	-3.6
2-O-CLP	0.9	-59.4	-4.4	5.6	-10.0
	24	-61.0	-2.2	2.1	-6.7
CLPTM-D	1.5	-0.9	2	1.4	-3.6
	40	1.6	4	-2.2	-1.4

方法处理后,进行LC-MS/MS分析。受试者血浆中4种待测物的测定结果见表5。

表5 受试者血浆中4种待测物的测定结果(n=90)

Tab 5 Results of four analytes in subjects' plasma (n=90)

待测物	浓度, ng/mL
CLPCA	2 752.09±427.5
CLP	4.48±1.1
2-O-CLP	1.11±0.3
CLPTM-D	17.30±5.5

3 讨论

3.1 本研究的意义

CLP为前药,其体内代谢过程会直接影响药物疗效的发挥^[12]。有文献报道介导CLP非活性代谢产物生成的羧酸酯酶活性改变会显著影响CLP疗效^[14],即除了活性代谢产物CLPTM,非活性代谢产物CLPCA的浓度也与药物疗效密切相关。因此,为了全面、系统地考察CLP的体内代谢过程,本研究建立了测定人血浆中CLP及其3种代谢产物(包括活性代谢产物和非活性代谢产物)的LC-MS/MS方法。考虑到血浆中CLPCA的浓度远远高于另外3种待测物(浓度差异达到2~3个数量级),同时测定存在较大困难,本研究分别建立了CLPCA和CLP、2-O-CLP、CLPTM-D的检测方法。此外,为了测定4种待测物的含量,本研究选择患者服药后2h作为采血时间点,此时CLP尚未完全代谢。

3.2 前处理方法和色谱条件的优化

在建立LC-MS/MS定量分析方法时,本研究对样品处理方法、色谱柱、流动相、柱温等条件进行了系统优化。虽然液液萃取可有效去除磷脂等干扰组分,但该方法操作烦琐、费时,同时会消耗大量的有机试剂,故选择了操作简便、提取效率较为稳定的蛋白沉淀法进行样品前处理。本研究前期考察了Inertsil ODS-3(100 mm×2.1 mm, 5 μm)、Agilent SB-C₁₈(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm)、Agilent poroshell 120 EC-C₁₈(150 mm×3.0 mm, 2.7 μm)等色谱柱,结果显示Agilent poroshell 120 EC-C₁₈(150 mm×3.0 mm, 2.7 μm)色谱柱可提供更好的分离效率和更对称的色谱峰形。选择流动相中有机相时,与甲醇相比,乙腈可显著提高待测物的响应并降低噪音,因此选用乙腈作为有机相。考察发现流动相的酸度对待测物的分离和保留有显著影响,本研究通过试验发现流动相中加入0.1%甲酸可获得对称尖锐的峰形,故在有机相和水相中均添加0.1%甲酸。本研究还考察了不同柱温(20、25、30、35 °C)对色谱峰展宽和保留时间的影响,结果显示筛选的柱温对待测物的定量检测影响较小,最终选用与实验室环境温度一致的25 °C。

3.3 CLPTM-D稳定性考察

在本研究关注的4种待测物中,CLPTM由于含有游离巯基,化学性质很不稳定,易在生物基质中发生氧化,自身或与内源性巯基形成二硫键。Takahashi M等^[9]利用衍生化试剂BMP将CLPTM转化为相对稳定的衍生物后再测定其浓度,该方法目前已得到学界的广泛认可,较多的文献均采用了此方法,本研究也利用了此方法,稳定性试验显示,CLPTM的衍生物CLPTM-D含量在多个考察项下均无明显变化。

3.4 2-O-CLP稳定性考察

本研究结果和文献结果均表明2-O-CLP稳定性也较差,例如文献[15]证实2-O-CLP的硫代内酯环在活性氧存在条件下极易发生开环反应;文献[11]发现2-O-CLP降解速率与温度和时间密切相关,在室温放置60、150 min后分别降解32.3%和47.1%,冰浴下放置60、150 min后分别降解6.6%和11.4%。目前尚无公认的将2-O-CLP转化为稳定性物质的方法。综合考虑,根据国家食品药品监督管理总局对生物样品稳定性的要求,本研究在冰浴下4 h内完成血浆样品的处理以保证测量结果准确、可靠。

3.5 结语

综上所述,本研究建立的LC-MS/MS法可用于人血浆中CLPCA、CLP、2-O-CLP和CLPTM-D浓度的测定,该方法不仅特异性强、分析时间短,还解决了CLPTM和2-O-CLP不稳定的问题,为氯吡格雷体内代谢过程研究提供了试验依据,并为CLP临床给药方案调整提供了精准的数据支撑。

参考文献

[1] 李嘉欣,刘凯旋,李岩,等. ABCB1、CES1和CYP2C19基因多态性与氯吡格雷抵抗的相关性研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(11): 817-822.

[2] 黄晨蓉,许青青,缪丽燕. UPLC-MS/MS法测定人血浆中罗匹尼罗的浓度及其药动学研究[J]. 中国药房, 2017, 28(2): 177-181.

[3] 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.

[4] LIU GY, DONG CX, SHEN WW, et al. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(1): 55-63.

[5] 周文佳,张全英,宗顺麟. 液相色谱-质谱联用法测定人血浆中氯吡格雷的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32

(18): 1701-1704.

[6] LI YH, SONG M, HANG TJ. Development of an LC-MS/MS method for determination of 2-oxo-clopidogrel in human plasma[J]. *J Pharm Anal*, 2015, 5(1): 12-17.

[7] STOKANOVIC D, NIKOLIC VN, KONSTANTINOVIC SS, et al. P-glycoprotein polymorphism c3435t is associated with dose-adjusted clopidogrel and 2-oxo-clopidogrel concentration[J]. *Pharmacology*, 2016, 97(3/4): 101-106.

[8] TIAN X, YUAN Y, SU ZY, et al. Effects of Rong shuan capsule, Xue zhi kang capsule, Xin yuan capsule and Songling xue mai kang capsule on the pharmacokinetics of clopidogrel active metabolite in rats[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2017, 26(3): 187-195.

[9] 吴晖,陈新利,耿华,等. 氯吡格雷活性代谢物在人体内的血药浓度测定[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(11): 1065-1068.

[10] CROITORU O, SPIRIDON AM, BELU I, et al. Development and validation of an HPLC method for simultaneous quantification of clopidogrel bisulfate, its carboxylic acid metabolite, and atorvastatin in human plasma: application to a pharmacokinetic study[J]. *J Anal Methods Chem*, 2015. DOI: 10.1155/2015/892470.

[11] HUA W, LESSLIE M, HOFFMAN BT, et al. Development of a sensitive and fast UHPLC-MS/MS method for determination of clopidogrel, clopidogrel acid and clopidogrel active metabolite h4 in human plasma[J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(12): 1471-1482.

[12] 李鹏飞,吴诚,刘洪川,等. 氯吡格雷及其羧酸代谢物高效液相色谱-串联质谱法快速检测[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(4): 433-436.

[13] 刘帅兵,王子腾,丁肖梁,等. 液相色谱-质谱联用法测定人血浆氯吡格雷及其代谢产物药物浓度及应用[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 56-63.

[14] ZHOU JJ, CHEN SL, FAN HW, et al. CES1A-816C as a genetic marker to predict greater platelet clopidogrel response in patients with percutaneous coronary intervention [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(2): 178-183.

[15] LYNGBY JG, COURT MH, LEE PM. Validation of a method for quantitation of the clopidogrel active metabolite, clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, and 2-oxo-clopidogrel in feline plasma[J]. *J Vet Cardiol*, 2017, 19(4): 384-395.

(收稿日期:2019-06-03 修回日期:2019-09-20)

(编辑:邹丽娟)