

离体大鼠肝脏灌注法制备氯吡格雷活性巯基代谢物[△]

刘 艺*,陶 婷,刘 云,李艳丽,胡盼盼,姜艳娇,孙增先[#](徐州医科大学附属连云港医院/连云港市第一人民医院药学部,江苏连云港 222002)

中图分类号 R914;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)14-1724-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.14.11



摘要 目的 建立氯吡格雷活性巯基代谢物(CATM)的制备方法,为顺式CATM的合成提供参考。方法 以(S)-2-氧氯吡格雷为底物,采用离体大鼠肝脏灌注法和ChromCore 120 C₁₈制备柱制备并分离纯化CATM。采用质谱和核磁共振氢谱鉴定目标产物,对比人体内活性构型(顺式CATM)保留时间确认目标产物中活性构型的占比。结果 目标产物的转化率为11.71%,质谱和核磁共振氢谱鉴定目标产物为CATM。CATM的峰2~峰5为4个立体异构体,保留时间分别为21.3、22.3、26.5、27.3 min,峰面积占比分别为7.13%、7.23%、63.52%、14.97%。根据人体内CATM活性构型的保留时间为26.3 min,确定目标产物CATM中活性顺式异构体占比为63.52%。结论 本方法成本低、步骤简单,可制备出活性构型占比较高的CATM。

关键词 离体大鼠肝脏灌注;氯吡格雷;活性巯基代谢物;制备;纯化;(S)-2-氧氯吡格雷

Preparation of active thiol metabolite of clopidogrel by isolated rat liver perfusion

LIU Yi, TAO Ting, LIU Yun, LI Yanli, HU Panpan, JIANG Yanjiao, SUN Zengxian (Dept. of Pharmacy, Lianyungang Hospital Affiliated of Xuzhou Medical University/The First People's Hospital of Lianyungang, Jiangsu Lianyungang 222002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the preparation method of clopidogrel active thiol metabolite (CATM), and to provide reference for the synthesis of cis-CATM. **METHODS** CATM was prepared, separated and purified with isolated rat liver perfusion and ChromCore 120 C₁₈ preparative column, using (S)-2-oxo-clopidogrel as substrate. The target compounds were identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The retention time of the active configuration of CATM in the human body (cis-CATM) were compared to confirm the proportion of active configuration in the target product. **RESULTS** The conversion rate of the target product was 11.71%. The target products were identified as CATM by MS and ¹H-NMR. Peak 2-peak 5 of CATM were four stereoisomers. The retention time of them were 21.3, 22.3, 26.5, 27.3 min. The peak area ratios of them were 7.13%, 7.23%, 63.52%, 14.97%, respectively. Based on that retention time of the active configuration of CATM in human body was 26.3 min, the active cis-stereoisomer in the target product CATM accounted for 63.52%. **CONCLUSIONS** This method is low-cost, simple, and can prepare CATM with higher active configuration.

KEYWORDS isolated rat liver perfusion; clopidogrel; active thiol metabolite; preparation; purification; (S)-2-oxo-clopidogrel

氯吡格雷活性巯基代谢物(clopidogrel active thiol metabolite, CATM, 化学结构式见图1)是氯吡格雷发挥抗血小板疗效的最终活性物质^[1]。CATM化学结构复杂,C3—C16双键和C4位手性结构使其具有4种构型,分别为H1(7S,3E,4S)、H2(7S,3E,4R)、H3(7S,3Z,4S)、H4(7S,3Z,4R),其中H1和H2为反式CATM、H3和H4为顺式CATM^[1]。已有研究表明,人体内CATM的构型为顺式构型^[2]。目前市面上仅有反式CATM异构体H1、H2的标准品,使CATM的体内研究受限。

对CATM进行合成的现有技术中,常用的方法有化学合成法和生物酶肝微粒体催化法,其中化学合成法需

要对C3—C16双键构型和C4位手性构型进行选择,步骤复杂^[3];生物酶肝微粒体催化法具有较高的生物选择性和转化效率,但肝微粒体成本高,酶催化反应条件严苛,同时因底物量受限难以得到足够的目标代谢产物^[2]。已有研究显示,离体大鼠肝脏灌注法被广泛用于大鼠肝脏的生理、病理生理、肝损伤及药物代谢研究,兼具体外实验和整体动物实验的优点^[4-6]。本实验拟采用(S)-2-氧氯吡格雷为底物,采用离体大鼠肝脏灌注法通过代谢途径制备CATM,旨在为顺式CATM的合成提供参考。

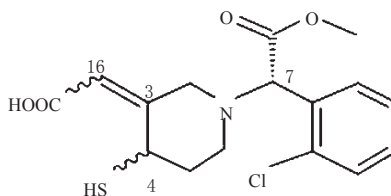


图1 CATM化学结构式

[△] 基金项目 江苏省科技基础设施建设计划项目(No.BM2018545)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:临床药代动力学。电话:0518-85767492。E-mail:liuyipharm@163.com

[#] 通信作者 主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:临床药学。电话:0518-85767492。E-mail:sunzx715@163.com

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括肝脏器官灌流仪(徐州医科大学附属连云港医院临床药理实验室设计)、AKTA pure 型蛋白纯化仪(美国 General Electric 公司)、DUC-23050-J00 型真空冷冻干燥仪(英国 GeneVac miVac 公司)、Bruker avance III HD 500 型核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)仪(德国 Bruker 公司)、Waters Acquity UPLC I Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、AB Qtrap 4500 型质谱仪(美国 AB Sciex 公司)、T1 型氮气发生器(瑞士 Gravimetrics 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

(S)-2-氧氯吡格雷(批号 20200105, 纯度 99.0%)由徐州医科大学附属连云港医院临床药理实验室自制^[7];氯化钠(批号 20220417, 纯度 99.0%)、氯化钾(批号 20160118, 纯度 99.5%)、七水合硫酸镁(批号 20190625, 纯度 99.0%)、磷酸二氢钾(批号 20190612, 纯度 99.5%)、氯化钙(批号 20181012, 纯度 96.0%)、碳酸氢钠(批号 20160219, 纯度 99.5%)、一水合葡萄糖(批号 K1925024, 纯度 98.0%)均购自国药集团化学试剂有限公司;乙酸铵(批号 E057G140, 纯度 98.0%)购自德国 CNW 公司;盐酸(批号 160112012H)购自南京化学试剂股份有限公司;肝素钠注射液(批号 52108110, 规格每 2 mL 12 500 单位)购自江苏万邦生化医药集团有限责任公司;吸入用七氟烷(批号 18120331, 规格 120 mL)购自上海恒瑞医药有限公司;硫酸氢氯吡格雷片(批号 AA976, 规格 75 mg)购自赛诺菲(杭州)制药有限公司;氘代二甲基亚砜(批号 296147, 同位素纯度 99.9%)购自美国 Sigma 公司;乙腈、甲醇(均为色谱纯)均购自德国 Merck 公司,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

SPF 级雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠 2 只,体质量 200~250 g,由南通大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(苏)2019-0001,使用许可证号为 SYXK(苏)2018-0026。大鼠在自然昼夜照明、相对湿度 40%~70%、温度 12~26 ℃ 的环境下饲养,自由饮水、进食(普通维持饲料)。

1.4 受试者

招募 1 名长期服用氯吡格雷的男性稳定期冠脉综合征受试者(75 mg 维持剂量),受试者试验前被告知试验方案与目的,并签署知情同意书。试验方案经徐州医科大学附属连云港医院伦理委员会批准,批件号为

LW-20220309001-01。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 Krebs-Henseleit 碳酸氢盐缓冲液 按 Krebs-Henseleit 碳酸氢盐缓冲液(K-H 液)的经典配方(118 mmol/L 氯化钠,4.7 mmol/L 氯化钾,1.2 mmol/L 七水合硫酸镁,1.2 mmol/L 磷酸二氢钾,2.5 mmol/L 氯化钙,25 mmol/L 碳酸氢钠^[8]),再以终浓度为 10 mmol/L 的葡萄糖作为能量来源进行配制,具体操作如下:取氯化钠 6.89 g、氯化钾 0.35 g、七水合硫酸镁 0.30 g、磷酸二氢钾 0.16 g、碳酸氢钠 2.10 g、一水合葡萄糖 1.98 g、氯化钙 0.27 g,用双蒸水溶解,并定容至 1 000 mL,再用盐酸调 pH 至 7.35~7.45,经 0.22 μm 滤膜滤过,现配现用。

2.1.2 (S)-2-氧氯吡格雷灌流液 将(S)-2-氧氯吡格雷 0.008 g 充分溶解于 3 mL 乙腈中,再加入至 297 mL K-H 液中,混匀即得。

2.2 灌流方法

根据 Wang 等^[9]和 Ferrigno 等^[10]报道的方法加以改进,具体操作如下:SD 大鼠术前禁食 12 h,不禁水,用七氟烷维持吸入麻醉,沿腹直线打开腹腔,将内脏轻轻横置,暴露门静脉、下腔静脉(腹腔段),迅速于门静脉注入 100 单位肝素抗凝并插管固定,用提前预热至 37 ℃ 的 K-H 液以 10 mL/min 的流速冲洗肝脏残血;剪开下腔静脉(腹腔段),沿腹腔中线往上剪开胸腔,分出下腔静脉(胸腔段)并插管作为灌流液的流出管,同时结扎下腔静脉(腹腔段),形成灌流通路;迅速将完整的肝脏分离出来,转移至 37 ℃ 的灌流室中,待肝脏残血冲洗干净后,换 80 μmol/L 的(S)-2-氧氯吡格雷灌流液。灌流方式为非循环灌流。

2.3 CATM 和(S)-2-氧氯吡格雷定性定量分析的色谱与质谱条件

采用超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography tandem mass, UPLC-MS/MS)法进行测定。色谱条件如下:以 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)为色谱柱,以 10 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相 A、乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速为 0.25 mL/min;柱温为 40 ℃;进样室温度为 4 ℃;进样量为 2 μL。质谱条件如下:采用电喷雾离子源;采用多反应监测模式扫描母离子,增强子离子模式扫描碎片离子,正离子方式检出;气帘气(N₂)压力为 10 psi;碰撞气模式为 High;离子化电压为 5 500 V;温度为 200 ℃;喷雾气(N₂)压力为 30 psi;辅助加热气(N₂)压力为 30 psi;CATM、(S)-2-氧氯吡格雷的

定性离子对分别为 m/z 356.1→356.1、 m/z 338.1→338.1；去簇电压分别为 70、175 V；扫描时间均为 100 ms；碰撞能量均为 5 eV。

表1 CATM和(S)-2-氧氯吡格雷定性定量分析的梯度洗脱程序

时间/min	流动相A/%	流动相B/%	时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	83	17	23	70	30
8	83	17	28	0	100
9	80	20	30	0	100
18	80	20	32	83	17
19	70	30	34	83	17

2.4 CATM分离纯化的色谱条件

以ChromCore 120 C₁₈制备柱(10 mm×50 mm, 5 μm)为色谱柱,以水为流动相A、乙腈为流动相B进行梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速为 1 mL/min;进样量为 100 mL。

表2 CATM分离纯化的梯度洗脱程序

时间/min	流动相A/%	流动相B/%	时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	97	3	75.00	55	45
45.00	97	3	75.01	0	100
45.01	55	45	85.00	0	100

2.5 CATM的制备

取 80 μmol/L 的(S)-2-氧氯吡格雷灌流液 300 mL,按“2.2”项下方法以约 3.3 mL/min 的流速进行 90 min 的非循环灌流,制备CATM。收集灌流液,经 0.22 μm 水系滤膜滤过,按“2.4”项下方法进行分离纯化,每间隔 1 min 富集纯化后的洗脱物;再按“2.3”项下方法进样,验证洗脱物组分,确定目标组分的时间收集范围;富集目标组分,冷冻干燥后,称定质量,以最终获得CATM的物质的量与灌流液中(S)-2-氧氯吡格雷的物质的量之比计算转化率。

2.6 CATM的鉴定

2.6.1 质谱鉴定 取“2.5”项下制备的目标产物,用 50% 甲醇溶解稀释成 500 ng/mL,在正离子模式下,针泵进样,流速为 7 μL/min;在母离子全扫描模式下的扫描范围为 350~360 Da,扫描速度为 10 Da/s,扫描时间为 5 min,分别确定目标产物母离子质荷比,并得最佳去簇电压值;在子离子扫描模式下的初始碰撞能为 10 eV,以 5~10 eV 为步长调节,扫描速度为 200 Da/s,扫描时间为 5 min,获得子离子信息。

2.6.2 NMR 谱鉴定 以氘代二甲基亚砜[核磁共振氢谱(¹H-NMR)为 2.50 ppm]为溶剂分别测定目标产物的¹H-NMR 谱和重水交换谱。将各氢信号分类编号汇总并依据NMR命名法(化学位移、氢分布、峰分裂数)对分子的单个质子氢信号进行共振分配,通过重水交换谱验证活泼氢信号。

2.7 CATM中4种立体异构体相对纯度的测定

取 500 ng/mL 目标产物,按“2.3”项下方法进行进样分析,按归一化法计算其相对纯度。

2.8 顺式CATM保留时间的确定

受试者口服氯吡格雷后 1 h,采集前臂静脉血 2 mL,置于肝素抗凝管中,即刻以 4 000×g 离心 10 min,取上层血浆 50 μL,加入乙腈 250 μL,涡旋振荡 5 min,再以 12 000×g 离心 5 min,取上清液吹干后,以“2.3”项下初始比例的流动相复溶,取 10 μL,按“2.3”项下方法进行进样分析。

3 结果

3.1 CATM的制备情况

80 μmol/L 的(S)-2-氧氯吡格雷经过 2 次离体大鼠肝脏灌流生物转化,得灌流液 580 mL,经分离纯化得目标产物 2 mg,即 48 μmol 的(S)-2-氧氯吡格雷生物转化得 5.62 μmol 的目标产物,转化率为 11.71%。分离纯化后的洗脱液中目标组分的色谱图(图2A)显示,有 4 个峰分别在 21.5、22.6、26.7、27.9 min 时被洗脱,其相应质谱图较为相似(图2B),显示主要碎片离子为 m/z 155.2、182.8、212.1、296.1,与研究报道类似^[11-12],可确认这 4 个峰为CATM的 4 个立体异构体。

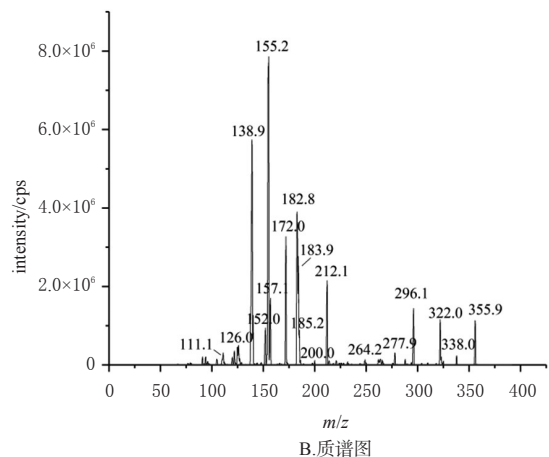
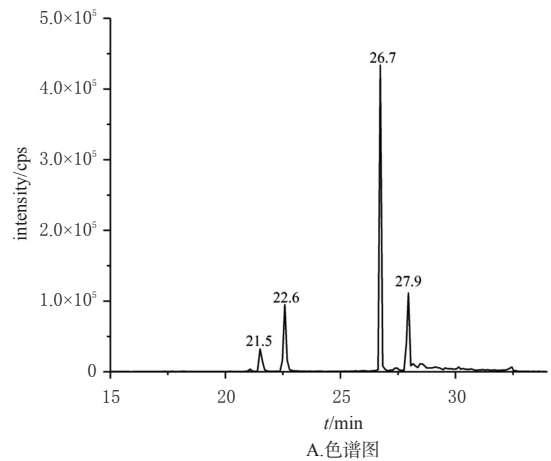


图2 分离纯化后目标组分的色谱图和质谱图

3.2 目标产物的质谱鉴定结果

目标物质谱优化后的最佳去簇电压为 60 V, 碰撞能量为 29 eV, 观察到母离子为 m/z 356.1, 358.1, 分别为 ^{35}Cl 和 ^{37}Cl 的同位素峰, 峰高比约为 3:1 (图 3A); 主要碎片离子为 m/z 154.8、183.0、212.0、322.0 (图 3B), 确认目标产物为 CATM^[11-12]。目标产物的裂解示意图见图 4。

3.3 目标产物的 NMR 谱鉴定结果

目标产物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱和重水交换谱见图 5。结果显示, 7.35~7.57 (4H, m) 为邻位取代苯环上氢信号; 5.90 (1H, s) 为烯氢信号; 12.24 (1H, brs)、3.05 (1H, s) 为活泼氢信号, 重水交换后消失; 3.63 (3H, s) 为甲氧基氢信号; 4.71 (1H, m) 为连氮原子上次甲基氢信号; 2.90~2.56 (2H, m)、2.09~1.68 (2H, m)、3.81~3.86 (1H, m)、3.81~3.86 (2H, m) 为连氮原子上亚甲基及连硫原子上次甲基氢信号; 8.32 (0.2H, s)、5.20 (1H, s)、1.91 (0.4H, s)、7.35~7.57 (1H, m) 为其他杂质上氢信号, 确认目标产

物为 CATM^[2]。目标产物的 $^1\text{H-NMR}$ 结果见表 3 (由于纯化的化合物量不足, 未获得 CATM 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图)。

3.4 CATM 中 4 个立体异构体的相对纯度

CATM 的峰 1~峰 5 的保留时间分别为 10.7、21.3、22.3、26.5、27.3 min, 峰面积占比 (相对纯度) 分别为 7.14%、7.13%、7.23%、63.52%、14.97%, 其中峰 2~峰 5 为 CATM 的 4 个立体异构体。CATM 的 UPLC-MS/MS 色谱图见图 6。

3.5 CATM 活性构型保留时间的确认及目标产物的纯度分析

受试者体内 CATM 的色谱图 (图 7) 显示其只有 1 个主要色谱峰, 保留时间为 26.3 min, 其为人体内的顺式 CATM^[2]。结合“3.4”项下结果可知, 目标产物 CATM 中保留时间为 26.3 min 左右 (即 26.5 min) 的色谱峰峰面积占比较高 (约 63.52%), 即目标产物 CATM 中含有较高的顺式 CATM。

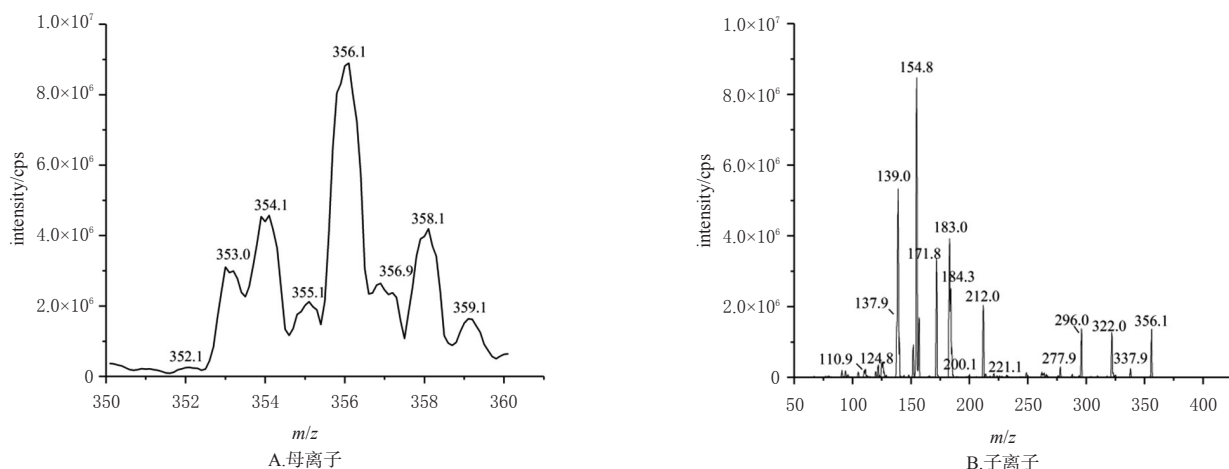
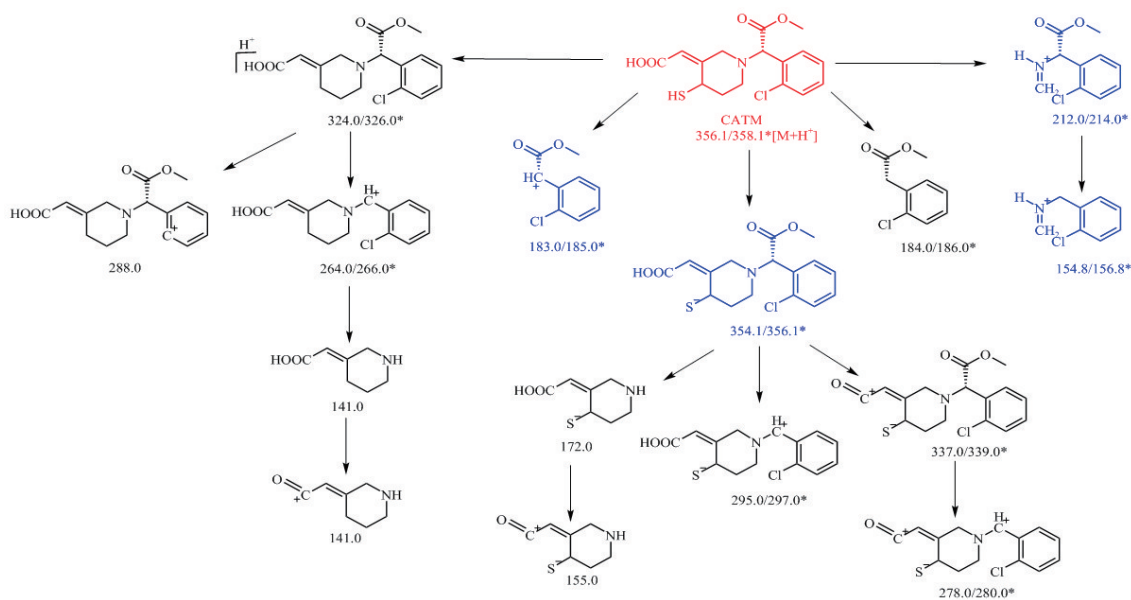


图 3 目标产物的母离子和子离子质谱图



注: 红色结构表示母离子, 蓝色结构表示主要碎片离子, *表示同位素

图 4 目标产物的裂解示意图

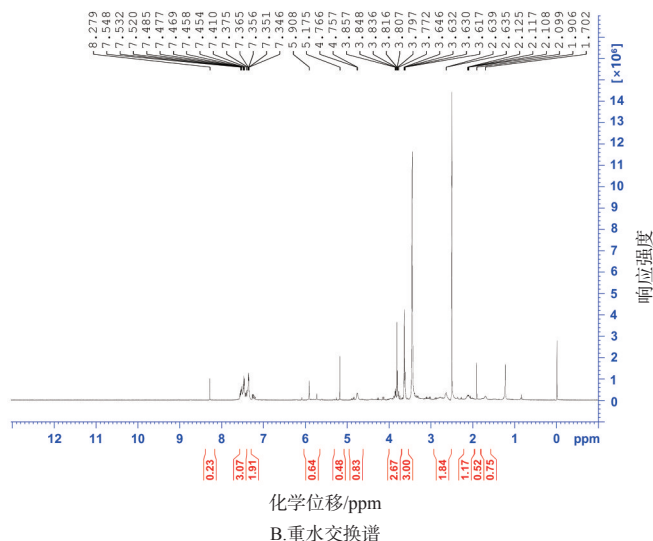
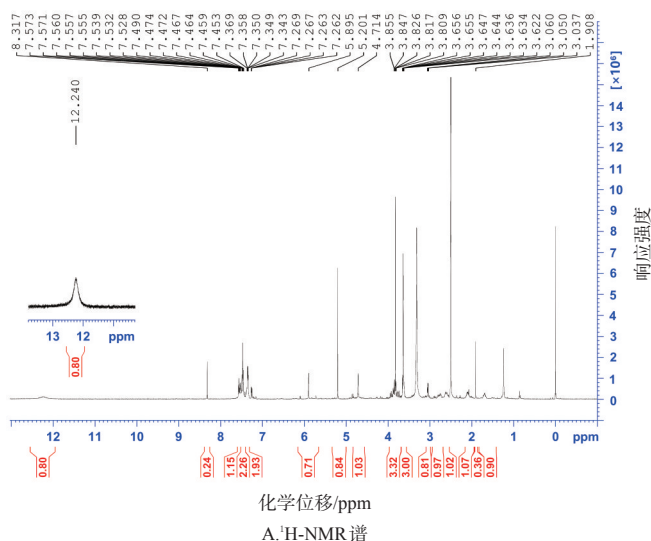


图5 目标产物的¹H-NMR谱和重水交换谱

表3 目标产物CATM的¹H-NMR结果(δ/ppm)

编号	¹ H-NMR	编号	¹ H-NMR
1~4	7.35~7.57(4H,m)	10	3.81~3.86(2H,m)
5	4.71(1H,m)	11	3.63(3H,s)
6	2.90~2.56(2H,m)	OH	12.24(1H,brs)
7	2.09~1.68(2H,m)	SH	3.05(1H,s)
8	3.81~3.86(1H,m)	其他	8.32(0.2H,s), 5.20(1H,s), 1.91(0.4H,s), 7.35~7.57(1H,m)
9	5.90(1H,s)		

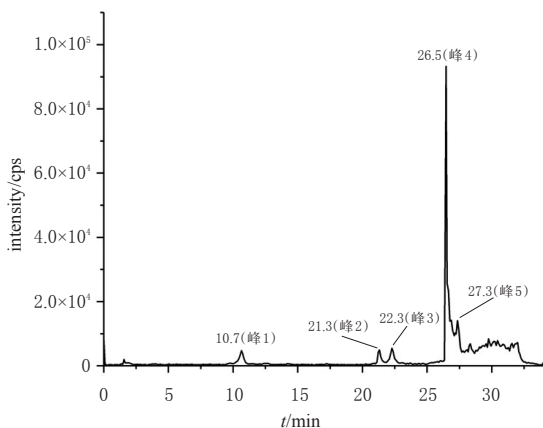


图6 CATM的UPLC-MS/MS色谱图

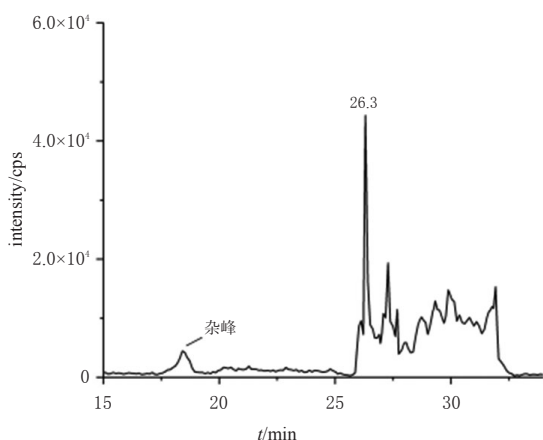


图7 受试者体内CATM的UPLC-MS/MS色谱图

4 讨论

4.1 质谱条件

因为CATM各立体异构体的标准品尚无法商购,不能获得其母离子和子离子信息,所以在UPLC-MS/MS法中将母离子和子离子均设为母离子的质荷比,碰撞能量设为5 eV。该方法可以使母离子尽量在四极杆的子离子通道内以原型存在,随后通过离子阱对该母离子进行裂解,得到相应的质谱图,以便进行CATM各构型的鉴定。

4.2 CATM制备纯化方法

CATM结构中的巯基基团化学性质活泼,使其制备纯化较为困难。在进行C₁₈制备柱纯化之前,根据观察,所得到的CATM灌流液难以保存,经0.22 μm滤膜滤过后得到的澄清液体,在-80 °C仅能保存7 d左右,故灌流结束后应尽快对其中的目标产物进行分离纯化,并且制备过程中的每个操作都应尽量在4 °C和避光环境下进行,以防止其失活。在分离纯化过程中,将灌流得到的含CATM的灌流液在AKTA pure型蛋白纯化仪上以流动相的方式上样100 mL,分6次通过C₁₈制备柱分离纯化,首先以97%的水相除去灌流液体系中的无机盐,随后通过55%的水相等度洗脱CATM,最后以100%的有机相等度洗脱色谱柱中残留的(S)-2-氧氯吡格雷,洗脱收集时间范围为57~64 min。

CATM的转化率为11.71%,转化率受以下因素影响:(1)灌流液在肝组织和灌流管路中存在损失;(2)(S)-2-氧氯吡格雷未充分转化;(3)CATM可能以其他结合形式存在;(4)CATM在制备纯化过程中因结构不稳定造成损失。本研究中,图6与图2A相比,色谱峰的峰形较差,其原因与色谱柱柱效降低有关。本研究通过对

比人体内CATM活性构型的保留时间并结合文献[2]分析,确定目标产物CATM中保留时间为26.5 min的色谱峰为活性构型顺式CATM,再结合“3.4”项下结果可知,目标产物CATM中活性构型顺式CATM的占比最高。

综上所述,本研究以(S)-2-氧氯吡格雷为底物,采用离体大鼠肝脏灌注法生物转化和C₁₈制备柱分离纯化获得目标产物,转化率为11.71%;经质谱和NMR谱鉴定目标产物为CATM,其中顺式CATM的占比较高。该方法具有成本低、步骤较为简单的优点,但同时也存在实验操作技术要求较高的缺点。

参考文献

- [1] SAVI P, PEREILLO J M, UZABIAGA M F, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel[J]. *Thromb Haemost*, 2000, 84(5): 891-896.
- [2] LIU C, LU Y, SUN H, et al. Development and validation of a sensitive and rapid UHPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of the common active and inactive metabolites of vicagrel and clopidogrel in human plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 149: 394-402.
- [3] 杨慧, 马宇衡, 牧童, 等. 氯吡格雷活性代谢物衍生物, 其前药及其制备方法与应用: CN111848497A[P]. 2020-10-30.
- [4] SHIMADA S, FUKAI M, SHIBATA K, et al. Heavy water (D₂O) containing preservation solution reduces hepatic cold preservation and reperfusion injury in an isolated perfused rat liver (IPRL) model[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(11): 1818.
- [5] HSU S H, CHENG A C, CHANG T Y, et al. Precisely adjusting the hepatic clearance of highly extracted drugs using the modified well-stirred model[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 141: 111855.

- [6] NEYSHABURINEZHAD N, ROUINI M R, ENTEZARI H, et al. Evaluation of changes in cytochrome P₄₅₀ 2C19 activity in type 2 diabetic rats before and after treatment, by using isolated perfused liver model[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(5): 629-635.
- [7] 王添艳, 刘云, 李艳丽, 等. (S)-2-氧氯吡格雷的合成新方法[J]. *中国药物化学杂志*, 2020, 30(7): 416-418, 427.
- [8] CAMPOS R, PINHEIRO D H A, BRITTO-JÚNIOR J, et al. Quantification of 6-nitrodopamine in Krebs-Henseleit's solution by LC-MS/MS for the assessment of its basal release from *Chelonoidis carbonaria* aortae *in vitro*[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, 1173: 122668.
- [9] WANG H J, BENET L Z. Protein binding and hepatic clearance: re-examining the discrimination between models of hepatic clearance with diazepam in the isolated perfused rat liver preparation[J]. *Drug Metab Dispos*, 2019, 47(12): 1397-1402.
- [10] FERRIGNO A, RICHELMI P, VAIRETTI M. Troubleshooting and improving the mouse and rat isolated perfused liver preparation[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 67(2): 107-114.
- [11] ZHANG H M, LAU W C, HOLLENBERG P F. Formation of the thiol conjugates and active metabolite of clopidogrel by human liver microsomes[J]. *Mol Pharmacol*, 2012, 82(2): 302-309.
- [12] TUFFAL G, ROY S, LAVISSE M, et al. An improved method for specific and quantitative determination of the clopidogrel active metabolite isomers in human plasma[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(4): 696-705.

(收稿日期:2022-03-11 修回日期:2022-06-13)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅