

硫酸氢氯吡格雷片在 PCI 术后患者体内的药动学研究

侯文洁, 张亮, 丁红梓, 王洁, 周秋云

南京市胸科医院 药学部, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定人血清中氯吡格雷及其羧酸代谢物 SR26334, 研究硫酸氢氯吡格雷片在 PCI 术后患者体内的药动学情况。方法 采用 CLC-ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸溶液 (60:40); 检测波长: 235 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样体积 10 μL。收集到 7 例 PCI 术后口服硫酸氢氯吡格雷片 75 mg/d 超过 7 d 的患者, 在当天早上服药后 0、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、16、24 h 从静脉采血, 检测氯吡格雷和 SR26334 的血药浓度, 制备平均药时曲线, 使用 DSA 2.0 计算氯吡格雷和 SR26334 的药动学参数。结果 氯吡格雷、SR26334 在 0.2~8 μg/mL 线性关系良好, 定量限均为 0.2 μg/mL。绝对、相对回收率均大于 80%, 日内、日间精密度的 RSD 值均小于 5%。氯吡格雷、SR26334 的 C_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 分别为 (65±0.57)、(0.77±0.22) μg/mL, (3.02±0.69)、(2.88±0.48) h, (7.66±3.65)、(8.52±3.37) h。结论 本方法简便、快速, 适用于硫酸氢氯吡格雷片血药浓度的临床监测。

关键词: 硫酸氢氯吡格雷片; 氯吡格雷; SR26334; 药动学; 血药浓度; 高效液相色谱

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)03-0451-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.03.002

Pharmacokinetic study of Clopidogrel Sulfate Tablets in patients after PCI

HOU Wen-jie, ZHANG Liang, DING Hong-zi, WANG Jie, ZHOU Qiu-yun

Department of Pharmacy, Nanjing Chest Hospital, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of clopidogrel and its carboxylic acid (SR26334) in human serum, and study pharmacokinetics of Clopidogrel Sulfate Tablets in patients after PCI. **Methods** HPLC-UV method was adopted on CLC-ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.1% formic acid solution (60 : 40). The detection wavelengths were 235 nm. The flow rate was 1 mL/min, and the column temperature was set at 40 °C with injection volume of 10 μL. Seven cases administered with Clopidogrel Bisulfate Tablets 75 mg/d more than 7 d after PCI were collected. After taking drugs in the morning, the blood samples were collected from venous blood after 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, and 24 h, and the blood concentrations of clopidogrel and SR26334 were detected. The average time curve was prepared. The pharmacokinetic parameters of clopidogrel and SR26334 were calculated by DSA soft. **Results** A good linearity was shown in the concentration ranges of 0.2 — 8 μg/mL for clopidogrel and SR26334 with quantitative limits of 0.2 μg/mL. The absolute recovery and relative recoveries were all above 80%. The inter-day or intra-day precisions were less than 5%. C_{max} , t_{max} , and $t_{1/2}$ for clopidogrel and SR26334 were (65 ± 0.57), (0.77 ± 0.22) μg/mL, (3.02 ± 0.69), (2.88 ± 0.48) h, and (7.66 ± 3.65), (8.52 ± 3.37) h, respectively. **Conclusion** This method is simple and quick, which is suitable for clinical monitoring for the serum concentration of Clopidogrel Bisulfate Tablets.

Key words: Clopidogrel Sulfate Tablets; clopidogrel; SR26334; Pharmacokinetics; serum concentration; HPLC

氯吡格雷是噻吩并吡啶类的二磷酸腺苷受体拮抗剂, 用于预防 PCI 术后患者发生 ST 段抬高或非 ST 段抬高导致的血栓^[1-3]。氯吡格雷是没有活性的前药, 需经过生物代谢才能转换为可以起效的活性物质^[4-5]。据不完全统计, 20%~30%的患者在服用氯吡格雷后疗效较差甚至无效。氯吡格雷和活性产

物之间需要经过 CYP2C19、PON-1 等酶的 2 步转换, 其中仅 15% 被转化为有活性的巯基代谢物; 而 85% 被转化为无活性的羧酸代谢物 SR26334^[6]。由于巯基代谢物在体内极不稳定, 很快就被降解。因此, 通过测定体内氯吡格雷和 SR26334 的浓度来了解患者体内氯吡格雷变化情况更为方便和可行。本研究

收稿日期: 2017-07-03

作者简介: 侯文洁, 女, 硕士, 研究方向为临床药学。Tel: (025)58619845 E-mail: houwj121218@163.com

采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定血清中氯吡格雷和 SR26334 的浓度, 考察 PCI 术后口服硫酸氢氯吡格雷片常规剂量超过 7 d 的患者体内的药动学情况, 为血药浓度的临床监测提供参考。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-20AB 高效液相色谱系统, SPD-M20A 检测器; EB224 电子分析天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); TG1650-WS 高速离心机 (上海卢湘仪); 氯吡格雷对照品 (中国食品药品检定研究院, 质量分数 95.0%); SR26334 (Toronto Research Chemicals Inc, 质量分数 98.0%); 茶碱 (中国食品药品检定研究院, 质量分数 95.0%); 乙腈 (德国 Merck) 为色谱纯, 甲酸 (国药集团) 为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

CLC-ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.1% 甲酸溶液 (60:40); 检测波长: 235 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样体积 10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 内标溶液 精密称取茶碱对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈 - 水 (50:50) 溶解并加至刻度, 制备 1 mg/mL 的内标储备液。再精密量取该储备液适量, 用乙腈稀释制成 10 μg/mL 的内标溶

液, 备用。

2.2.2 氯吡格雷对照品溶液 精密称取氯吡格雷对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈 - 水 (50:50) 溶解并加至刻度, 制备 1 mg/mL 氯吡格雷对照品储备液。精密量取该储备液适量, 用乙腈稀释制成 0.6、1.2、1.8、2.4、3、6、12、24 μg/mL 的氯吡格雷对照品溶液。

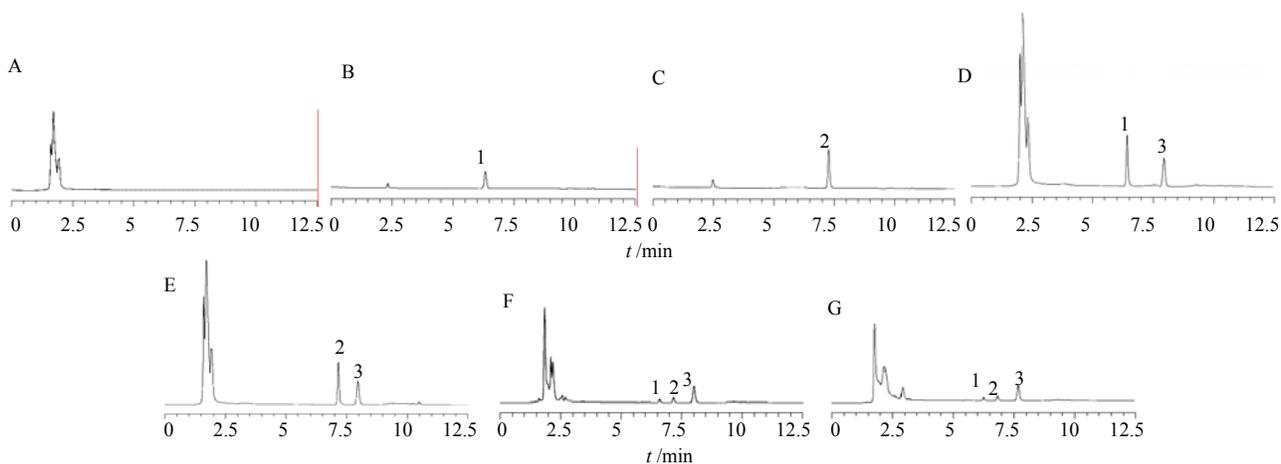
2.2.3 SR26334 对照品溶液 精密称取 SR26334 对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈 - 水 (50:50) 溶解并加至刻度, 制备 1 mg/mL SR26334 对照品储备液。精密量取该储备液适量, 用乙腈稀释制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、4、8 mg/mL 的 SR26334 对照品溶液。

2.3 样品处理

取血清样品 300 μL, 置 1.5 mL 离心管中, 加内标溶液 900 μL, 涡旋振荡 30 s, 15 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 10 μL, 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.4 专属性试验

取氯吡格雷、SR26334 对照品溶液和内标溶液直接进样; 取空白血清、给药后 1.5 h 的血清样品, 按样品处理项下方法操作并进样测定, 记录色谱图。结果显示, 在选定的色谱条件下, 血清中内源性物质对测定没有干扰; 待测样品与内标茶碱分离完全, 保留时间分别为 6.3、7.2 min, 色谱图见图 1。



A-空白血浆 B-氯吡格雷对照品 C-SR26334 对照品 D-空白血浆+氯吡格雷对照品+内标茶碱 E-空白血浆+SR26334 对照品+内标茶碱
F-空白血浆+氯吡格雷对照品+SR26334 对照品+内标茶碱 G-患者血浆 1-氯吡格雷 2-SR26334 3-内标茶碱
A-blank plasma B-clopidogrel reference substance C-SR26334 reference substance D-plasma sample with clopidogrel and internal standard
E-plasma sample with SR26334 and internal standard F-plasma sample with clopidogrel, SR26334, and internal standard G-patient plasma
1-clopidogrel 2-SR26334 3-internal standard theophylline

图 1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.5 线性关系考察

取 16 份空白血清, 各 200 μL 。8 份加入氯吡格雷对照品溶液 100 μL ; 8 份加入 SR26334 对照品溶液 100 μL , 制成质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、6、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的模拟血清样品, 按样品处理项下方法操作。以目标成分峰面积与内标峰面积之比为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程。氯吡格雷 $Y=0.063X-0.018(r^2=0.9990)$, 在 0.2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好; SR26334 $Y=0.202X+0.15(r^2=0.9990)$, 在 0.2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。两个组分的定量限均为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 回收率试验

制备质量浓度分别为 0.4、1.0、7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯吡格雷和 SR26334 血清质控样品, 每个质量浓度平行各制备 5 份, 按样品处理项下方法操作并测定, 记录峰面积。以血清质控样品的色谱响应值与等质量浓度对照品溶液的色谱响应值之比作为提取回收率, 以血清质控样品的计算质量浓度除以制备质量浓度作为方法回收率。结果见表 1。

2.7 精密度试验

制备质量浓度分别为 0.4、1.0、7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯吡格雷和 SR26334 血清质控样品, 分别按样品处理

项下方法操作, 于 1 d 内处理并测定 5 次, 考察日内 RSD 值; 连续 5 d, 每天处理并测定 1 次, 考察日间 RSD 值。结果见表 2。

2.8 稳定性试验

制备 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯吡格雷和 SR26334 血清质控样品各 3 份, 考察样品在低温保存、反复冻融、处理后在室温条件下的稳定性。结果显示, 在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存 20 d、反复冻融 3 次、处理后于室温放置 8 h 后氯吡格雷模拟血清样品的 RSD 值分别为 0.42%、0.87%、0.68%; SR26334 模拟血清样品的 RSD 值分别为 0.88%、0.96%、0.62%。结果表明上述条件下氯吡格雷和 SR26334 在血清中的稳定性良好。结果见表 3。

2.9 患者血药浓度检测

从心内科住院病房共收集到 7 例 PCI 术后口服硫酸氢氯吡格雷片[赛诺菲(杭州)制药有限公司, 规格 75 mg/片]常规剂量(75 mg/d)超过 7 d 的患者, 患者在当天早上服药后 0、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、16、24 h 从静脉采血 4 mL, 检测氯吡格雷和 SR26334 的血药浓度, 平均药时曲线见图 2、3。使用 DSA 2.0 计算氯吡格雷和 SR26334 的药动学参数, 见表 4。

表 1 回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Results of recovery tests ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	绝对回收试验		相对回收试验	
		绝对回收率/%	RSD/%	相对回收率/%	RSD/%
氯吡格雷	0.4	83.98 \pm 0.30	3.6	81.67 \pm 0.15	1.8
	1.0	87.24 \pm 0.16	1.8	92.59 \pm 0.08	8.1
	7.0	92.52 \pm 0.14	1.5	93.82 \pm 0.06	6.7
SR26334	0.4	84.78 \pm 0.13	1.5	86.38 \pm 0.03	3.8
	1.0	85.92 \pm 0.10	1.1	88.52 \pm 0.05	5.5
	7.0	91.75 \pm 0.10	1.1	95.66 \pm 0.03	2.8

表 2 精密度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Results of precision tests ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内精密度试验		日间精密度试验	
		测得质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	测得质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%
氯吡格雷	0.4	0.387 \pm 0.016	4.5	0.381 \pm 0.011	2.7
	1.0	0.936 \pm 0.012	1.3	0.929 \pm 0.008	0.9
	7.0	6.874 \pm 0.008	1.2	6.836 \pm 0.029	0.4
SR26334	0.4	0.392 \pm 0.008	2.2	0.039 \pm 0.001	4.6
	1.0	0.955 \pm 0.021	2.1	0.942 \pm 0.021	2.2
	7.0	6.939 \pm 0.039	0.6	6.861 \pm 0.123	1.8

表3 稳定性试验结果

Table 3 Results of stability tests

成分	低温保存		反复冻融		室温 8 h	
	测得质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测得质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%
氯吡格雷	0.772±0.003	4.2	0.756±0.006	8.7	0.791±0.005	6.8
SR26334	0.767±0.070	8.8	0.774±0.007	9.6	0.785±0.005	6.2

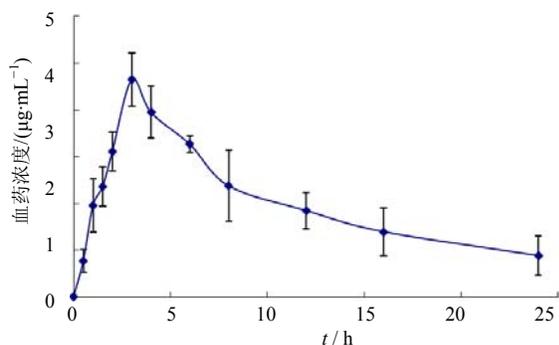


图2 口服硫酸氢氯吡格雷片后氯吡格雷的平均药时曲线
Fig. 2 Average concentration-time curve of clopidogrel after *po* administration with Clopidogrel Sulfate Tablets

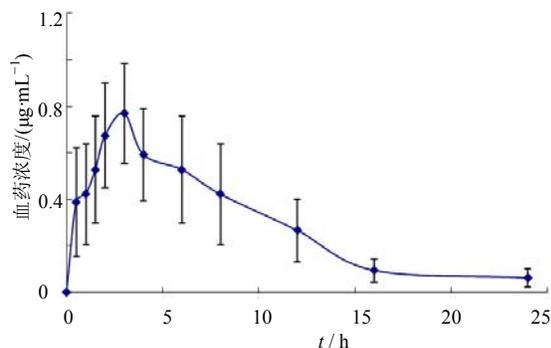


图3 口服硫酸氢氯吡格雷片后 SR26334 的平均药时曲线
Fig. 3 Average concentration-time curve of SR26334 after *po* administration with Clopidogrel Sulfate Tablets

表4 口服硫酸氢氯吡格雷片后的药动学参数 (n = 7)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of patients after *po* administration with Clopidogrel Sulfate Tablets (n = 7)

参数	单位	氯吡格雷	SR26334
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4.65±0.57	0.77±0.22
t_{max}	h	3.02±0.69	2.88±0.48
$t_{1/2}$	h	7.66±3.65	8.52±3.37
AUC_{0-t}	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	13.47±4.56	3.56±1.74
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	14.41±4.36	3.85±1.63

3 讨论

由于氯吡格雷的活性代谢产物有巯基, 在体内很快就会被氧化, 使用普通的方法难以准确测定。已有的报道都是将其衍生化后再进行检测^[7-8]。而衍生化过程繁琐, 操作复杂, 故很难保证可以准确定量。所以可以通过定量检测氯吡格雷与其无活性产物 SR26334 来判断体内代谢过程。由于这两个物质在血清中的浓度较低, 同时测定一般会选择灵敏度较高的 LC-MS^[9-11], 而使用 HPLC 进行分析的未见报道。由于这两者母核相同, 氯吡格雷是酯类物质, SR26334 是羧酸类物质。所以方法的关键在于 pH 值的调整。实验尝试了 3 种不同 pH 值的磷酸缓冲盐 (5.7、4.8、4) 与甲醇的组合, 发现随着 pH 值的降低, 两种物质的分离度越来越高, 但是拖尾现象比较严重。分析原因可能是甲醇的洗脱能力比较弱, 造成了峰形的改变。在更换为 pH 4 磷酸缓冲盐与乙腈后, 拖尾现象有明显好转。为了进一步优化方法, 考虑了使用缓冲盐可能会带来一些问题: (1) 对色谱柱伤害较大; (2) 需要用高比例水进行长时间冲洗, 否则易堵塞色谱柱; (3) 精确配制的过程较为耗时; (4) 使用高比例有机相时, 磷酸盐有可能会析出。因此又分别尝试了 0.05%、0.1%甲酸与乙腈的组合, 发现使用 0.1%甲酸与乙腈的分离效果最好, 不会形成拖尾, 且峰形较好。经过比对, 各项检测指标都能达到要求。

在血清样品前处理中, 由于药物浓度较低, 萃取法可能难以完全提取出药物的。所以认为不适用于血清样品的检测。沉淀后上清液吹干再复溶是最常用的方法之一, 但是它增加了操作步骤, 且提高了稳定性考察的难度, 还必须加入抗氧化剂才能保证样品在吹干的过程中不被氧化。通过试验和对比后, 选择直接加入乙腈为沉淀剂, 将蛋白沉淀后取上清液进样分析, 该方法虽然检测限略高, 但可以在不影响结果可靠性的同时减少操作步骤, 极大地方便了临床进行检测。

本实验简单, 准确, 经济, 灵敏度并不低于

使用 LC-MS 的方法, 方法回收率高于 80%, 日间和日内 RSD 值小于 5%, 符合生物样品分析要求。可以大规模用于临床药物检测和相关药动学研究。

参考文献

- [1] Wiviott S D, Braunwald E, McCabe C H, *et al.* Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(20): 2001-2015.
- [2] Saito S, Isshiki T, Kimura T, *et al.* Efficacy and safety of adjusted-dose prasugrel compared with clopidogrel in Japanese patients with acute coronary syndrome: The PRASFIT-ACS study [J]. *Circ J*, 2014, 78(7): 1684-1692.
- [3] Isshiki T, Kimura K, Ogawa H, *et al.* Prasugrel, a third generation P2Y₁₂ receptor antagonist, in patients with coronary artery diseases undergoing elective percutaneous coronary intervention: A Phase III, randomized, double-blind study [J]. *Circ J*, 2014, 78(12): 2926-2934.
- [4] Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, *et al.* Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(1): 92-99.
- [5] Wallentin L, Varenhorst C, James S, *et al.* Prasugrel achieves greater and faster P2Y₁₂receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(1): 21-30
- [6] Sangkuhl K, Klein T E, Altman R B. Clopidogrel pathway [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20(7): 463-465.
- [7] Souiri E, Jalalizadeh H, Kebriae-Zadeh A, *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 Chromatogr*, 2006, 20(12):1309-1314
- [8] Bahrami G, Mohammadi B, Sisakhtnezhad S. High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: Application to a bioequivalence study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 864(1-2): 168-172.
- [9] 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.
- [10] 季宏建, 周小华, 邹建军, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中氯吡格雷的浓度及其药动学研究 [J]. *中国药房*, 2009, 20(8): 584-586.
- [11] 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): 811-815.